



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

*Euglena gracilis* cultivada en anaerobiosis  
como estrategia para remover  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

MIRIAM LORENA CAMPOS GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. RICARDO JASSO CHÁVEZ



Los Reyes Iztacala Edo. De México, 2016.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

<b>Presidente:</b>	Dr. Hugo Virgilio Perales Vela
<b>Vocal:</b>	M. en C. Gloria Garduño Solórzano
<b>Secretario:</b>	Dr. Ricardo Jasso Chávez
<b>1<sup>er</sup> Suplente:</b>	Dra. María Graciela Molina González
<b>2<sup>do</sup> Suplente:</b>	Biol. Angélica Mendoza Estrada

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.

Esta investigación fue financiada por CONACyT-México (Proyecto No. 156969, RJC) y por el ICyTDF- México (Proyecto No. PICS08-5, RJC).

### **Asesor del tema:**

Dr. Ricardo Jasso Chávez

### **Asesor técnico:**

Biol. Michel Geovanni Santiago Martínez

### **Sustentante:**

Miriam Lorena Campos García

*“Lo misterioso o lo que cuesta más trabajo es un dulce reto, porque cuando lo descubres deseas profundizar aún más.”*

*MSR*

*“Cuida tus pensamientos, porque se convertirán en tus palabras. Cuida tus palabras, porque se convertirán en tus actos. Cuida tus actos, porque convertirán en tus hábitos. Cuida tus hábitos, porque se convertirán en tu destino.”*

*Mahatma Gandhi*

## DEDICATORIA

A mi Madre Verónica, la persona que más admiro, gracias por tu amor sin límites y por todo el sacrificio y el esfuerzo que desde siempre has dado por mí pero sobretodo, por guiarme siempre hacia el éxito ¡Te amo!.

A mi abuela Martha (Mamá Martha), por su cariño desde siempre, por apoyarme y alentarme en todo momento a lograr mis metas...ésta es una de ellas, muchas gracias ¡te adoro!.

A mi tío Arturo (Beto), por todo lo que hiciste por mí y los excelentes consejos, has sido como un hermano; y a mi tío Oscar, por sus lecciones de vida y la ayuda brindada.

A Lupita mi hermana, porque sin ti mi vida hubiera sido otra, gracias por siempre creer en mí y por mi sobrina Lucía, sus risas y entusiasmo alegran mis días. Hemos tenido momentos maravillosos y me alegra mucho haberlos compartido contigo, te quiero mucho.

A mis mejores amigas: Ana, por estar ahí para apoyarme y ayudarme en todo momento, eres excelente persona en todos los aspectos; y a Beatriz por esa chispa tan particular que te caracteriza y tu creatividad para hacer las cosas. Las quiero, son muy importantes para mí.

A mis grandes amigos de la carrera: Yenifer gracias por todo tu cariño y valentía de siempre, Edith tus palabras de aliento y admiración siempre me ponen de buenas, Marco tu forma de ser es impredecible y eso te hace alguien increíble, Joan tu actitud contra las adversidades es admirable, Axel me enseñaste que la disciplina es un hábito que se disfruta si te gusta lo que haces, y Pedro eres la persona más sincera y honesta que conozco. Con todos ustedes compartí múltiples altibajos, desvelos, sarcasmos, risas, alegrías y me siento realmente afortunada de haberlos conocido.

A Fernando, por ser alguien que siempre da lo mejor de sí, no todos los días se encuentran personas como tú, y a Gustavo por su forma de ser tan alegre y positiva.

A los profesores que durante la carrera me cultivaron y enriquecieron con sus conocimientos y dejaron valiosas enseñanzas que aplicaré en la vida: Deni Magdalena, F.

Javier Martínez, Leticia Verdín †, Omar Ángeles, José Luis Tello, Gloria Paniagua, Sergio Vaca y Manuel Mandujano.

Al Dr. Ricardo Mejía, por aceptarme en su laboratorio y acercarme en primera instancia al mundo de la investigación, así como la confianza brindada y el apoyo de usted y de la Dra. Consuelo Figueroa, Mónica e Ismael, con quienes conviví durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Ricardo Jasso, gracias por darme la oportunidad de desarrollarme intelectual y profesionalmente, la confianza puesta en mí, sus consejos en todos los aspectos y brindarme el apoyo para la realización de este proyecto.

A Geovanni Santiago, por asesorarme y aconsejarme durante la realización de este trabajo así como en aspectos de mi vida; a Elizabeth Lira, por sus sabias aportaciones, explicarme y la ayuda brindada en cada duda; a Gregorio y Paulina por enseñarme y orientarme desde mi primer día en el laboratorio; a Silvia, Isis y Cristian, por las risas y los temas compartidos; a Kasia y Daniela, por tener la confianza de preguntarme sus dudas y poner a prueba mis conocimientos. Muchas gracias a todos por su amistad y hacer mi estancia en el laboratorio más amena, divertida y por todos los buenos momentos compartidos dentro y fuera.

## AGRADECIMIENTOS

A todas y cada una de las personas que forman parte del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

A mí jurado, por sus observaciones que enriquecieron este trabajo: Dr. Hugo Perales gracias por su atención y percepción; Mtra. Gloria Garduño muchas gracias por la confianza brindada y sus aportaciones; Biol. Angélica Mendoza, gracias por las clases dadas y su revisión de este proyecto, y a la Dra. Graciela Molina por sus correcciones.

A el CONACyT-México y el ICyTDF-México, por el financiamiento para la realización de este proyecto.

A todas las personas que de manera directa o indirecta me brindaron su confianza, cariño y fe pero también, por los retos impuestos para fortalecerme, así como las alegrías que vivimos día con día, sin olvidar que los éxitos y metas son para seguir adelante. Muchas gracias.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1. Contaminación del agua a nivel mundial.....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1.1. Contaminación de sistemas acuáticos en México.....	- 1 -
1.1.2. Impacto de los metales pesados en el medio ambiente. ....	- 3 -
<b>1.2. El cadmio y su toxicidad.....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>1.3. El cobre y su toxicidad.....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>1.4. Importancia económica de cadmio y cobre.....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>1.5. La biorremediación como una alternativa para eliminar metales pesados del agua. -</b>	<b>7 -</b>
<b>1.6. <i>Euglena gracilis</i> fotoheterotrófica.....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>1.7. Mecanismos descritos de resistencia y tolerancia a metales pesados.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>- 13 -</b>
5.1. General.....	- 13 -
5.2. Particulares.....	- 13 -
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>6.1. Elaboración de soluciones calibradas de cadmio y cobre.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>6.2. Medio de cultivo Greenblatt &amp; Schiff modificado.....</b>	<b>- 16 -</b>
6.2.1. Medio de cultivo aerobio.....	- 18 -
6.2.2. Medio de cultivo anaerobio. ....	- 18 -
<b>6.3. Crecimiento celular y exposición a metales.....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>6.4. Cosecha de células.....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>6.5. Cuantificación de las fuentes de carbono.....</b>	<b>- 20 -</b>
6.5.1. Glutamato.....	- 20 -
6.5.2. Malato.....	- 21 -

6.5.3. Etanol.....	- 21 -
<b>6.6 Fotosíntesis y respiración.....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>6.7. Cuantificación de metales por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA). ...</b>	<b>- 22 -</b>
<b>6.8. Cuantificación de TBARS.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>6.9. Extracción de clorofila.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>6.10. Cuantificación de polifosfato y fosfato libre.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>6.11. Formación de biopelícula.....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>6.12. Muestras de agua residual.....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>7.1. “Maximal Inhibitory Concentration” (IC<sub>90</sub>) de cadmio y cobre en condiciones .....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>aerobias y anaerobias.....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>7.2. Efecto de Cd<sup>2+</sup> + Cu<sup>2+</sup> sobre el crecimiento celular en condiciones aerobias .....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>y anaerobias.....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>7.3. Consumo de glutamato, malato y etanol como fuente de carbono.....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>7.4. Efecto de la combinación de metales Cd<sup>2+</sup> + Cu<sup>2+</sup> sobre la fotosíntesis y la</b>	
<b>respiración.....</b>	<b>- 33 -</b>
<b>7.5. Remoción de Cd<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> en condiciones aerobias y anaerobias.....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>7.6. Cuantificación de TBARS en condiciones aerobias y anaerobias.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>7.7. Síntesis de polifosfato en condiciones anaerobias.....</b>	<b>- 37 -</b>
<b>7.8. Formación de biopelícula en células expuestas a diferentes concentraciones .....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>de Cd<sup>2+</sup> + Cu<sup>2+</sup> en ambas condiciones de cultivo.....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>7.9. <i>Euglena gracilis</i> cultivada en agua residual.....</b>	<b>- 39 -</b>
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>- 55 -</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sedimentación y redisolución de metales en un medio acuático.

Figura 2. A) *Euglena gracilis* vista a 40X a través de un microscopio óptico. Foto tomada en: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología. B) *Euglena gracilis*, foto obtenida de: <http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/86>

Figura 3. Esquema del metabolismo energético en la mitocondria de *Euglena gracilis*.

Figura 4. Mecanismos descritos de resistencia y tolerancia a metales pesados en diferentes organismos.

Figura 5. Diseño experimental.

Figura 6. Medio de cultivo aerobio (izquierda) y anaerobio (derecha).

Figura 7. A) Cámara anaerobia modelo COY laboratory products; MI, USA. y B) Compuerta anaerobia, modelo COY laboratory products; MI, USA.

Figura 8. Contenido y posición de células en la microplaca de 96 pozos.

Figura 9 A. Efecto del cadmio sobre la duplicación celular en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B).

Figura 9 B. Efecto del cobre sobre la duplicación celular en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B).

Figura 10. Curva de crecimiento de *E. gracilis* en condiciones aerobias, expuesta a concentraciones  $\mu\text{M}$  de cadmio y cobre.

Figura 11. Curva de crecimiento de *E. gracilis* en condiciones anaerobias, expuesta a concentraciones  $\mu\text{M}$  de cadmio y cobre.

Figura 12. A) *E. gracilis* vista a 40X en Microscopio óptico en conciones aerobias. B) Cultivos de *E. gracilis* en condiciones aerobias (Izquierda) y anaerobias (Derecha). C) *E. gracilis* vista a 40X en Microscopio óptico en condiciones anaerobias.

Figura 13. Densidad celular y viabilidad por cultivo, de células aerobias y anaerobias a los 16 días de exposición a metales, el tiempo inicial de todos los cultivos fue de  $0.4 \times 10^6$  cél/mL.

Figura 14. Abajo se observa a 40X una célula viable (verde) de la no viable (morado).

Figura 15. Glutamato, malato y etanol remanente en el medio de cultivo aerobio y anaerobio.

Figura 16. Remoción de cadmio a diferentes concentraciones en el medio de cultivo, en condiciones aerobias y anaerobias.

Figura 17. Acumulación y adsorción de cadmio por *E. gracilis*, en condiciones aerobias y anaerobias.

Figura 18. Remoción de Cobre en el medio de cultivo por *E. gracilis*, en condiciones aerobias y anaerobias.

Figura 19. Acumulación y adsorción de cobre por *E. gracilis*, en condiciones aerobias y anaerobias.

Figura 20. Síntesis de polifosfato en *E. gracilis*, cultivada en condiciones anaerobias.

Figura 21. Formación de biopelícula de *E. gracilis*, cultivada en condiciones anaerobias y aerobias.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de tratamientos de aguas residuales industriales en México.

Tabla 2. Límites permisibles de metales en agua potable para uso y consumo humano, establecidos por la NOM-127 SSA1-1994.

Tabla 3. Composición química del medio de cultivo Greenblatt & Schiff modificado (2010).

Tabla 4. Fotosíntesis y respiración de *E. gracilis* fotosintética cultivada en ausencia y presencia de 20  $\mu\text{M}$  Cd + 25  $\mu\text{M}$  Cu. Media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Tabla 5. Concentraciones de metales pesados y metaloides en muestras de agua residual del Río "Los Cuartos", Naucalpan, Edo. Méx.

Tabla 6. Duplicación celular en células control aerobias, anaerobias y pre-adaptadas a metal (80  $\mu\text{M}$  Cd<sup>2+</sup> + 100  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup>) cultivadas en agua residual, con vitaminas (n=3) y sin vitaminas (n=2). La densidad celular se determinó a los 21 días.

Tabla 7. Análisis estadístico *t-Student* en curva de crecimiento bajo condiciones aerobias (Figura 10), comparación de la combinación de metales vs control, a los 18 días de cultivo.

Tabla 8. Análisis estadístico *t-Student* en curva de crecimiento bajo condiciones anaerobias (Figura 11), comparación de la combinación de metales vs control, a los 18 días de cultivo.

Tabla 9. Análisis estadístico *t-Student* de la cuantificación de polyP (Figura 20) en combinación de metales en anaerobiosis vs control.

Tabla 10. Análisis estadístico *t-Student* de la formación de biopelícula (Figura 21) en condiciones aerobias (# de veces) vs control.

Tabla 11. Análisis estadístico *t-Student* de la formación de biopelícula (Figura 21) en condiciones anaerobias (# de veces) vs control.

Anexo 1. Tablas de análisis estadísticos *t-Student* para muestras independientes.

Anexo 2. Tabla de *t-Student*.

## ABREVIATURAS

**ADHc** Alcohol deshidrogenasa citosólica

**AOX** Oxidasa alterna

**ATK** Acetato tiocinasa

**ATSDR** Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades

**CAT** Catalasa

**Cd<sup>2+</sup>** Cadmio divalente

**CdCl<sub>2</sub>** Cloruro de cadmio

**CdO** Óxido de cadmio

**CdS** Sulfuro de cadmio

**CoA** Coenzima A

**CONAGUA** Comisión Nacional del Agua

**Cu<sup>2+</sup>** Cobre divalente

**Cu/Zn SOD** Cobre/Zinc  
superóxidodismutasa

**Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O** Sulfato cúprico  
pentahidratado

**CuCo<sub>3</sub>** Carbonato de cobre

**CuO** Óxido de cobre

**Cyt-cox** Citocromo-c oxidasa

**Cys** Cisteína

**DBO<sub>5</sub>** Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días

**DQO** Demanda Química de Oxígeno

**DTT** Dithiothreitol

**EAA** Espectrofotometría de Absorción Atómica

**EGTA** Del inglés: *Ethylene Glycol Tetra acetic Acid*

**EPS** Exopolisacáridos

**ERO** Especies reactivas del oxígeno

**EtOH** Etanol

**GDH** Glutamato deshidrogenasa

**GME** Glutamato, Malato y Etanol (medio de cultivo)

**GPX** Glutación peroxidasa

**GSH** Glutación

**Head space** Del inglés: (“Espacio libre apical”)

**INEGI** Instituto Nacional de Estadística y Geografía

**KME** (buffer) KCl, Mops, y EGTA

**MDA** Malondialdehído

**MDH** Malato deshidrogenasa

**mtxALDH** Aldehído deshidrogenasa de la matriz mitocondrial

**NaBH<sub>4</sub>** Boro hidruro de sodio

**OECD** Del inglés: *Organization for Economic Cooperation and Development*

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PC** Del inglés: *Phytochelatin*  
Fitoquelatina

**PCA** Ácido perclórico

**pH**  $-\log [H^+]$

**Pi** Fosfato inorgánico

**polyP** Polifosfato

**ROS** Del inglés: *Reactive Oxygen Species*

**SEMARNAT** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

**SDH** Succinato deshidrogenasa

**SH** Grupo sulfhidrilo o tiol

**SOD** Superóxido dismutasa

**SST** Sólidos suspendidos totales

**S<sup>-2</sup>** Sulfuro (anión)

**TBARS** Del inglés: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*.

**TEP** Tetraetoxipropano

**TMPD** Tetrametil dihidrocloruro-p-fenilemdiamina

**UNESCO** Del inglés: *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*

**WWAP** Del inglés: *World Water Assessment Programm*

## RESUMEN

Algunos microorganismos tienen la capacidad de descomponer, degradar, remover y acumular sustancias peligrosas y transformarlas en compuestos menos tóxicos, entre ellos se encuentra la remoción de metales pesados en sistemas acuáticos. Existen mecanismos diferentes de resistencia a metales pesados, tales como la síntesis de polifosfato, el aumento en el contenido de moléculas con grupos tiol (Cys y GSH) y la síntesis de fitoquelatinas (PC) en arqueas, microalgas, protistas y levaduras así como la formación de biopelícula en bacterias y arqueas. El presente trabajo buscó contribuir con una alternativa más en la biorremediación de sistemas acuáticos contaminados por metales pesados. Se utilizó a *Euglena gracilis* fotoheterotrófica como modelo de estudio debido a su gran plasticidad metabólica (consumo de varias fuentes de carbono externas en condiciones aerobias y anaerobias), a su capacidad de sobrevivir y duplicarse en ambientes con condiciones extremas, tales como distintos valores de pH y en presencia de metales pesados. *E. gracilis* se cultivó en presencia de  $\text{Cd}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$  en condiciones aerobias y anaerobias, se determinó el efecto de la exposición a estos metales pesados sobre la generación de biomasa, su capacidad de remoción, así como los mecanismos de resistencia involucrados. Los resultados mostraron que en condiciones aerobias no sobrevivieron a concentraciones mayores de  $40 \mu\text{M Cd}^{2+} + 50 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , mientras que en condiciones anaerobias fue capaz de crecer y sobrevivir tanto, lo que sugirió la presencia de mecanismos de resistencia a estos metales. La principal fuente de carbono que se consumió fue el malato, seguido por el glutamato y el EtOH, siendo este último consumido en las células cultivadas en condiciones aerobias. La acumulación del metal fue el mecanismo principal de remoción en ambas condiciones de cultivo, debido a un incremento en el contenido de polyP, esto sugirió que éste es un mecanismo muy importante en la inactivación del metal en células anaerobias expuestas a la combinación de metales así como un aumento en la formación de biopelícula. Esta capacidad de resistir concentraciones mayores de los metales pesados significó una ventaja al exponer a estos cultivos en una muestra real de aguas de río contaminadas por metales pesados, donde lograron sobrevivir y crecer, mientras que los cultivos control no sobrevivieron.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Contaminación del agua a nivel mundial**

El agua es un recurso esencial para que todas las formas de vida conocidas en el planeta puedan sobrevivir [Comisión Nacional de Agua (CONAGUA, 2014)]. En la Tierra el 97% del agua disponible es salada, el 2.5% del agua dulce se encuentra congelada en los glaciares de la Antártida y el Ártico, y solo el 0.5% que está disponible para los humanos, se encuentra en la lluvia, acuíferos, lagos naturales, embalses y ríos (UN-Water, 2005). Por lo tanto, es importante mantener la calidad del agua y aumentar su disponibilidad para el uso racional doméstico e industrial (CONAGUA, 2014).

El Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos menciona que los principales contaminantes del agua en el mundo son “prácticamente todas las actividades productoras de bienes”, y que en los países que se encuentran en vías de desarrollo más del 80% de las aguas residuales no reciben un tratamiento adecuado, provocando la contaminación de ríos, lagos y zonas costeras, mediante la acumulación de materia orgánica, pesticidas y metales pesados [United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO, 2015)].

La escasez y la contaminación del agua utilizada en la agricultura son problemas urgentes que necesitan una solución rápida para evitar problemas mayores al medio ambiente y no frenar el desarrollo económico. Además, se pronostica que para el año 2050 la disponibilidad de agua dulce será aún más restringida y que la demanda mundial de este recurso aumentará un 55%, debido al incremento de actividades industriales, la generación de energía termoeléctrica y el uso doméstico [Organización para el Cooperación Económica y Desarrollo (OECD, 2012)].

#### **1.1.1. Contaminación de sistemas acuáticos en México**

En México aproximadamente el 70 % de los cuerpos de agua están contaminados. La contaminación de los cuerpos de agua marinos y dulceacuícolas (lóticos, lénticos, superficiales y subterráneos) se ha incrementado por el uso de plaguicidas en las actividades agrícolas y/o por la extracción de petróleo, limitando su potencial de uso doméstico (Cervantes, 2007). Además, las aguas residuales industriales no reciben un tratamiento adecuado y completo; por ejemplo, solo el 3% de las plantas en la Ciudad de

México tienen un tratamiento terciario adicional a las aguas contaminadas con la finalidad de que pueda ser utilizada para riego agrícola o de áreas verdes. (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de tratamientos de aguas residuales industriales en México.

<b>Tipo de tratamiento</b>	<b>Propósito</b>	<b>Número de plantas</b>	<b>%</b>
<b>Primario</b>	Ajustar el pH, remover materia orgánica y/o compuestos inorgánicos en suspensión con tamaño igual o menor a 0.1 mm	796	31
<b>Secundario</b>	Remover materiales orgánicos coloides y disueltos.	1518	60
<b>Terciario</b>	Remover materiales disueltos, que incluyen gases, sustancias orgánicas naturales y sintéticas, iones, bacterias y virus.	74	3
<b>No especificado</b>		142	6
<b>Total</b>		2530	100

Fuente: CONAGUA. Subdirección General Técnica, 2013.

La Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2011), menciona a los tres indicadores que permiten evaluar la calidad del agua: Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días (DBO<sub>5</sub>), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Suspendidos Totales (SST) y su efecto sobre el medio ambiente, donde el aumento en los valores de la DBO<sub>5</sub> y la DQO indican que hay una disminución del contenido de oxígeno disuelto en el agua y por consecuencia, esto afectará a los organismos que habitan ahí. Por otro lado, el aumento en el valor de los SST indica que el agua pierde la capacidad de soportar la diversidad de la vida acuática, además la aparición de floraciones, la presencia de materia orgánica, un déficit en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, (Sánchez *et al.*,

2007) y la presencia de metales pesados en altas concentraciones (Cervantes & Moreno-Sánchez, 1999) sirven como un indicador de agua contaminada.

### 1.1.2. Impacto de los metales pesados en el medio ambiente

Los metales pesados como definición se refieren a todos los elementos químicos con una densidad superior a 5 g/mL y son clasificados con base en su reactividad con grupos funcionales de biomoléculas como son el  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  o con el oxígeno como el  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{1+}$ , y con el azufre como el  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  (Nieboer & Richardson, 1980; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005 a, b). Los metales están presentes de manera natural en el ambiente, ya que forman parte de la corteza terrestre y además tienen un papel fundamental en las funciones bioquímicas y fisiológicas de los organismos (Méndez *et al.*, 2008). El mayor aporte de metales pesados como  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , es de origen antropogénico, por algunos procesos industriales como la minería, residuos domésticos, los cuales son una fuente importante de contaminación y aportan grandes cantidades de metales al aire, suelo y agua (Rosas-Rodríguez, 2005).

La industria minera en México es una actividad que tiene un gran impacto en el ambiente ya que afecta al suelo y sistemas acuáticos (Figura 1). Algunos de los metales que son extraídos como el  $\text{Au}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , entre otros, llegan a acumularse en la superficie del suelo y se van reduciendo lentamente a través de la lixiviación y la erosión (Volke *et al.*, 2005). En los sedimentos del Río Xochula, cercano a una zona de extracción de plata y otros metales en Taxco, México se encontraron metales pesados como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Espinosa & Armienta, 2007). En un análisis sobre la emisión de contaminantes provenientes del sector de fabricación de celulosa, papel y cartón, se menciona que en México del año 2005 al 2015 los metales más descargados al agua fueron el  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ . [Comisión de Cooperación Ambiental de América del Norte (CCA)]. Por otra parte, en un estudio realizado en el Lago de Chapala en Jalisco, México, se encontró que la principal fuente de agua para la zona metropolitana de Guadalajara, tenía la presencia de metales pesados como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , pero también en sedimentos, plantas y tejidos musculares de peces, donde se encontró principalmente  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Ford & Ryan, 1995). Similar a lo investigado en tres zonas costeras de Yucatán, México, donde se encontraban pepinos de mar, se detectó  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (González-Medina *et al.*, 2004). En el agua del Río Sonora y del Río

Bacanuchi se determinó una concentración de metales pesados alta, la cual rebasaba los límites permisibles establecidos por la NOM -127-OM-127-SSA1-1994 (Tabla 2), donde la concentración de  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $As^{2+}$  estaba 31857, 5000, 1500 y 800 veces incrementada que los valores del límite permisible, respectivamente [Proyecto sobre Organización, Desarrollo, Educación e Investigación (PODER® [www.projectpoder.org](http://www.projectpoder.org))], afectando la salud de la población que utiliza esta agua (SEMARNAT, 2015).

Tabla 2. Límites permisibles de metales en agua potable para uso y consumo humano, establecidos por la NOM-127 SSA1-1994.

<b>Metal</b>	<b>Límite permisible (ppm o mg/L)</b>
Cadmio	0.005
Cobre	2.0
Hierro	0.30
Manganeso	0.15
Arsénico*	0.05

Fuente: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html> Datos tomados de la NOM-127 SSA1-1994. \*metaloide

## 1.2. El cadmio y su toxicidad

El cadmio (Cd) es un elemento natural presente en la Tierra, que se encuentra como mineral combinado con otros elementos como el oxígeno formando CdO, también con el cloro formado  $CdCl_2$  y con azufre en forma de  $CdSO_4$  o CdS. Gran parte del Cd se adhiere a partículas del suelo y agua debido a sus propiedades químicas (Figura 1), a través de actividades humanas como la minería, industria, desechos domésticos, vertederos, derrames y sitios de desechos (Barceló *et al.*, 2008; Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, 2015b). Este se utiliza en múltiples procesos industriales, tales como la galvanización, aleaciones y en la elaboración de baterías recargables de Ni/Cd, fertilizantes, pinturas y plástico (SEMARNAT, 2009), otra fuente adicional es el tabaquismo (ASTDR, 2015b; OMS, 2006). Cuando el Cd se acumula en el

cuerpo humano causa inflamación y daño en los riñones, ocasionando la excreción de proteínas y carbohidratos (Lenntech, 2015a; Martínez-Flores *et al.*, 2013). La exposición crónica a este metal pesado provoca diferentes patologías óseas como la osteomalacia o síndrome de Itai-Itai, llamado así debido a los intensos dolores que presentaban los pobladores de una zona de Toyama en Japón (Ramírez, 2002).

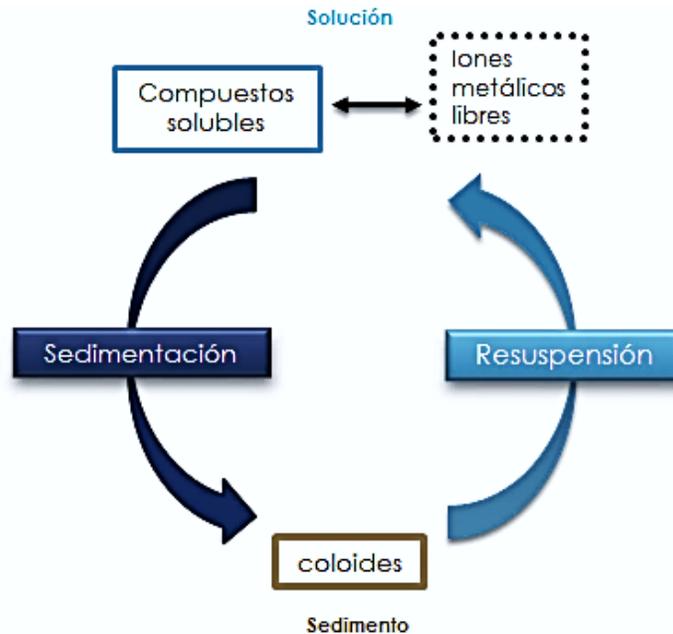


Figura 1. Sedimentación y resuspensión de metales en un medio acuático.

### 1.3. El cobre y su toxicidad

El cobre (Cu) se encuentra de manera natural en el suelo, agua y aire, este metal puede estar suspendido en el agua y/o acomplexado con materia orgánica y minerales del suelo y sedimentos. En el agua es depositado en grandes cantidades debido a industrias como la minería, galvanización y la producción de fertilizantes fosfatados (Lenntech, 2015b), además es utilizado ampliamente para la fabricación de múltiples productos como son agroquímicos, esmaltes, prótesis médico-quirúrgica, debido a su durabilidad, propiedades antimicrobianas, conductividad térmica y eléctrica, y es por eso que este metal es un material clave para la innovación en distintos sectores, como la eficiencia energética, sistemas de transporte y cuidado de la salud (European Copper Institute, 2016). En el humano es un nutriente esencial y un cofactor de enzimas importantes tales como la Cu/Zn-SOD y Cyt-c oxidasa, en el espacio extracelular y en la cadena de transporte de

electrones de las mitocondrias respectivamente (Arnal *et al.*, 2011). La exposición y la ingesta a este metal es mediante alimentos como las ostras, hígado, legumbres (Arnal *et al.*, 2011) y por beber agua contaminada, provocando signos y síntomas como irritación en ojos, nariz y boca, náuseas, vómito, diarrea, calambres estomacales, daño a hígado y riñones (Lenntech, 2015b; ASTDR, 2015a). Además existen diversas patologías influenciadas por la acumulación de este metal, llegando a originar un desorden autosómico recesivo del metabolismo del Cu, es decir, una enfermedad que se transmite de padres a hijos y es debido a la mutación en los dos alelos del gen que debe sintetizar correctamente el transportador ATP7B y la alteración de la interacción entre la proteína HAH1 y el transportador ATPB7, que es necesario para el correcto transporte del Cu, ocasionando cirrosis hepática, anemia hemolítica (en las primeras fases), y neurológicos o neuro-psiquiátricos en estadios más avanzados de la enfermedad de Wilson (Jiménez-Millán & Ruíz-Moreno, 2010; González-Álvarez *et al.*, 2014).

#### **1.4. Importancia económica de cadmio y cobre**

La importancia principal radica en la industria minera y en el aporte económico por los metales destinados a la producción, fundición y afinación de minerales metálicos y no metálicos (producción minero metalúrgica), que son extraídos de minas y procesados en plantas metalúrgicas del país [Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2010)].

El Cd es considerado un metal industrial no ferroso, porque es una sustancia con ciertas características, como es el que no tengan brillo propio ni conduzcan electricidad, además se pueden acomplejar con el hidrógeno para formar ácidos y con elementos alcalinos para formar sales (INEGI, 2010), mientras que el Cu es considerado un metal mineral siderúrgico y uno de los metales que se extraen en grandes cantidades, para la exportación y su utilización en diferentes productos, de acuerdo con datos del INEGI (2010) el valor de producción minero metalúrgica fue de 15,328 millones de pesos (54.4%) siendo el porcentaje más alto en comparación con el zinc (26.0%) y plomo (7.5%), y con base en datos de la Unión Europea, es uno de los metales que más se reciclan en el mundo a partir de productos al final de su vida útil, (European Copper Institute, 2016).

## 1.5. La biorremediación como una alternativa para eliminar metales pesados del agua

Actualmente existen diferentes tipos de remediación para remover contaminantes del agua que incluyen tratamientos físico-químicos como filtros, barreras, quelantes (tratamiento primario, Tabla 1), transformación de contaminantes (sólidos suspendidos) mediante reacciones biológicas *in situ* (tratamiento secundario, Tabla 1), intercambio iónico, desinfección (tratamiento terciario, Tabla 1). Sin embargo, una alternativa para eliminar éstos contaminantes del agua consiste en el uso de microorganismos existentes en el medio para descomponer, degradar o remover sustancias peligrosas y transformarlas en sustancias menos tóxicas para el medio ambiente y por ende en la salud humana (Hashim *et al.*, 2011; García-García *et al.*, 2016). Se ha propuesto el uso de levaduras y otros hongos, bacterias (Maroto-Arroyo & Rogel-Quesada, 2004), arqueas (Lira-Silva *et al.*, 2013), microalgas (Ferrera-Cerrato, *et al.*, 2006; Hernández-Zamora *et al.*, 2014; 2015) y protistas (Cervantes-García, *et al.*, 2014).

Por consiguiente, algunas ventajas de la biorremediación son bajo costo operativo, amigables con el ambiente y periodos de tiempo reducidos (dependiendo del organismo), aunque las desventajas son verificar la toxicidad de los intermediarios y productos, las condiciones del medio que deben favorecer el crecimiento del organismo y los residuos generados requieren periodos de tratamiento posteriores (Volke *et al.*, 2005).

Los microorganismos que tienen en sus sistemas genéticos la información codificante para sintetizar proteínas que contrarresten los efectos tóxicos de los metales pesados, tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de estos elementos (Coto-Pérez *et al.*, 2010) y llegar a vivir en condiciones de microaerofilia como *Euglena gracilis* (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

## 1.6. *Euglena gracilis* fotoheterotrófica

*Euglena gracilis* es un protista de vida libre (Figura 2 A y B) que se adapta a las condiciones de ambientes diferentes debido a su plasticidad metabólica (Buetow, 1989) y puede vivir en ambientes anóxicos o microaerofilicos, debido a que son anaerobios facultativos (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

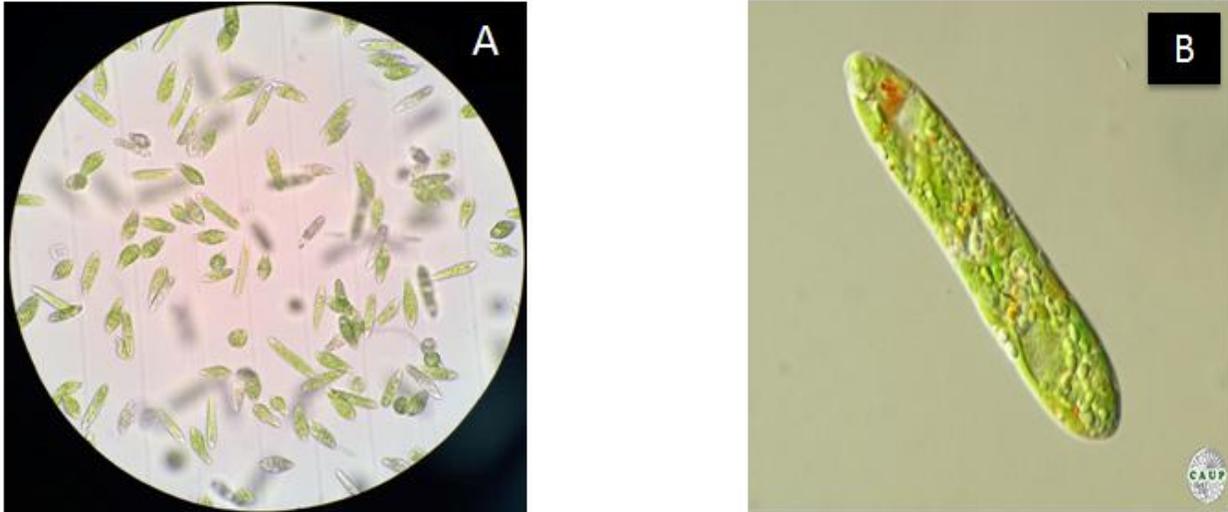
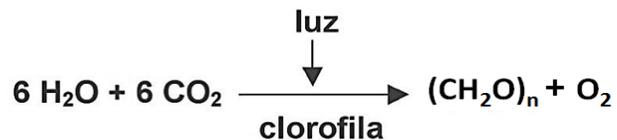


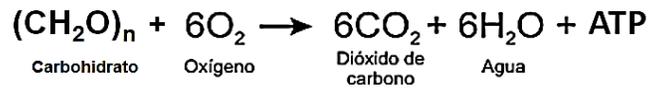
Figura 2. A) *Euglena gracilis* vista a 40X a través de un microscopio óptico. Foto tomada en: Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. B) *Euglena gracilis*, foto obtenida de: <http://botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/86>

Además, es un microorganismo fotosintético que mediante reacciones dependientes de luz llevadas a cabo en el cloroplasto, convierten la energía luminosa en química para la formación de ATP, donde a partir de dióxido de carbono, agua, y luz se obtiene como productos glucosa y oxígeno, este último se libera a la atmósfera:



Mientras que en las reacciones no dependientes de luz continúa con la síntesis de carbohidratos, en este caso, glucólisis en el citosol, y posteriormente las siguientes reacciones ocurrirán en la mitocondria, donde el dióxido de carbono, agua, la degradación de paramilo (carbohidrato de reserva) y la fosforilación oxidativa en la cadena

transportadora de electrones en presencia de oxígeno formaran ATP, como se muestra a continuación:



Por otro lado, este protista es también heterotrófico debido a que puede consumir diferentes sustratos (Figura 3) como glucosa, glutamato, malato, acetato, DL-lactato y etanol a valores diversos de pH (Jasso-Chávez *et al.*, 2010; Lira-Silva *et al.*, 2011). El etanol se ha considerado como un buen sustrato externo oxidable, ya que se ha reportado la presencia de aldehídos y alcohol deshidrogenasas citosólicas y mitocondriales en *E. gracilis* (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006, Yoval-Sánchez *et al.*, 2011). Además, la degradación de paramilo, el cual es un polisacárido de reserva (Buetow, 1989) a través de la glucólisis, produce D- y L-lactato, los cuales son oxidados por enzimas de la cadena respiratoria para la síntesis de ATP (Jasso-Chávez *et al.*, 2001).

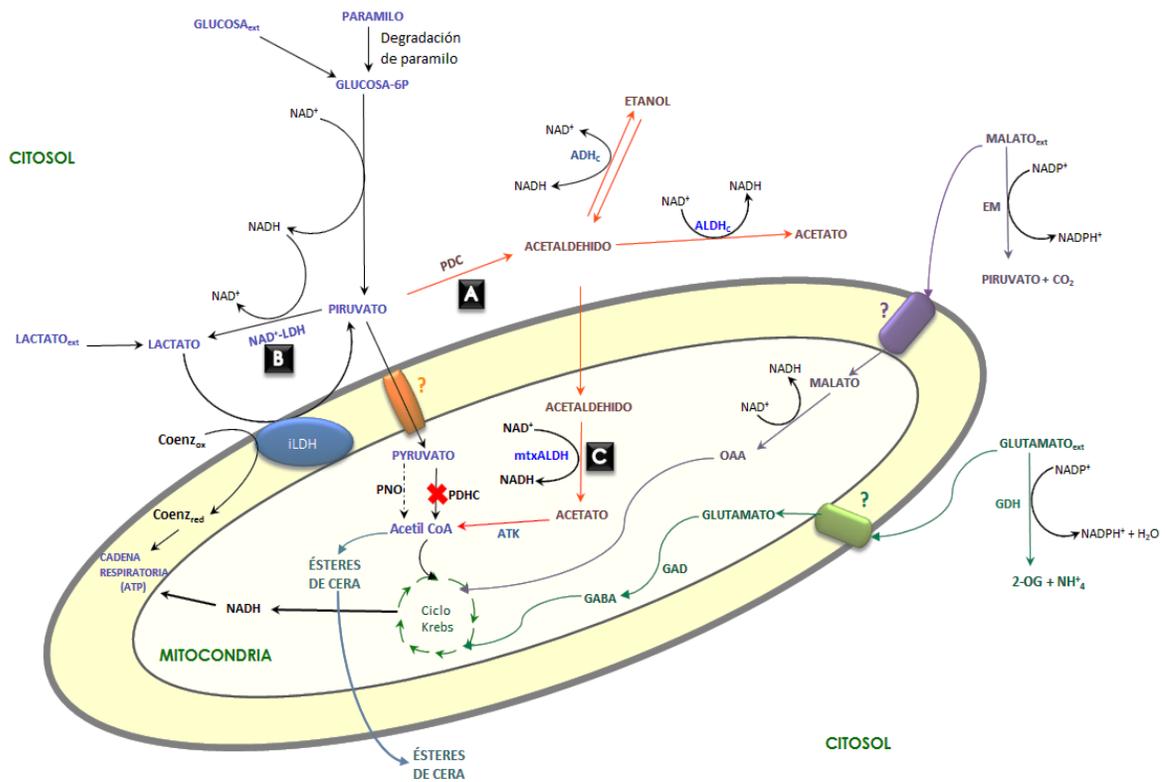


Figura 3. Esquema del metabolismo energético en la mitocondria de *Euglena gracilis*. ADHc, alcohol deshidrogenasa citosólica; ALDHc, aldehído deshidrogenasa citosólica; ATK, acetato

tiocinasa; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GAD, glutamato descarboxilasa; iLDH, lactato deshidrogenasa independiente de NAD<sup>+</sup>; mmADH, alcohol deshidrogenasa de la membrana mitocondrial; mmALDH, aldehído deshidrogenasa de la membrana mitocondrial; mtxADH, alcohol deshidrogenasa de la matriz mitocondrial; mtxALDH, aldehído deshidrogenasa de la matriz mitocondrial; nLDH, lactato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>; PDC, piruvato descarboxilasa; PDHC, complejo piruvato deshidrogenasa; PNO, piruvato NADP oxidoreductasa. La cruz roja significa que no existe evidencia de que en *E. gracilis* la enzima PDHC esté involucrada en la reacción de piruvato para formar Acetil CoA. A: Reportada por Hurlbert & Rittenberg (1962). B: Descrita por Jasso-Chávez & Moreno-Sánchez (2003). C: Caracterizada por Rodríguez-Zavala *et al.*, (2006). Modificado de Yoval-Sánchez *et al.*, (2011).

El metabolismo de *E. gracilis* es muy complejo debido a que puede cambiar dependiendo de la concentración de O<sub>2</sub>, uno de los componentes alternos reportados en la cadena de transporte de electrones, es la presencia de rodoquinona (RQ), que sirve como donador de electrones para la reducción anaeróbica de fumarato a succinato, en una reacción opuesta a la catalizada por la SDH (Castro-Guerrero *et al.*, 2005).

### **1.7. Mecanismos descritos de resistencia y tolerancia a metales pesados**

*E. gracilis* posee mecanismos similares a los de otros organismos, para resistir y tolerar metales pesados en condiciones aerobias, como la capacidad de acumular Cd<sup>2+</sup> en presencia de luz en el interior del cloroplasto (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005 a, b), mientras que en células heterotróficas se acumula en mitocondrias (Avilés *et al.*, 2003). Entre los mecanismos que utilizan organismos para contrarrestar los efectos tóxicos que ocasionan los metales pesados (Figura 4), se encuentra la quelación (interna o externa), a través de la utilización de grupos funcionales como ácidos orgánicos, fosfato, grupos SH como Cys, S<sup>2</sup>, GSH y PC (Lira-Silva *et al.*, 2011; Lira-Silva *et al.*, 2013; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006; García-García *et al.*, 2016), la biotransformación (Avilés *et al.*, 2003), la inducción de proteínas de metalotioneínas (MTP's) y su acumulación en la vacuola, debido a complejos estables de un metal con una metalotioneína de clase III (MTIII) en algas, aunque también no se descarta la presencia de MTIII con cadmio en cloroplasto y mitocondria (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005a; Perales-Vela *et al.*, 2006) o de un metal unido a sulfuro (Kumar-Suresh *et al.*, 2015), por otra parte también pueden enlazarse externamente en la membrana (adsorción) debido a la presencia de grupos amino, sulfhidrilo y carboxilo (Mejía-Sandoval, 2006). Sin embargo, no se descartan otros mecanismos de resistencia como la formación de biopelícula, realizada por algunos microorganismos como bacterias

expuestas ante un estrés por metales pesados como el  $\text{Cu}^{2+}$  (Chih-Ching *et al.*, 2013), y la síntesis de polifosfato (polyP) en arqueas (Lira-Silva *et al.*, 2013) y protistas (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

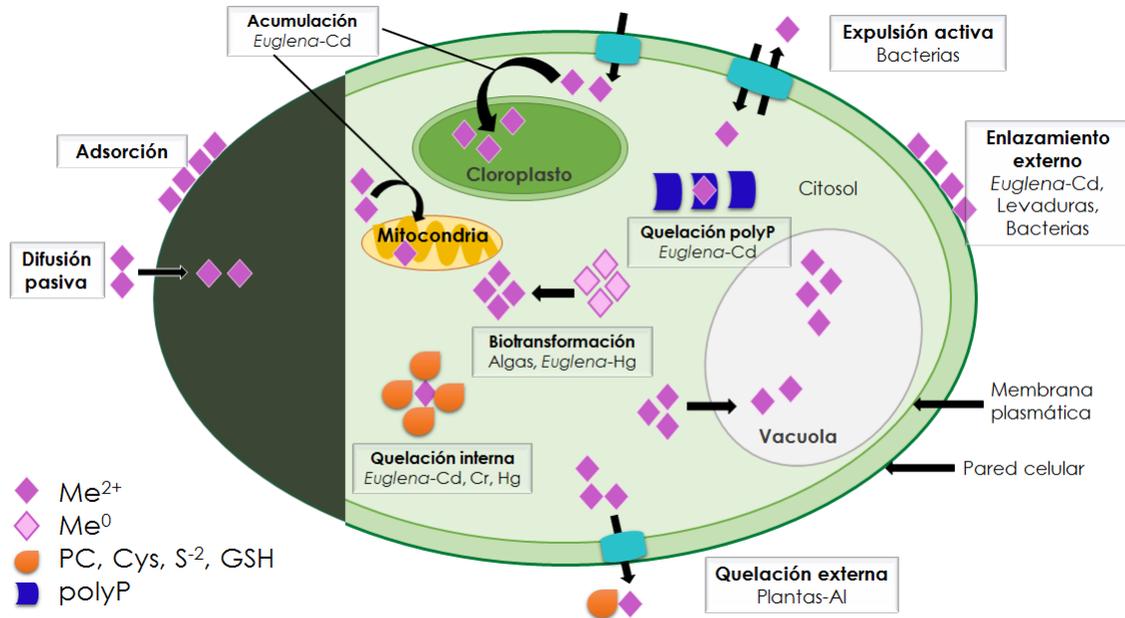


Figura 4. Mecanismos descritos de resistencia y tolerancia a metales pesados en diferentes organismos. A la izquierda se muestra una célula no viable, la adsorción y la difusión pasiva de un metal pesado. A la derecha una célula viable, la acumulación en diferentes organelos (cloroplasto, mitocondria y vacuola), la expulsión activa, la biotransformación y la quelación externa e interna por fitoquelatinas y polifosfato (PC y polyP) Modificado de Kumar-Suresh *et al.*, 2015 y Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007.

## 2. ANTECEDENTES

Avilés *et al.*, (2003) reportaron que en cultivos heterotróficos de *Euglena gracilis* la pre-exposición a  $1.5 \mu\text{M HgCl}_2$  durante varias generaciones (<60) en condiciones de obscuridad aumenta la resistencia a  $\text{Cd}^{2+}$  comparado con las células que no fueron pre-tratadas con  $\text{Hg}^{2+}$  y la acumulación de  $\text{Cd}^{2+}$  ocurrió principalmente en mitocondrias y que además, el mercurio fue biotransformado de  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$ .

Por otra parte, Santiago-Martínez *et al.*, (2015) determinaron la remoción de  $\text{Cd}^{2+}$  por *Euglena gracilis* fotoheterotrófica cultivada en condiciones anaerobias a pH de 3.5, con glutamato, malato y glucosa como fuentes de carbono y se identificó que la adsorción

es el mecanismo principal de remoción del  $\text{Cd}^{2+}$  a concentraciones altas (90%, con 300  $\mu\text{M}$ ), mientras que en condiciones aerobias se removió el 25% a esa misma concentración, no obstante, la acumulación fue el principal mecanismo de remoción en condiciones aerobias al ser expuesta a 300  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (aproximadamente 50%) mientras que en condiciones anaerobias la acumulación fue aproximadamente del 1%, otro de los mecanismos evaluados en ese trabajo fue la determinación del contenido de polyP en células aerobias cultivadas con 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  y resultó que el  $\text{Cd}^{2+}$  intracelular es quelado, debido a una posible síntesis de polyP, adicionalmente se realizó un microanálisis elemental espectral por HAADF-STEM en cloroplasto y citosol, donde se detectó la presencia de P, S y Cd en zonas electrodensas, lo que sugirió que el polyP y los grupos tiol, medidos como GSH, Cys y PC quelaron el  $\text{Cd}^{2+}$  y que estos se incrementaron conforme aumentaba la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$ .

Se ha determinado que *E. gracilis* puede sobrevivir en concentraciones bajas de  $\text{O}_2$  o microaerofilia (similar a los sistemas acuáticos contaminados), sin embargo, en las células eucariontes, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), pueden estar presentes en la célula principalmente al transporte de electrones en las mitocondrias y los cloroplastos. En condiciones aerobias las ERO pueden causar daños graves a proteínas, DNA y membranas celulares, cuando el sistema antioxidante no es suficiente para contrarrestar su efecto, si adicionalmente las células son expuestas a metales pesados como el  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , la maquinaria antioxidante no será suficiente para contender contra las ERO producidas en la célula y el daño celular podría ser mayor (Torres, 2002). Sin embargo, Santiago-Martínez *et al.*, (2015) midieron el contenido intracelular de malondialdehído (MDA) que es uno de los productos que se forma por la peroxidación de ácidos grasos insaturados (funciona como marcador de la degradación oxidativa de membranas, ocasionada por estrés oxidante) cuantificado mediante el método de TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), las células fotoheterotróficas indicaron que en las células anaerobias hubo menor daño por estrés oxidante que en células aerobias.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Lo mencionado anteriormente hace referencia a que cultivar a *E. gracilis* en condiciones anaerobias, con la finalidad de disminuir el estrés oxidante generado en el metabolismo

mitocondrial, ya que actualmente existen pocas investigaciones acerca del efecto sobre el crecimiento celular y el daño provocado por la combinación de metales pesados en condiciones anaerobias, además tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes estresantes, debido a que presenta diferentes mecanismos de resistencia, para remover metales del ambiente. El presente trabajo buscó proponer a *Euglena gracilis* como un organismo para biorremediar cuerpos de agua contaminados por metales pesados, y a largo plazo se evitarían problemas de salud y/o quizá obtener una ganancia económica.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si se cultiva a *Euglena gracilis* en condiciones anaerobias, entonces resistirá los efectos tóxicos de los metales pesados, debido a que se generarán menos especies reactivas de oxígeno.

#### **5. OBJETIVOS**

##### 5.1. General

Evaluar el efecto y los mecanismos implicados en la remoción de metales pesados ( $\text{Cd}^{2+}$  +  $\text{Cu}^{2+}$ ) en *Euglena gracilis* cultivada en condiciones anaerobias.

##### 5.2. Particulares

a) Determinar el efecto de  $\text{Cd}^{2+}$  +  $\text{Cu}^{2+}$  en *E. gracilis* cultivada en condiciones aerobias y anaerobias sobre:

- La biomasa y viabilidad celular.
- El consumo de las fuentes de carbono.
- La fotosíntesis y la respiración.
- El contenido de TBARS.

b) Identificar los mecanismos de resistencia como:

- Acumulación y adsorción de metales pesados.
- Síntesis de polifosfato (polyP).
- Formación de biopelícula.
- Exposición de células a agua residual.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

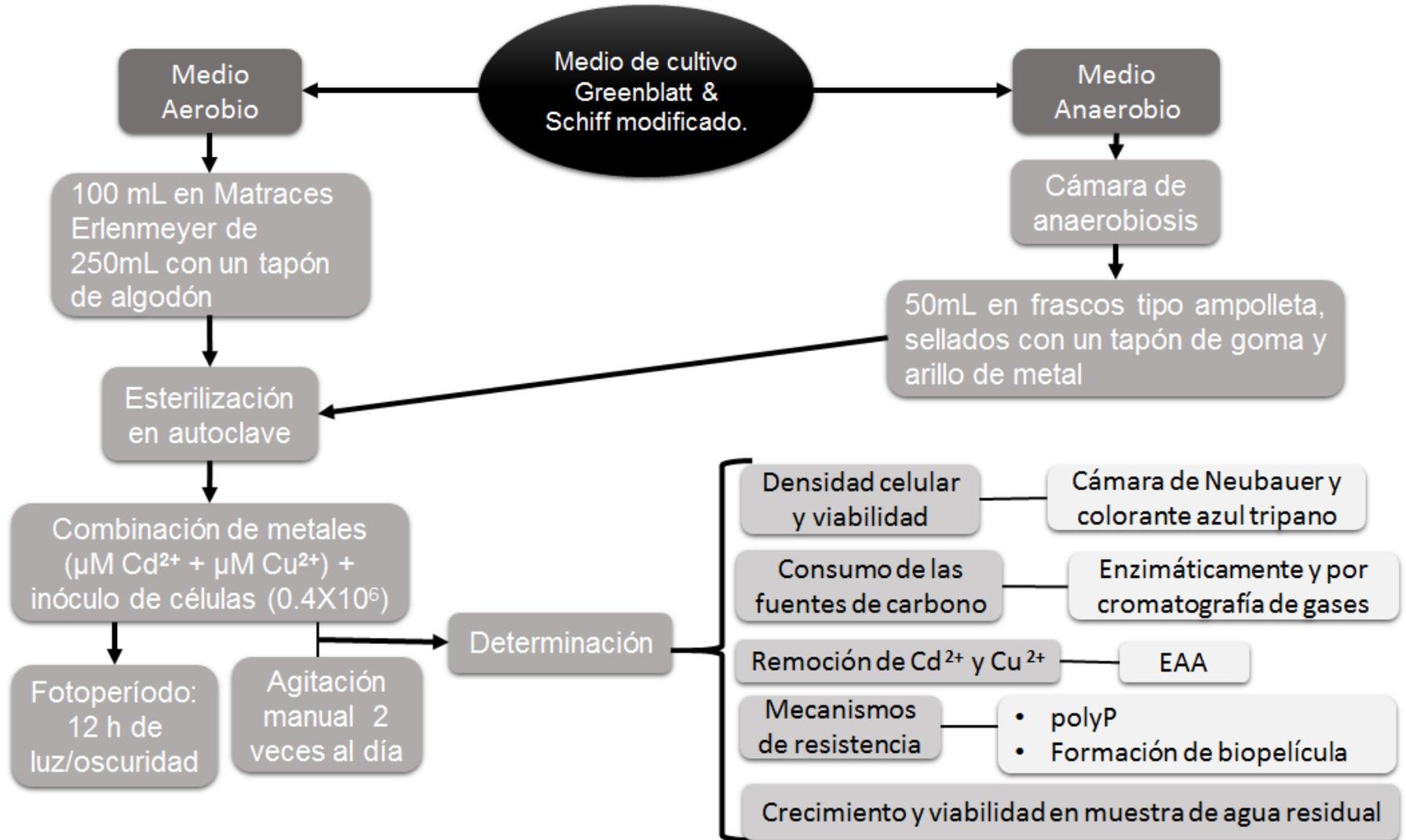


Figura 5. Diseño experimental.

## 6.1. Elaboración de soluciones calibradas de cadmio y cobre

Se preparó una solución 40 mM  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  y 50 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  con agua ultrapura (Milli Q). El exceso de oxígeno disuelto en el agua se eliminó a través del intercambio de gases dentro de una cámara de anaerobiosis (COY laboratory products inc., Michigan, USA), la cual contenía 80% nitrógeno, 15% dióxido de carbono y 5% hidrógeno (v/v). Después de 2 horas de agitación, la solución se envasó en frascos de vidrio tipo ampolleta de 100mL de capacidad y fueron sellados herméticamente utilizando un tapón de goma y un arillo de metal. Las soluciones fueron esterilizadas en la autoclave a 1.5 Lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 45 min (Lira-Silva *et al.*, 2011; Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

Las soluciones fueron calibradas por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) para conocer la concentración real. Para esto, se depositaron alícuotas de 1mL de cada solución y se colocaron en un tubo de ensayo. A cada tubo se le adicionaron 3 mL de una mezcla (1:5) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  +  $\text{HNO}_3$  y fueron calentados durante 2 horas a 100° C. Al enfriarse, las muestras fueron aforadas a 5 mL con agua ultrapura Milli Q.

El contenido de cadmio se determinó utilizando un equipo Varian Spectra AA 640 a una longitud de onda de 357.9 nm y usando una mezcla de aire/acetileno con un flujo de 13.5/4.5 L/min. Para las mediciones, se utilizó una lámpara de cátodo hueco que permite cuantificar plata, cadmio, plomo y zinc a longitudes de onda diferentes. La concentración de las muestras se obtuvo por interpolación en una curva estándar elaborada con 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm de una solución estándar comercial de cadmio (Sigma, México) (Lira-Silva *et al.*, 2011; Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

El cobre se midió a una longitud de onda de 300 nm y usando una mezcla de aire/acetileno con un flujo de 13.5/2.0 L/min. Para las mediciones, se utilizó una lámpara de cátodo hueco que permite cuantificar cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel y cobre a longitudes de onda diferentes. La concentración de las muestras se obtuvo por interpolación en una curva estándar elaborada con 1.0, 2.0 y 4.0 ppm de una solución estándar comercial de cobre para EAA (Sigma, México) (Lira-Silva *et al.*, 2011).

## 6.2. Medio de cultivo Greenblatt & Schiff modificado

La concentración de algunos minerales traza del medio de cultivo reportado por Greenblatt & Schiff (1959) para el crecimiento óptimo de *E. gracilis* fue modificada por Jasso-Chávez *et al.*, (2010) para disminuir la fuerza iónica del medio de cultivo. La composición química del medio de cultivo, tanto aerobio como anaerobio, fue igual a la reportada por Castañeda-Tamez (2014). Los componentes fueron disueltos en agua ultrapura (Milli Q) y el pH final 7.0 fue ajustado utilizando una solución saturada de NaOH (Tabla 3).

Tabla 3. Composición química del medio de cultivo Greenblatt & Schiff modificado (2010).

Componentes	Concentración
<b>Fuentes de carbono</b>	
Ácido glutámico (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> )	34 mM
Ácido málico (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> )	15 mM
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	177 mM
<b>Metales y minerales traza esenciales</b>	
Fosfato de amonio (NH <sub>4</sub> )PO <sub>4</sub>	0.75 mM
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	1 mM
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.92 mM
<b>Solución mineral A</b>	
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.24 mM
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	0.23 mM
Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O)	0.041 mM

Continuación Tabla 3.

<b>Solución mineral B</b>	
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.0033 mM
Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.0016 mM
<b>Otros componentes</b>	
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	0.2 mM
Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ )	3 mM
Tiamina (Vitamina B1)	0.3 mM
Cianocobalamina (Vitamina B12)	0.015 mM
Borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ )	-
Cisteína ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ )	1.6 mM
Sulfuro de sodio ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ )	0.2 mM
Resazurina ( $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{NNaO}_4$ )	1%

La resazurina se adicionó como un indicador de estado de óxido-reducción (Lira-Silva *et al.*, 2011) por lo tanto, el medio de cultivo es color rosa en presencia de oxígeno y el medio es incoloro en ausencia de oxígeno (Figura 6).



Figura 6. Medio de cultivo aerobio (izquierda) y anaerobio (derecha).

### 6.2.1. Medio de cultivo aerobio

Se colocaron 100 mL del medio de cultivo Greenblatt & Schiff (Tabla 3) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapa de rosca (Figura 6), después se esterilizó en autoclave a 1.5 Lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 45 min.

### 6.2.2. Medio de cultivo anaerobio

El medio de cultivo Greenblatt & Schiff (Tabla 3) se burbujeó durante 2 horas dentro de la cámara de anaerobiosis (COY laboratory products Inc., Michigan, USA), (Figura 7 A y B). El exceso de oxígeno disuelto en el agua se eliminó a través del intercambio de gases, debido a la mezcla de gases utilizada dentro de la cámara de anaerobiosis, (80% N, 15% CO<sub>2</sub> y 5% H<sub>2</sub>), donde el nitrógeno es la base para un ambiente anaerobio reducido, el dióxido de carbono es un componente necesario para el desarrollo del microorganismo y el hidrógeno en presencia de un catalizador de paladio, reacciona con el oxígeno que pudiera haber, formando agua, la cual será atrapada por la sílica gel, (todos estos gases son necesarios para obtener un cultivo anaerobio reducido), la cisteína (Cys) y el borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) se adicionaron en medio de cultivo para eliminar el oxígeno restante y el sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S) para generar un ambiente reductor. Posteriormente, 50 mL de medio de cultivo fueron vertidos en frascos tipo ampolleta sellados herméticamente con un tapón de goma y un arillo de metal (Figura 6) y se esterizaron en la autoclave a 1.5 Lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 45 min.

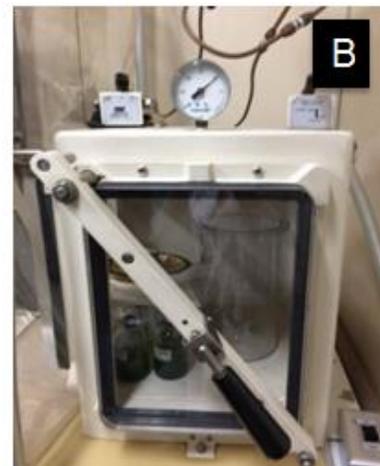


Figura 7. A) Cámara anaerobia y B) Compuerta anaerobia, modelo COY laboratory products; MI, USA.

### 6.3. Crecimiento celular y exposición a metales

Se utilizaron cultivos axénicos de *E. gracilis* Klebs fotoheterotrófica (Cepa Z-like), previamente cultivadas (1 año) en presencia de 1mM Fe<sup>3+</sup> + 2 mM Cr<sup>6+</sup>. Para evaluar el efecto del metal sobre el crecimiento celular, en matraces con medio aerobio y anaerobio se añadieron concentraciones diferentes de Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y su combinación a partir de soluciones calibradas de CdCl<sub>2</sub> y CuSO<sub>4</sub> (anaerobias y estériles). Todos los cultivos se iniciaron con un inóculo de 0.4 X10<sup>6</sup> cél/mL y fueron incubados durante 21 días, con un fotoperiodo de 12 horas (luz blanca de 60-70 μmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) a 25 ± 2 ° C. El metal o la combinación de metales se añadió al inicio de la curva de crecimiento celular (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

El crecimiento celular se determinó tomando alícuotas del medio de cultivo cada 2 días durante 21 días, en condiciones de esterilidad y con una jeringa hipodérmica, se tomó 1 mL del cultivo celular y se colocó en un tubo de microcentrífuga. Después, en condiciones de no esterilidad, se realizó una dilución 1:10 ó 1:50 (dependiendo del aspecto de la muestra) en un tubo de ensayo de 10X100 mm que contenía agua destilada, 0.1% de HCl (para evitar la motilidad de las células) y 0.05% de azul de tripano. Las células fueron contadas con un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) en un microscopio óptico. El azul tripano es un indicador de viabilidad celular debido a que se introduce a las células cuando estas están muertas y las tiñe de color azul. Si las células están vivas (viables) no se tiñen (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

### 6.4. Cosecha de células

Las células fueron cosechadas al tiempo final (21 días) por centrifugación a 3,800 x g durante 10 min a 4°C. En el sobrenadante (medio de cultivo sin células) se midió el pH final, la concentración remanente de las fuentes de carbono (glutamato, malato y etanol) y la cantidad de metal pesado no removido. El botón de células se resuspendió con 50 mL de una solución amortiguadora con 50 mM Tris + 1 mM EGTA pH7.5 (Buffer TE) y centrifugado nuevamente a 3,800 x g durante 10 min. Se tomó 1mL del sobrenadante para determinar la cantidad de metal pesado adsorbido (presente en el lavado). El botón de células se resuspendió con la solución TE y se llevó a un volumen final de 2 mL. La

mitad (1 mL) fue utilizado para medir la cantidad de metal acumulado y la otra mitad fue almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, con 0.5 mM de DTT (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

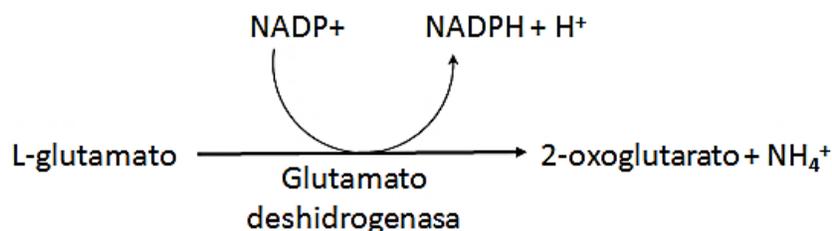
## 6.5. Cuantificación de las fuentes de carbono

Se determinó la concentración inicial y final de las fuentes de carbono (glutamato, malato y etanol) por métodos enzimáticos y por cromatografía de gases. Para esto, se tomaron alícuotas de 1 mL del medio de cultivo con y sin metales de ambas condiciones experimentales (aerobia y anaerobia), después fueron centrifugadas a  $3,800 \times g$  durante 5 min y el sobrenadante fue utilizado para la determinación (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

### 6.5.1. Glutamato

La concentración de glutamato se cuantificó a través de un ensayo enzimático, siguiendo la producción de NADPH a 340 nm en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Agilent, Santa Clara, CA, USA) en celdas de cuarzo. La celda de reacción incluyó: 1 mM  $\text{NADP}^+$ , 3 mM  $\text{ADP-MgCl}_2$  para acelerar la reacción, 7  $\mu\text{L}$  de la muestra (sobrenadante) y 3 Unidades de glutamato deshidrogenasa comercial (SIGMA, St Louis, MO, USA). El volumen final de reacción fue de 2 mL y se utilizó una solución amortiguadora con 150 mM-400 mM Tris- Hidracina a pH 9.0 y  $37^{\circ}\text{C}$  (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

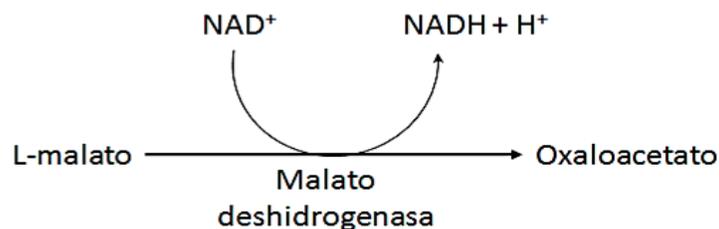
En este sistema, la glutamato deshidrogenasa cataliza la oxidación del L- glutamato a 2-oxoglutarato en presencia de  $\text{NADP}^+$  generando NADPH, el cual absorbe a 340 nm, como se muestra en la siguiente reacción:



### 6.5.2. Malato

La concentración de malato se cuantificó a través de un ensayo enzimático, siguiendo la formación del NADH a 340 nm en celdas de cuarzo. La mezcla de reacción incluyó: 1mM NAD<sup>+</sup>, 7 µL de la muestra (sobrenadante) y 3 Unidades de malato deshidrogenasa comercial (SIGMA, St Louis, MO, USA). El volumen final de reacción fue de 2 mL y se utilizó una solución amortiguadora con Hidracina 500 mM y Glicina 400 mM a pH 9.0 y 37°C (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

En este sistema, la malato deshidrogenasa cataliza la oxidación del L-malato a oxaloacetato en presencia de NAD<sup>+</sup>, generando NADH el cual también absorbe a 340 nm, como se observa en la siguiente reacción:



El equilibrio de esta reacción está desplazado en gran medida hacia la izquierda bajo condiciones termodinámicas estándar, pero mediante la remoción de los productos de la reacción (oxaloacetato que reacciona con la hidracina y produce una hidrazona) puede favorecerse la formación de NADH, además se utilizó un medio alcalino para disminuir la concentración de H<sup>+</sup>.

### 6.5.3. Etanol

La determinación del consumo de etanol se realizó mediante cromatografía de gases (Yoval-Sánchez *et al.*, 2011) en un Cromatógrafo Shimadzu modelo GC-2010, el cual cuenta con una columna capilar HP-Plot de 30 m de largo y 0.32 mm de diámetro interno (Agilent Technologies, USA) y un detector de ionización de flama (FID). La muestra fue tomada al inicio y al final del cultivo, después se centrifugó a 3,800 x g durante 5 min y fue filtrada utilizando un filtro con una apertura de 0.45 µm Millex™ para eliminar las impurezas. En el cromatógrafo se inyectaron 2 µL de la muestra utilizando una microjeringa Hamilton® de 10 µL de capacidad. Las condiciones del equipo fueron: temperatura de la columna 180°C, 75 kPa de presión, flujo de columna 1.03 mL/min, flujo

de H<sub>2</sub> 40.0 mL/min, flujo de aire 400.0, mL/min y flujo total de 107.5 mL/min. La cantidad de etanol fue determinada utilizando el valor del área bajo la curva del pico de etanol mostrado en el cromatograma se realizó una curva estándar y el valor final es el % de consumo.

## **6.6 Fotosíntesis y respiración**

Los parámetros fueron medidos con un Oxímetro, con un electrodo de oxígeno tipo Clark (YSI, modelo 53). En la celda de reacción se adicionó 1 mL de células en suspensión y 700 µL de buffer KME pH 7.2 saturado con aire e incubado a 25° C. La medición de la fotosíntesis (producción de oxígeno) se realizó a partir de la aplicación de un estímulo de luz actínica (1,000 µmol quanta m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) que iluminó a la suspensión celular durante aproximadamente 5-6 minutos. El estímulo de la luz fue detenido cuando la concentración del oxígeno disuelto llegó al 90-95% de la escala de medición. La velocidad de respiración (consumo de oxígeno) fue medida durante 5-6 minutos. Posteriormente, se adicionaron 2.2 mM de TMPD como sustrato artificial oxidable para la reducción de Cyt-c para determinar la actividad de la Cyt-c oxidasa. Minutos después, se adicionaron 0.02 mM de azida de sodio para inhibir la citocromo c oxidasa o complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial (el consumo remanente se atribuye a la actividad de oxidasa alterna). Asimismo, se adicionaron 5.8 mM de n-propilgalato para inhibir la actividad de la oxidasa alterna (Santiago-Martínez *et al.*, 2015). La concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el medio en la celda es de 200 µM a 25°C (Jasso-Chávez *et al.*, 2010).

## **6.7. Cuantificación de metales por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA)**

Para la determinación del metal acumulado y adsorbido se utilizaron las células cosechadas y los sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación (lavado). Las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo de vidrio de 15 X 150 mm a los que se les agregó una mezcla de ácidos en un volumen 3:1 (2.5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.5 mL HNO<sub>3</sub>) y fueron calentadas a 90°C durante 12-24 h (hasta eliminar la materia orgánica por completo) en un digestor analógico. Al enfriarse, las muestras fueron utilizadas para la medición del cadmio y cobre en el equipo de EAA Varian Spectra AA 640 como se describió en el apartado 6.1 (Lira-Silva *et al.*, 2011; Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

## **6.8. Cuantificación de TBARS**

El contenido de TBARS se determinó a través de la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA). En tubos de vidrio, a cada muestra se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de butilhidroxitolueno (BHT) y se llevaron a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  con agua Milli Q. Después se agregó 1 mL de buffer de fosfatos a pH 7.0, previamente calentado a 37°C y las muestras se mezclaron y se incubaron durante 15-20 minutos a 37°C. Posteriormente, a las muestras se les agregó 1.5 mL de TBA y 1 mL de ácido acético al 20 %, se mezclaron y calentaron en un baño de agua en ebullición durante 45 minutos. Las muestras fueron enfriadas en hielo y se les agregó 1 mL de KCl al 2% y 4 mL de butanol, se mezclaron y se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min. La fase orgánica (sobrenadante) de cada muestra se extrajo y se midió a 532 nm en celdas de cuarzo, y se realizó una curva estándar utilizando 50, 100, 250, 500 1000, 3000 pmol de tetraetoxipropano (TEP) para determinar el contenido de TBARS por interpolación. (Ramos-Martínez *et al.*, 2009)

## **6.9. Extracción de clorofila**

La extracción de clorofila se realizó a partir de la técnica de Arnon (1948) utilizando 1 mL de cada muestra de cultivos aerobios y anaerobios (previamente cosechados y guardados a -70°C). Las muestras (500 $\mu\text{L}$  c/u) fueron colocadas en tubos para centrífuga con tapón de rosca y centrifugadas a 15,000 x g durante 5 min en una microcentrífuga marca Bekman Coulter® modelo 16. El sobrenadante se desechó inmediatamente y el botón (células centrifugadas) se resuspendió en 1.5 mL de acetona al 80% y se centrifugó nuevamente a 15,000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante que contenía la clorofila fue desechado y el botón (células centrifugadas) fue utilizado para la cuantificación de polifosfato y fosfato libre.

## **6.10. Cuantificación de polifosfato y fosfato libre**

El botón de las células a las cuales se realizó la extracción de clorofilas se resuspendió con 200  $\mu\text{L}$  de agua Milli Q en tubos para centrífuga con tapón de rosca y se le adicionó

ácido perclórico frío (PCA) al 3% (v/v). La mezcla se homogeneizó en un vórtex e inmediatamente se puso a calentar en un baño de agua en ebullición durante 2 h. Después los tubos fueron enfriados en hielo y centrifugados en una microcentrífuga a 15,000 x g durante 5 min. Se tomaron alícuotas del sobrenadante de las células aerobias (25-50  $\mu$ L) y de las células anaerobias (50-100  $\mu$ L) y se colocaron en tubos de ensayo de 13 X 100 mm. Cada muestra fue aforada a 1mL (volumen final) con agua Milli Q y se homogeneizó con agitación fuerte en un vórtex. Posteriormente, a cada tubo se le adicionó 1 mL del reactivo A (Acetato de cobre pH 4: Sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) al 0.25% y acetato de sodio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) al 4.6%, en 2N de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )) y 2 mL de agua Milli Q. La mezcla se homogeneizó en vórtex y después se le adicionó 0.5mL de reactivo B (heptamolibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) al 5%). La mezcla se homogeneizó en vórtex y se le adicionó 0.5 mL de reactivo C (Metol ( $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$ ) al 2% y bisulfito de sodio ( $\text{NaHSO}_3$ ) al 5%), nuevamente se homogeneizó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, las muestras fueron medidas espectrofotométricamente a 870 nm en celdas de plástico. Debido a este tratamiento, el polifosfato fue cuantificado con la formación del azul de molibdeno (Lira-Silva, 2013).

De igual manera se cuantificó el fosfato libre extracelular al inicio y al final de cada cultivo en ambas condiciones. Para esto, se tomaron 100  $\mu$ L de medio de cultivo aerobio y 100  $\mu$ L de medio de cultivo anaerobio (sobrenadante), previamente centrifugados a 15,000 x g durante 5 min (para eliminar restos celulares) y se colocaron en tubos de ensayo de 13 X 100 mm. Cada muestra se llevo a un volumen final de 1mL con agua Milli Q, luego se le adicionó 1 mL del reactivo A y 2 mL de agua Milli Q. La mezcla se homogeneizó mediante agitación fuerte en vórtex, se le adicionó 0.5 mL del reactivo B, se homogeneizó y se adicionó 0.5 mL de reactivo C. La mezcla fue homogeneizada e incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, las muestras fueron medidas espectrofotométricamente a 870 nm en celdas de plástico. Se elaboró una curva estándar utilizando 0, 25, 50, 100, 200, 400 y 800 nmol de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma ACS Reagent) para la determinación del contenido de fosfato de las muestras por interpolación de los valores (Lira-Silva, 2013).

## 6.11. Formación de biopelícula

Se utilizaron 2 microplacas de 96 pozos con fondo redondo. La primera placa fue para las células en condiciones aerobias y la segunda para las células en condiciones anaerobias, esta última se colocó dentro de una jarra anaerobia (modelo IQ BBL, System GasPak®, USA) herméticamente cerrada. Ambas placas fueron guardadas en una cámara de fotosíntesis para mantener constantes las condiciones de crecimiento (temperatura y ciclos de luz-obscuridad). En cada pozo se colocó por triplicado las muestras control y las células con la combinación de metales a diferentes concentraciones (Figura 8). Al inicio del experimento, en cada pozo se colocó  $0.4 \times 10^6$  células y los pozos que no contenían células, se les adicionó 300  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. La microplaca se dejó en la cámara de fotosíntesis durante una semana (Lira-Silva, 2013).

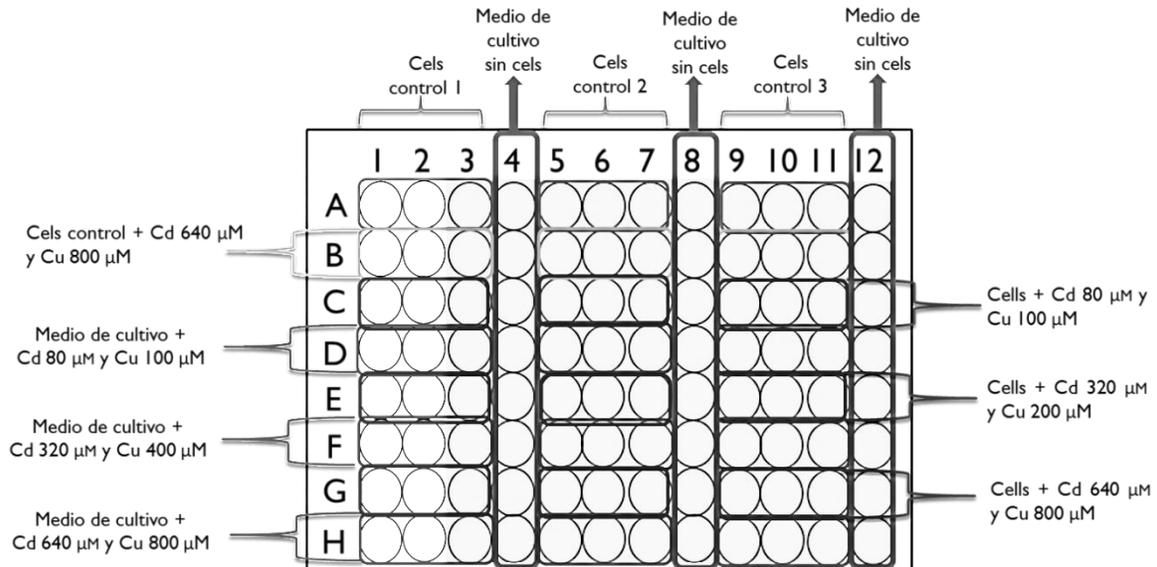


Figura 8. Contenido y posición de células en la microplaca de 96 pozos.

Una vez pasado este periodo, se tomó una muestra para contar las células con un hemocitómetro. El contenido de los pozos se retiró por completo agitando con fuerza 2-3 veces e inmediatamente se agregó cristal violeta al 1% en cada uno de los pozos y se dejó reposar durante 1 hora. El cristal violeta se retiró agitando con fuerza y la microplaca fue enjuagada con etanol al 70% 2 veces. Después, en cada pozo se añadió 0.3 mL de etanol al 70% y se dejó reposar 1.5 horas. Posteriormente, midió la formación de biopelícula utilizando un lector de absorbancia de microplacas (Bio-Rad modelo iMark) a

595 nm. Finalmente la formación de biopelícula de las diferentes condiciones, fueron comparadas con la formación de biopelícula de las células control de cada condición respectivamente (Lira-Silva, 2013).

### **6.12. Muestras de agua residual**

Se tomaron muestras de agua residual del río “Los Cuartos” cercano a una zona conurbada, en Naucalpan, Estado de México, y se guardaron a -20°C hasta su uso. Después se descongeló la muestra del río y en matraces Erlenmeyer de 150 mL y frascos tipo ampollita sellados con tapón y arillo de metal, en condiciones aerobias se les adicionó 30 mL de agua Milli Q y enseguida se esterilizaron. Una vez que estuviesen estériles los frascos y matraces, se les añadieron 15 mL de la muestra de agua residual, utilizando un filtro con una apertura de poro de 0.2 µm, para evitar el paso de otros microorganismos, y finalmente se añadieron 5 mL de células, para evitar que el contenido de las muestras de agua residual se diluyera, (se utilizó el mismo volumen en condiciones aerobias y anaerobias), posteriormente se añadieron células control anaerobias y células anaerobias pre-adaptadas a metal (80 µM Cd<sup>2+</sup> + 100 µM Cu<sup>2+</sup>) por separado y dependiendo del experimento se determinó el crecimiento celular y se cuantificó el Cd<sup>2+</sup> de cada muestra.

## **7. RESULTADOS**

Con base en el diagrama de la figura 5, se realizó el análisis estadístico *t-Student* para muestras independientes o no pareadas, en todos los resultados de este trabajo pero únicamente se muestran aquellos donde hubo diferencias significativas. Los valores de *t*, se muestran en el Anexo1, así como la tabla de *t-Student* utilizada (Anexo 2) al final de la tesis.

### 7.1. “Maximal Inhibitory Concentration” (IC<sub>90</sub>) de cadmio y cobre en condiciones aerobias y anaerobias

A continuación se muestran las IC<sub>90</sub> de cadmio y cobre de manera individual, en ambas condiciones con la finalidad de conocer a que concentración de metal disminuye el 90% de la población de células, por medio de conteos en un hemocitómetro al tiempo final (21 días), todos los experimentos iniciaron con diferentes concentraciones de metal por separado y enseguida se añadieron 0.4X10<sup>6</sup> cél/mL de células control. Cabe mencionar que el cálculo de la IC<sub>90</sub>, a partir de la ecuación de decaimiento exponencial, de primer orden, no se realizó debido a que los experimentos no se ajustaron a la ecuación.

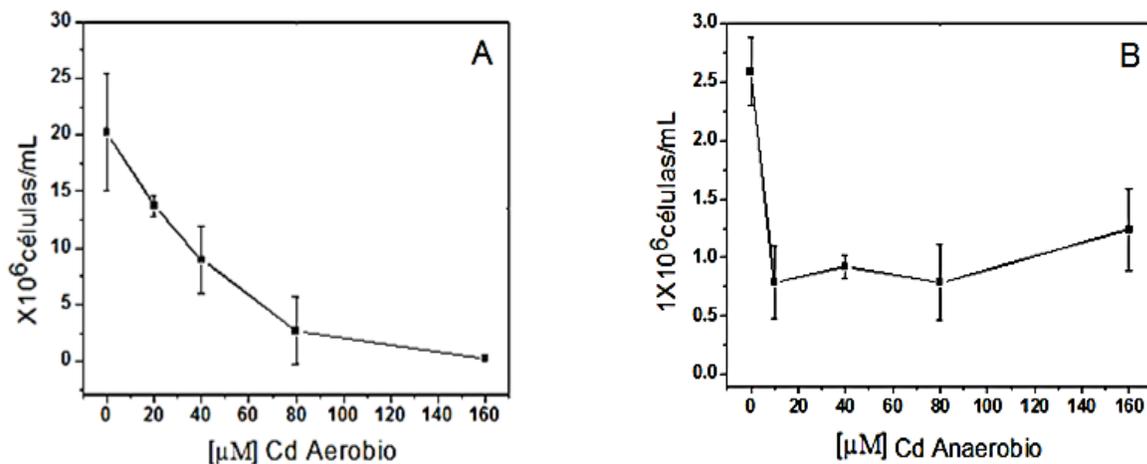


Figura 9 A. Efecto del cadmio sobre el crecimiento celular en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B). La densidad celular se determinó a los 21 días de cultivo. El valor de los datos es la media ± desviación estándar de 3 experimentos.

En la figura 9 A en condiciones aerobias tanto la densidad celular como la viabilidad disminuyeron conforme se aumentó la concentración de Cd<sup>2+</sup> se observó que a 160 μM Cd<sup>2+</sup> fue la concentración más tóxica debido a que no hubo crecimiento celular y la viabilidad fue cero. Por su parte, en condiciones anaerobias el Cd<sup>2+</sup> a la concentración de 10 μM disminuyó la densidad celular con respecto al control, sin embargo la concentración más tóxica fue 80 μM, no obstante a concentraciones mayores (160 μM Cd<sup>2+</sup>) la densidad celular aumentó y la viabilidad se mantuvo en un 90 %. Por lo tanto, la IC<sub>90</sub> para Cd<sup>2+</sup> fue de 160 μM y 80 μM en condiciones aerobias y anaerobias respectivamente.

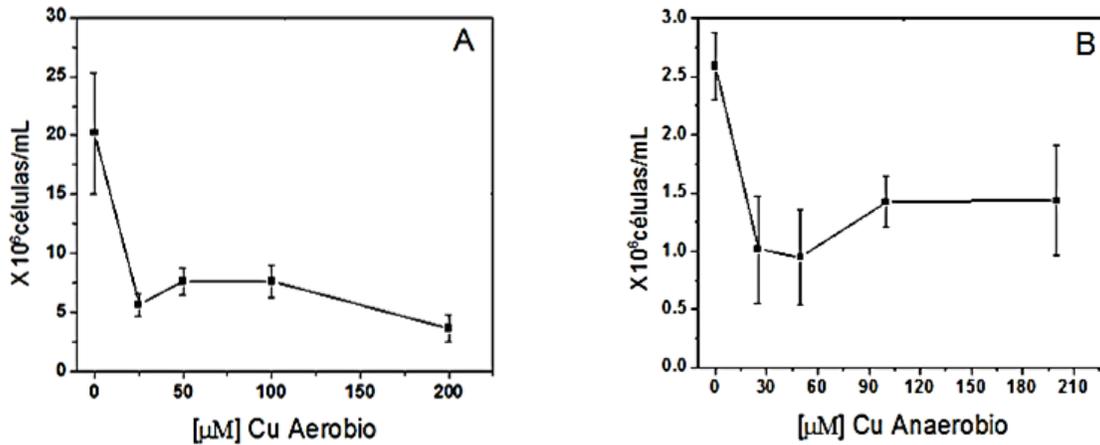


Figura 9 B. Efecto del cobre sobre la duplicación celular en condiciones aerobias (A) y anaerobias (B) La densidad celular se determinó a los 21 días de cultivo. El valor de los datos es la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos.

En la figura 9 B el  $\text{Cu}^{2+}$  en condiciones aerobias a concentraciones bajas ( $25 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) fue tóxico debido a que la densidad celular fue menor a las células control, pero a concentraciones de ( $50$  y  $100 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) la densidad celular aumentó ligeramente, sin embargo a  $200 \mu\text{M Cu}^{2+}$  resultó tóxico para las células y la densidad celular disminuyó, a pesar de ello en todas las concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  la viabilidad se mantuvo en un  $99 \pm 0.5 \%$ . Por otra parte, en condiciones anaerobias el  $\text{Cu}^{2+}$  a concentraciones menores a  $50 \mu\text{M}$ , la densidad celular disminuyó con respecto al control, siendo la concentración de  $50 \mu\text{M Cu}^{2+}$  la más tóxica, y a concentraciones mayores ( $100$  y  $200 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) la densidad celular fue la mitad de la densidad celular de las células control, a pesar de ello en todas las concentraciones de cobre la viabilidad se mantuvo en un  $94 \pm 5 \%$ . Por lo tanto, la  $\text{IC}_{90}$  para el  $\text{Cu}^{2+}$  fue de  $200 \mu\text{M}$  y  $50 \mu\text{M}$  en condiciones aerobias y anaerobias respectivamente.

El  $\text{Cu}^{2+}$  resultó ser más tóxico (Figura 9 B) que el  $\text{Cd}^{2+}$  (Figura 9 A) a concentraciones bajas cuando son inoculados por separado en el medio de cultivo, no obstante, cuando el  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  estuvieron en combinación, resultó ser menos tóxico a concentraciones altas y sin afectar la viabilidad en condiciones anaerobias.

## 7.2. Efecto de $\text{Cd}^{2+}$ + $\text{Cu}^{2+}$ sobre el crecimiento celular en condiciones aerobias y anaerobias

*Euglena gracilis* fue capaz de crecer y sobrevivir en el medio de cultivo aerobio en presencia de glutamato, malato y etanol como fuentes de carbono (Medio GME) a pH de 7.0 en ambas condiciones de cultivo (Figura 10 y 11).

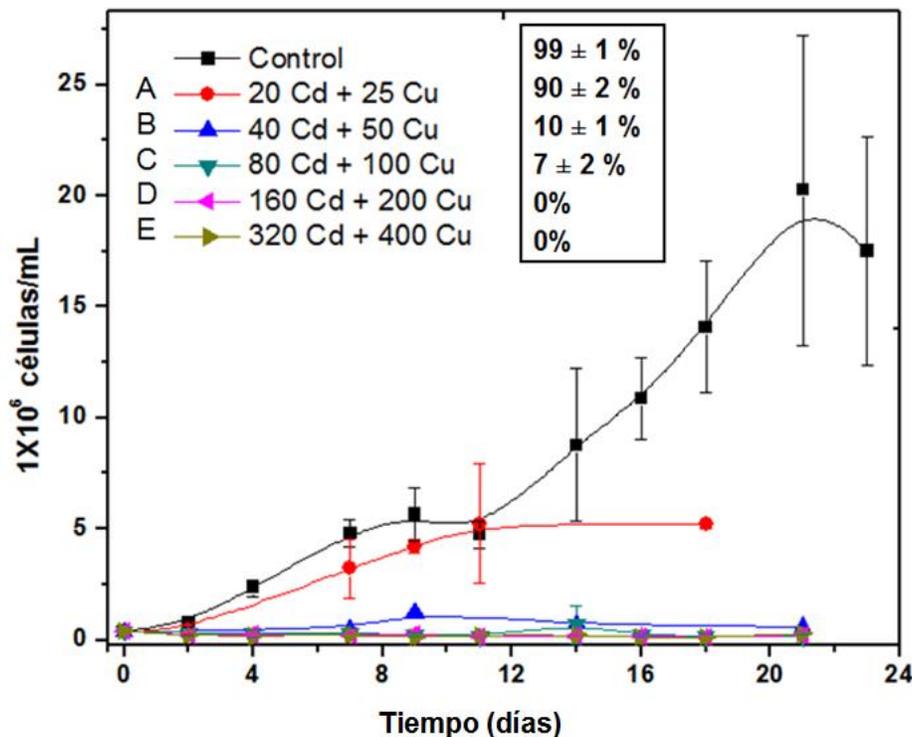


Figura 10. Curva de crecimiento de *E. gracilis* en condiciones aerobias, expuesta a concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ) de cadmio y cobre. El recuadro indica el porcentaje de viabilidad. Los puntos en el gráfico son la media  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. *t-Student* (realizada al día 18) <sup>A, C, D, E</sup> vs control,  $P < 0.001$  y <sup>B</sup> vs control  $P < 0.0005$ .

Las células control (sin metales) alcanzaron una densidad celular de  $20 \times 10^6$  cél/mL después de 21 días de cultivo, mientras que las células que se cultivaron en presencia de la combinación de metales ( $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$  +  $25 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) alcanzaron una densidad celular de  $5 \times 10^6$  cél/mL después de 18 días de cultivo. En presencia de  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$  +  $50 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , las células se duplicaron al menos una vez ( $0.8 \times 10^6$  cél/mL) y en células expuestas a concentraciones mayores a  $80 \mu\text{M Cd}^{2+}$  +  $100 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , no hubo crecimiento celular, disminuyó el % de viabilidad (Figura 10) y el pH final aumentó a  $7.9 \pm 0.2$  ( $n=3$ ).

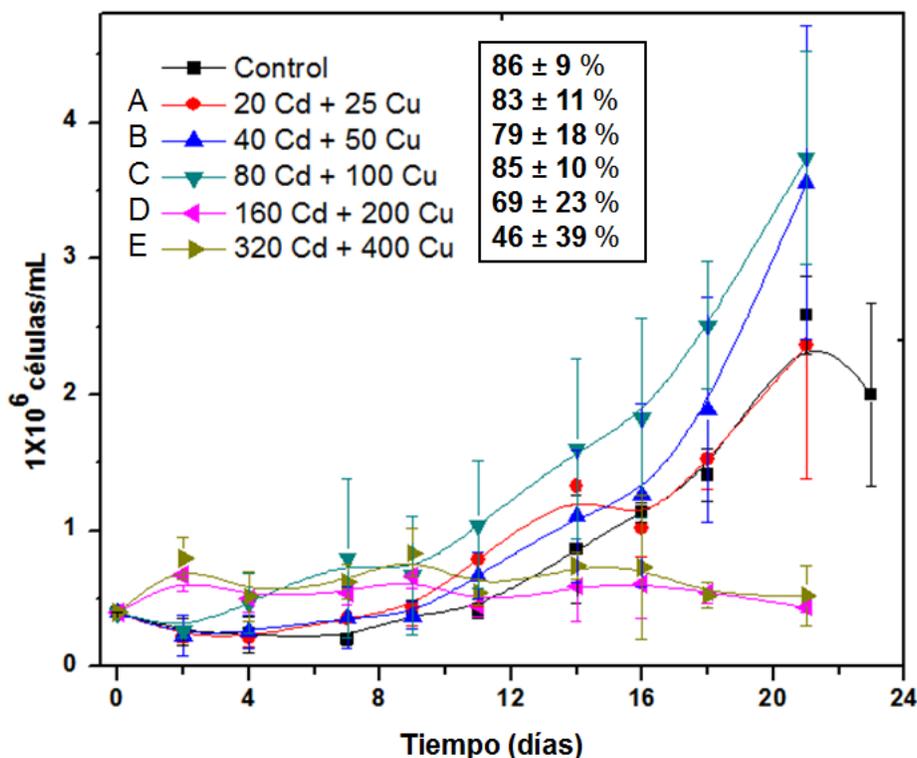


Figura 11. Curva de crecimiento de *E. gracilis* en condiciones anaerobias, expuesta a concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ) de cadmio y cobre. El recuadro indica el porcentaje de viabilidad. Los puntos en el gráfico son la media  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. *t-Student* (realizada al día 18) <sup>A, D, E</sup> vs control,  $P < 0.005$  y <sup>B</sup> vs control  $P > 0.10$ , <sup>C</sup> vs control  $P < 0.30$ .

En condiciones anaerobias *E. gracilis* fue capaz de duplicarse hasta  $2 \times 10^6$  cél/mL tanto en células control (sin metales) como en células expuestas a  $20 \mu\text{M Cd}^{2+} + 25 \mu\text{M Cu}^{2+}$  (Figura 11). No obstante, cuando las células fueron cultivadas en concentraciones altas de metales la densidad celular incrementó, inclusive más que las células control. Las células cultivadas en  $40 \mu\text{M Cd}^{2+} + 50 \mu\text{M Cu}^{2+}$  tuvieron una densidad celular final de  $3.5 \times 10^6$  cél/mL y a  $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$  una densidad celular de  $3.7 \times 10^6$  cél/mL, el pH final fue de  $6.5 \pm 0.1$  ( $n=3$ ). Se utilizó la condición  $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$  como la ideal para realizar los experimentos subsecuentes (Figura 11).

Aun cuando las células fueron cultivadas a concentraciones mayores ( $160 \mu\text{M Cd}^{2+} + 200 \mu\text{M Cu}^{2+}$  y  $320 \mu\text{M Cd}^{2+} + 400 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) la densidad celular se mantuvo similar a la inicial ( $0.4 \times 10^6$  cél/mL), es decir, no hubo crecimiento celular aunque el 50% de las

células se mantuvieron viables. Los resultados mostraron claramente que la condición de anaerobiosis redujo la toxicidad de la combinación de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 11 y 12 C).



Figura 12. A) *E. gracilis* vista a 40X en Microscopio óptico en condiciones aerobias. B) Cultivos de *E. gracilis* en condiciones aerobias (Izquierda) y anaerobias (Derecha). C) *E. gracilis* vista a 40X en Microscopio óptico en condiciones anaerobias.

En la figura 12 sección A se observaron células con un daño provocado por la exposición a la combinación de metales (principalmente clorosis) en condiciones aerobias a los 16 días de cultivo, en la sección C, se muestran células expuestas a las mismas concentraciones de metales pero en condiciones de anaerobiosis, donde se determinó que las células no presentaron un daño, ya que no estaban teñidas con el colorante vital azul tripano (Figura 12 y 14) y su morfología fue similar a las células control. Este efecto también se observó en los cultivos mostrados en la sección B (Figura 12), donde las células aerobias (izquierda) mostraron menor coloración que las células anaerobias (Derecha).

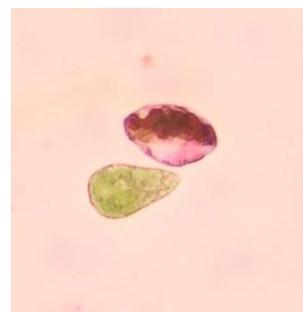
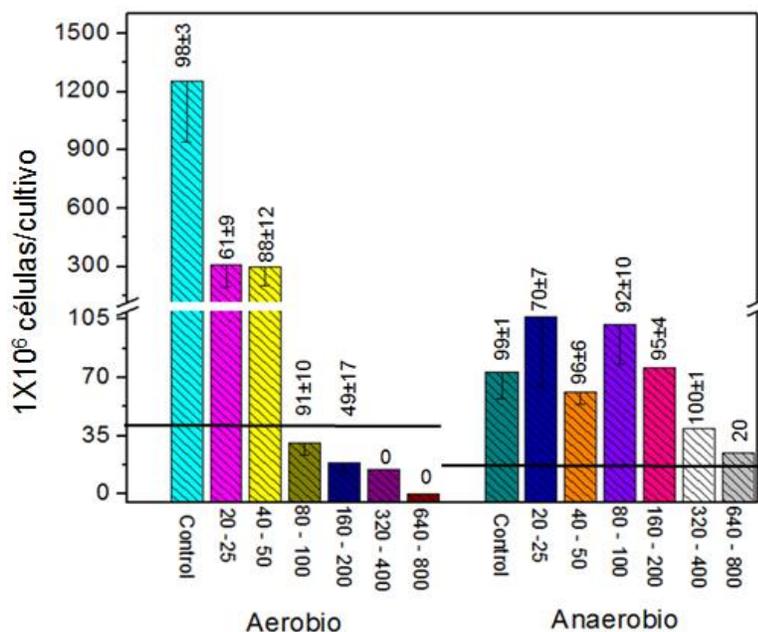


Figura 14. Se observa a 40X una célula viable (verde) de la no viable (morado).

Figura 13. Densidad celular y viabilidad por cultivo, de células aerobias y anaerobias a los 16 días de exposición a metales, el tiempo inicial de todos los cultivos fue de  $0.4 \times 10^6$  cél/mL. Los datos en el gráfico son la media  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. Los números sobre las barras son la media de la viabilidad  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. La línea horizontal representa el total de células al inicio del cultivo.

En la figura 13 se muestra que la combinación de metales ( $\text{Cd}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ ) aumentó la toxicidad en células aerobias que en células anaerobias a los 16 días de cultivo, porque coincide que tanto en condiciones aerobias como anaerobias estuvieron en fase exponencial (Figura 10 y 11). La densidad y la viabilidad de células aerobias disminuyeron cuando la concentración de metales aumentó. En condiciones de anaerobiosis, la combinación de metales fue menos tóxica, ya que se alcanzó una densidad celular menor que en condiciones aerobias, la viabilidad se mantuvo mayor al 90%, con excepción a la concentración más alta ( $640 \mu\text{M Cd}^{2+} + 800 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ).

### 7.3. Consumo de glutamato, malato y etanol como fuente de carbono

En cuanto a las fuentes de carbono, el malato fue el sustrato que más se consumió (>80%) en todas las condiciones experimentales, seguido por el glutamato, que se consumió en todas las condiciones entre el 25 y 50 %, mientras que en condiciones

aerobias el etanol se consumió casi en su totalidad (>90%), caso contrario en anaerobiosis donde no se consumió (Figura 15).

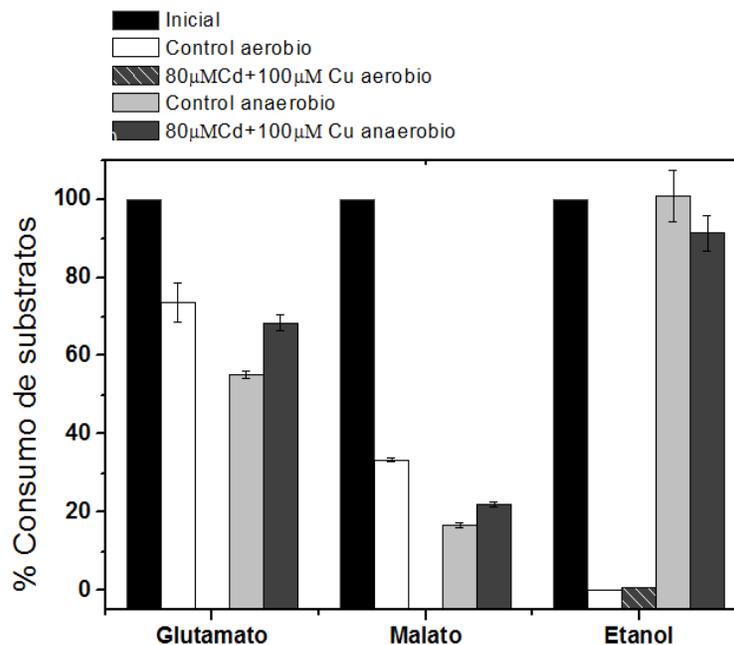


Figura 15. Glutamato, malato y etanol remanente en el medio de cultivo aerobio y anaerobio. Los datos mostrados están normalizados respecto al tiempo inicial (100%= 38 ± 2 mM de glutamato, 16.8 ± 2.2 mM de malato, 170 mM de etanol) y representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

#### 7.4. Efecto de la combinación de metales Cd<sup>2+</sup> + Cu<sup>2+</sup> sobre la fotosíntesis y la respiración

En condiciones aerobias la respiración celular, fotosíntesis, la actividad del complejo IV Cyt-c oxidasa (TMPD oxidasa) y la actividad de la oxidasa alterna (AOX) aumentaron en presencia de la combinación de metales con respecto al control. En condiciones anaerobias se determinó que la respiración de células en presencia de metales se mantuvo similar a las células control y la actividad fotosintética disminuyó con respecto a la condición control (sin metal), mientras que la actividad del complejo Cyt-c y de la oxidasa alterna se mantuvo muy similar al control (Tabla 4).

Tabla 4. Fotosíntesis y respiración de *E. gracilis* fotosintética cultivada en ausencia y presencia de 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  + 25  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

	Aerobio		Anaerobio	
	Control	+ Cd-Cu	Control	+ Cd-Cu
	nat g O/min X 10 <sup>7</sup> células			
Respiración	135 $\pm$ 25	142 $\pm$ 41	120 $\pm$ 22	113 $\pm$ 46
Fotosíntesis	120 $\pm$ 1	305 $\pm$ 74	160 $\pm$ 54	31 $\pm$ 13
TMPD ox	180 $\pm$ 21	454 $\pm$ 60	160 $\pm$ 48	158 $\pm$ 35
AOX	14 $\pm$ 2 (10%)	62 $\pm$ 28 (43%)	18 $\pm$ 8 (15%)	16 $\pm$ 6 (14%)

### 7.5. Remoción de $\text{Cd}^{2+}$ y $\text{Cu}^{2+}$ en condiciones aerobias y anaerobias

Para la determinación de la remoción total de cada metal se midió una fracción del remanente del medio de cultivo (sobrenadante), el metal adsorbido (lavado con buffer TE) y el metal acumulado en el botón de células. A continuación se muestran los resultados obtenidos (Figura 16):

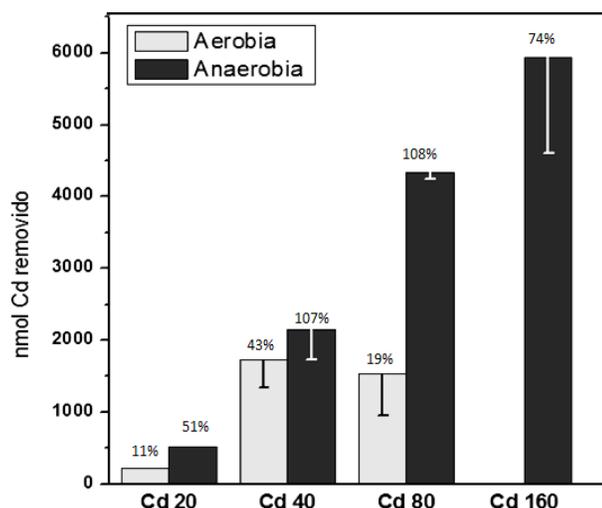


Figura 16. Remoción de cadmio a diferentes concentraciones en el medio de cultivo, en condiciones aerobias y anaerobias. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. Los porcentajes indican la remoción por cultivo. Unidades:  $\mu\text{M}$ .

En condiciones anaerobias hubo mayor remoción de  $\text{Cd}^{2+}$ . En la condición aerobia con 160  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  no se determinó la remoción debido a la baja viabilidad celular. La acumulación intracelular de  $\text{Cd}^{2+}$  fue el principal mecanismo de remoción, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, seguido por la adsorción (metal pegado a la

membrana celular); sin embargo, en las células anaerobias expuestas a 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , la adsorción es el principal mecanismo de remoción (Figura 17).

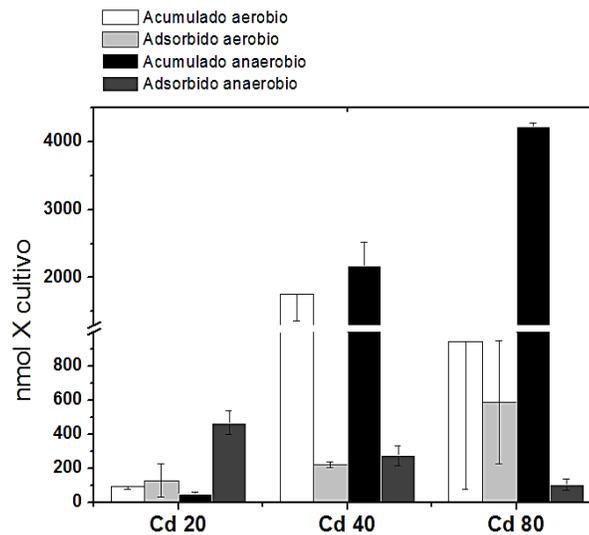


Figura 17. Acumulación y adsorción de cadmio por *E. gracilis*, en condiciones aerobias y anaerobias. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. Unidades:  $\mu\text{M}$ .

En células expuestas a 25  $\mu\text{M}$ , el  $\text{Cu}^{2+}$  fue mayormente removido en condiciones aerobias, mientras que a 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  el  $\text{Cu}^{2+}$  fue removido en mayor proporción en la condición anaerobia y finalmente a 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  fue más tóxico para las células aerobias (Figura 18).

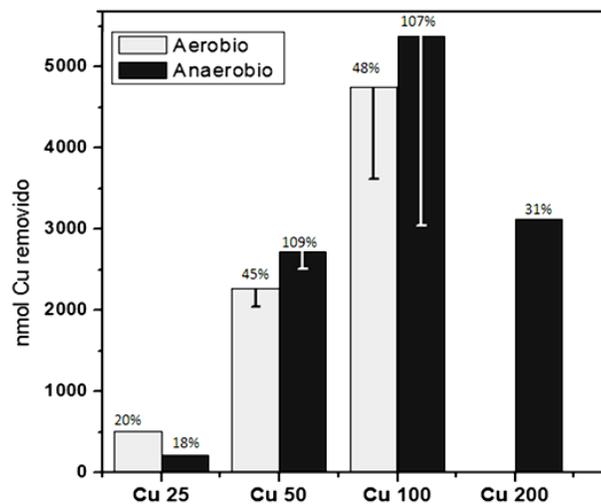


Figura 18. Remoción de Cobre en el medio de cultivo por *E. gracilis*, en condiciones aerobias y anaerobias. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. Unidades:  $\mu\text{M}$ . Los porcentajes indican la remoción por cultivo.

En la figura 19 se muestra que la acumulación fue el principal mecanismo de remoción, tanto en condiciones aerobias y anaerobias. En la concentración de 25  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  hay una

acumulación mayor en condiciones aerobias, pero sucediendo lo contrario en células anaerobias, donde la adsorción es el principal mecanismo de remoción.

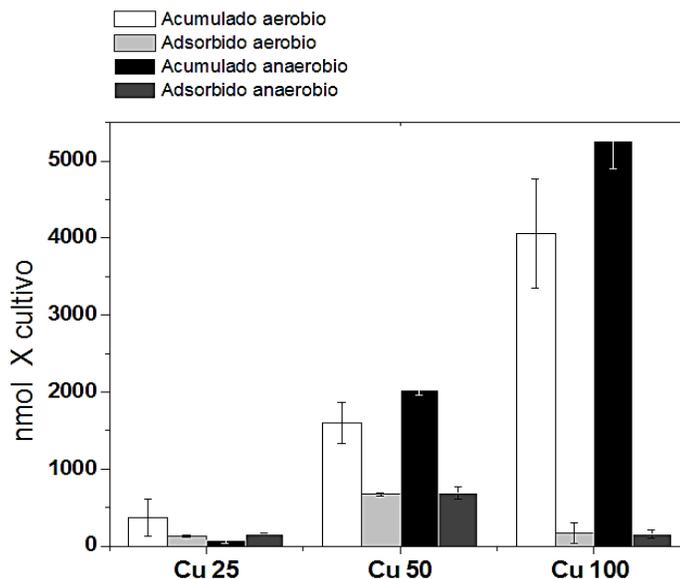


Figura 19. Acumulación y adsorción de cobre por *E. gracilis*, en condiciones aerobias y anaerobias. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3-5 experimentos independientes. Unidades: micromolar ( $\mu\text{M}$ ).

Estos resultados indicaron que la remoción en condiciones aerobias es principalmente por acumulación a diferentes concentraciones, mientras que en condiciones anaerobias la remoción por adsorción es mayor a concentraciones de  $<20 \mu\text{M Cd}^{2+}$  y  $<25 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , y por acumulación en concentraciones  $>40 \mu\text{M Cd}^{2+}$  y  $>50 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , además fue claro que en altas concentraciones de metales tuvieron un efecto tóxico solo en condiciones aerobias, pero no en las anaerobias.

### 7.6. Cuantificación de TBARS en condiciones aerobias y anaerobias

Por lo anterior, se determinó si el estrés oxidante ocasionado por la presencia de metales pesados estaba causando daño en las células de ambas condiciones de cultivo, así que se cuantificó el contenido intracelular de MDA, como marcador de la degradación oxidativa de membranas, ocasionada por estrés oxidante y cuantificado mediante el método de TBARS. Los resultados mostraron que el contenido de TBARS en cultivos de 21 días fue muy similar en todas las condiciones experimentales, control aerobio, control anaerobio y anaerobio con  $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$  siendo  $0.15 \pm 0.11$ ,  $0.19 \pm 0.03$  y

$0.19 \pm 0.04 \text{ nmol } (10^7 \text{ cels})^{-1}$  respectivamente. Esto sugirió que *E. gracilis* fue capaz de resistir ambos metales en condiciones anaerobias y a concentraciones mayores durante más tiempo, en comparación con otros organismos como las microalgas, sin presentar daños morfológicos y metabólicos, como ocurre en la condición aerobia expuesta a la mezcla de metales ( $\text{Cd}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ ), o tal vez otros mecanismos de resistencia estén actuando para contender con la presencia de metales pesados.

### 7.7. Síntesis de polifosfato en condiciones anaerobias

La síntesis de polyP es uno de los mecanismos de resistencia que pudieran estar involucrados en la resistencia a metales pesados, cuando éstos se acumularon intracelularmente. Se determinó que en células cultivadas en condiciones control aerobias el polyP se mantuvo en  $2367 \pm 1111 \text{ nmol } (10^7 \text{ cels})^{-1}$  y con la combinación de metales ( $20 \mu\text{M Cd}^{2+} + 25 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) estuvo en  $4610 \pm 2088 \text{ nmol } (10^7 \text{ cels})^{-1}$ , por otra parte en condiciones anaerobias hubo un incremento en su contenido cuando fueron expuestas a concentraciones crecientes de la combinación de metales. En presencia de  $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , el contenido intracelular fue cinco veces mayor en comparación con las células control, lo cual sugiere que la síntesis de polyP es un mecanismo de resistencia que permite contender contra el efecto tóxico del  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 20).

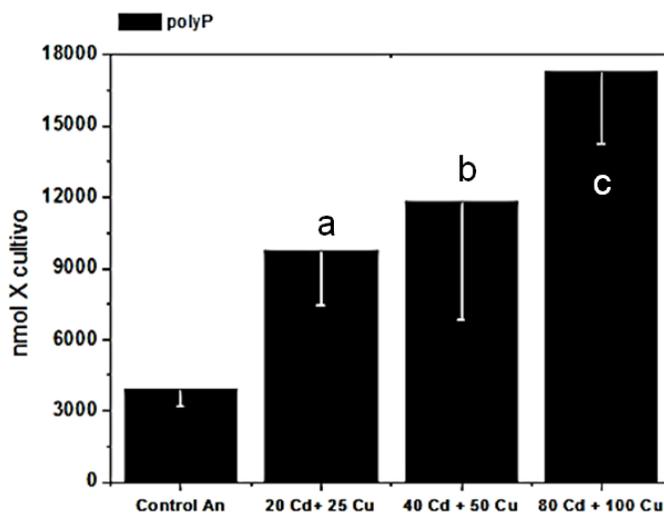


Figura 20. Síntesis de polifosfato en *E. gracilis*, cultivada en condiciones anaerobias. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. Unidades:  $\mu\text{M}$  de cadmio y cobre. *t*-

*Student*<sup>a</sup>  $P < 0.025$ , <sup>b</sup>  $P < 0.10$  y <sup>c</sup>  $P < 0.01$  células anaerobias expuestas a diferentes concentraciones de metales *versus* control anaerobio.

### 7.8. Formación de biopelícula en células expuestas a diferentes concentraciones de $Cd^{2+}$ + $Cu^{2+}$ en ambas condiciones de cultivo

Otro de los mecanismos implicados en la resistencia a metales pesados es la formación de una biopelícula, debido a que una parte del metal que se removió fue debido a la adsorción.

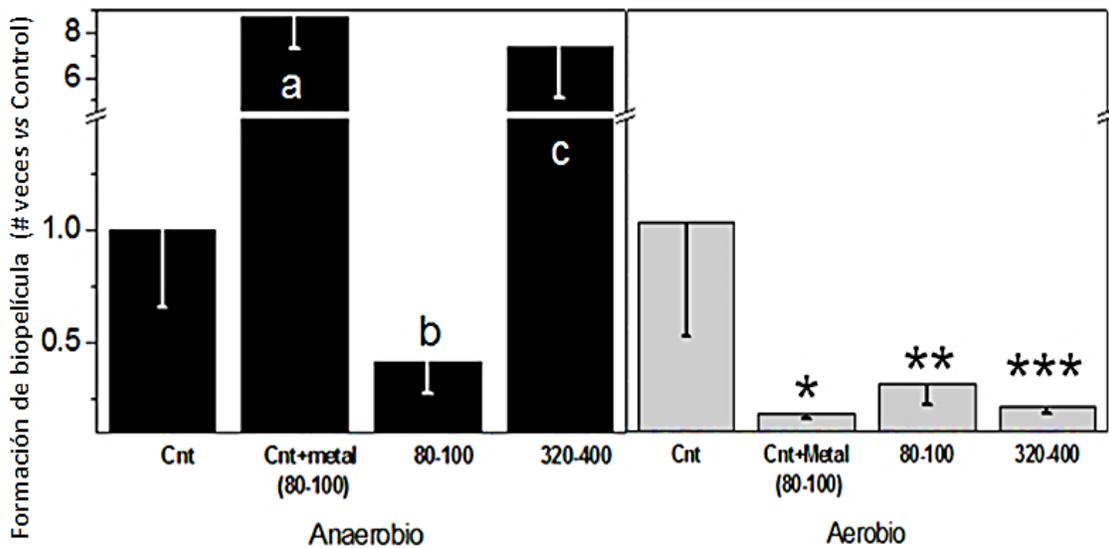


Figura 21. Formación de biopelícula de *E. gracilis*, cultivada en condiciones anaerobias y aerobias. Las barras en negro representan la condición anaerobia y en gris, la condición aerobia. Las barras son la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. *t-Student*<sup>a, b, c</sup>  $P < 0.001$  células anaerobias expuestas a diferentes concentraciones de metales *versus* control anaerobio *t-Student*<sup>\*, \*\*, \*\*\*</sup>  $P < 0.001$  células aerobias expuestas a diferentes concentraciones de metales *versus* control aerobio.

Se determinó que en condiciones anaerobias hubo una formación de biopelícula mayor cuando las células control son expuestas por primera vez a una concentración de  $80 \mu M Cd^{2+}$  +  $100 \mu M Cu^{2+}$ . En células que han sido cultivadas en la mezcla de metales durante varias generaciones hubo una disminución significativa en la formación de la biopelícula (Figura 21); sin embargo, cuando estas células pre-adaptadas a metal fueron cultivadas con una concentración mayor ( $320 \mu M Cd^{2+}$  +  $400 \mu M Cu^{2+}$ ) hubo una formación de biopelícula mayor en comparación con las células control.

Por otro lado, en condiciones aerobias la formación de biopelícula fue menor cuando las células fueron expuestas a las diferentes concentraciones de metales pesados, si se compara con las células control.

### 7.9. *Euglena gracilis* cultivada en agua residual

Debido a que se encontraron diferentes mecanismos por los que las células anaerobias resistieron la mezcla de metales (80  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  + 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ ) se determinó si estos mecanismos podrían llegar a ser útiles cuando las células son expuestas a una muestra real tomada de un río contaminado por metales pesados (Tabla 5).

En las muestras de agua residual obtenidas cerca de una zona conurbada en el municipio de Naucalpan, Edo. Méx, se encontraron concentraciones de metales que superaron el límite permisible, a excepción del Zn, a pesar de ello el Cr y Cu presentaron valores menores al límite detectable (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de metales pesados y metaloides en muestras de agua residual del Río “Los Cuartos”, Naucalpan, Edo. Méx.

Metal	$\mu\text{M}$	Límite permisible $\mu\text{M}$ NOM-127 SSA1-1994/FAO*
Zinc	3.3	76.4
Cobalto	5.3	0.8*
Cadmio	6.6	0.044
Níquel	8.1	3.4*
Hierro	47.5	5.3

Las células anaerobias control pudieron duplicarse en el agua residual, manteniendo una viabilidad del 40% con y sin la adición de las vitaminas esenciales para su crecimiento después de 21 días, mientras que en las células anaerobias pre-adaptadas a metal, se determinó una duplicación de 2-3 veces y una viabilidad mayor al 90%, con y

sin las vitaminas esenciales para su crecimiento además, se cuantificó al día 21 (tiempo final) el cadmio en el sobrenadante (Tabla 6).

Tabla 6. Duplicación celular en células control aerobias, anaerobias y pre-adaptadas a metal ( $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ) cultivadas en agua residual, con vitaminas (n=3) (Ver Tabla 3) y sin vitaminas (n=2). La densidad celular se determinó a los 21 días.

Células	Inicial				Final			
	# cél X10 <sup>6</sup> /mL		% Viabilidad inicial		# cél X10 <sup>6</sup> /mL		% Viabilidad final	
	Con vitaminas	Sin vitaminas	Con vitaminas	Sin vitaminas	Con vitaminas	Sin vitaminas	Con vitaminas	Sin vitaminas
<b>Anaerobio control</b>	0.3		100		0.51 ±0.10	0.58 (2)	40 ± 14	40 (2)
<b>Anaerobio pre-adaptadas (Cd<sup>2+</sup>+Cu<sup>2+</sup>)</b>	0.5		100		4 ± 0.40	4 (2)	96 ± 3	94 (2)

## 8. DISCUSIÓN

*E. gracilis* fotoheterotrófica se cultivó durante 21 días en todas las condiciones experimentales debido a que en condiciones anaerobias se observó que había un retraso en el crecimiento celular, posiblemente debido a los cambios en el metabolismo energético, la actividad fotosintética y el consumo de la fuente de carbono (Santiago-Martínez *et al.*, 2015), por lo que en un intento por evitar esa segunda variable (el tiempo) decidimos crecer a las células durante ese tiempo, donde las células control y las expuestas a metales hubieran alcanzado la fase estacionaria (Figura 10 y 11).

Se determinó la IC<sub>90</sub> por Cd<sup>2+</sup> donde a concentraciones de 160 y 20 µM en condiciones aerobias y anaerobias respectivamente (Figura 9 A) no hay crecimiento celular, y para el caso del Cu<sup>2+</sup> la IC<sub>90</sub> fue a concentraciones de 200 y 10 µM en condiciones aerobias y anaerobias respectivamente (Figura 9 B). Estos resultados arrojaron que los metales por separado son tóxicos para la célula, principalmente el cobre a bajas concentraciones y el cadmio a concentraciones altas pero, en combinación no aumenta su toxicidad y posiblemente sirvieron como un estímulo para el crecimiento celular, como sucedió en la combinación de 80 µM Cd<sup>2+</sup> + 100 µM Cu<sup>2+</sup> en condiciones anaerobias, mientras que para las células aerobias resultó ser tóxico ya que no hubo crecimiento y presentaban clorosis.

Las células control aerobias tuvieron la capacidad de crecer y duplicarse, alcanzando una densidad celular de 5.5 X10<sup>6</sup> cél/mL a los 10 días de cultivo y manteniendo una viabilidad mayor al 90% (Figura 10 y 13). Este valor fue similar a lo reportado para este organismo donde, bajo condiciones de crecimiento similares (crecimiento fotoheterotrófico y en aerobiosis) se obtuvo una densidad celular cercana a los 6 X10<sup>6</sup> cél/mL (Santiago-Martínez *et al.*, 2015; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002). Por otro lado, al final del cultivo (21 días) se obtuvo una densidad celular de 20 X10<sup>6</sup> cél/mL (Figura 10), como lo reportado por Lira-Silva *et al.*, (2011) donde *E. gracilis* heterotrófica en medio de cultivo GME a pH de 7, alcanzó una densidad celular de 29X10<sup>6</sup> cél/mL. Estos resultados indicaron que el etanol es el mejor sustrato para sustentar la duplicación celular, además de que se consume durante los primeros días de cultivo, seguido por el

malato y al final el glutamato (Jasso-Chávez *et al.*, 2010; Lira-Silva *et al.*, 2011). La prueba estadística aplicada nos indicó que hay diferencias significativas en las células expuestas a la combinación de metales vs control aerobio (Figura 10).

La condición denominada como “anaerobiosis” fue parcial, debido a que en el medio de cultivo sin células no hay oxígeno, pero durante el crecimiento las células fotosintéticas generaron una atmosfera con aproximadamente 2% (v/v) de oxígeno (Santiago-Martínez *et al.*, 2015), provocando que el ambiente en el medio de cultivo se volviera microaerófilico; sin embargo, este oxígeno se consumió por la mitocondria en condiciones de ausencia de luz generando ciclos de producción y consumo de O<sub>2</sub>. En trabajos anteriores se determinó que el O<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo anaerobio es <5 μM y que las cantidades pequeñas de oxígeno generado por la fotosíntesis se encuentran en la atmósfera gaseosa (*head space*) del frasco tipo ampolleta cerrado (Santiago-Martínez *et al.*, 2015). En células control a los 15 días de cultivo se alcanzó una densidad de 1.4 X10<sup>6</sup>cél/mL (Figura 11 y 13) y al final del cultivo se alcanzó una densidad celular de 2 X10<sup>6</sup>cél/mL con una viabilidad mayor al 80% (Figura 11). Otros autores reportaron densidades finales de 9 X10<sup>6</sup> cél/mL (Santiago-Martínez *et al.*, 2015) cuando las células fotoheterotróficas se cultivan con glutamato, malato y glucosa a un pH de 3.5, y valores de 4 X10<sup>6</sup>cél/mL (González-Roque, 2014) cuando se cultivan con glutamato, malato y etanol a un pH de 3.5. Esta diferencia en la densidad celular final entre células anaerobias quizás se debió a que han pasado varias generaciones (resiembras) en microaerofilia que han propiciado cambios metabólicos (Santiago-Martínez *et al.*, 2015) y que bajo esta condición experimental los sustratos no se consumieron en su totalidad (Castañeda-Tamez, 2014). Estos resultados indicaron que la fuente de carbono y el pH son factores importantes en el crecimiento de *E. gracilis*, los cuales deben ser considerados para futuras aplicaciones biotecnológicas.

En condiciones aerobias cuando *E. gracilis* se expuso a 20 μM Cd<sup>2+</sup> + 25 μM Cu<sup>2+</sup> alcanzó una densidad celular de 5 X10<sup>6</sup> cél/mL con una viabilidad del 90% (Figura 10). Este valor es similar a lo reportado por Santiago-Martínez *et al.*, (2015) donde *E. gracilis* fue cultivada en presencia de 25 μM CdCl<sub>2</sub>. Además, se observó que cuando esta fue expuesta a 40 μM Cd<sup>2+</sup>+ 50 μM Cu<sup>2+</sup> la duplicación celular y la viabilidad fueron bajas (10%), lo que sugirió que en esta condición, la combinación de metales fue tóxica e indujo

la muerte celular. En las células que fueron cultivadas a concentraciones mayores de  $\text{Cd}^{2+}$  +  $\text{Cu}^{2+}$ , se observó que no hubo crecimiento ni duplicación celular y tenían un gran daño a nivel morfológico y metabólico, ya que las células presentaron una clorosis evidente y no consumieron las fuentes de carbono (Figura 12 A y B, Figura 15). Este mismo efecto se observó en presencia de concentraciones altas  $\text{CdCl}_2$  ( $>75 \mu\text{M}$ ) donde el crecimiento celular se inhibió (Santiago-Martínez *et al.*, 2015; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002, 2006).

Por otra parte, cuando las células se cultivaron en condiciones anaerobias y en presencia de  $20 \mu\text{M Cd}^{2+} + 25 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , la viabilidad y la densidad celular fueron similares a los valores determinados para las células control anaerobias (aproximadamente  $2 \times 10^6$  cél/mL a los 21 días de cultivo; Figura 11). En presencia de  $40 \mu\text{M Cd}^{2+} + 50 \mu\text{M Cu}^{2+}$  y  $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$  aumentó la densidad celular (Figura 11 y 13); es decir, la combinación de estos metales posiblemente estimuló el crecimiento celular debido a que hubo competencia de ambos metales por entrar a la célula ó porque estos metales fueron adsorbidos, éste fenómeno se ha determinado en la microalga unicelular de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata*, la cual creció mejor al ser expuesta a concentraciones crecientes de cobre ( $2.88 \mu\text{M Cu}^{2+}$  disuelto y  $4.8 \mu\text{M Cu}^{2+}$  total) y en combinación con otros metales (Gaete *et al.*, 2007). En este trabajo se determinó que en las células que fueron expuestas a  $160 \mu\text{M Cd}^{2+} + 200 \mu\text{M Cu}^{2+}$  y  $320 \mu\text{M Cd}^{2+} + 400 \mu\text{M Cu}^{2+}$  no hubo duplicación celular y la viabilidad fue cercana al 50%, lo que indicó que la combinación de metales a altas concentraciones fue tóxica (Figura 10), sin embargo, a pesar del efecto inhibitorio del  $\text{Cd}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$  sobre el crecimiento celular, *E. gracilis* posee los mecanismos necesarios para resistir y duplicarse en condiciones de microaerofilia (Figura 11). La prueba estadística aplicada nos indicó que hay diferencias significativas en todas las células expuestas a la combinación de metales vs control aerobio, excepto en las células expuestas a  $40 \mu\text{M Cd}^{2+} + 50 \mu\text{M Cu}^{2+}$  y  $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$  donde no hubo diferencias significativas (Figura 11).

En condiciones aerobias, el valor de pH al final el cultivo fue de  $7.9 \pm 0.2$  ( $n=3$ ) mientras que en condiciones anaerobias el valor de pH final disminuyó a  $6.5 \pm 0.1$  ( $n=3$ ), seguramente debido a la excreción de succinato al medio de cultivo (Santiago-Martínez *et al.*, 2015). Estos cambios en el valor de pH sugirieron posibles modificaciones en el metabolismo de las células aerobias en comparación con las células anaerobias, donde

probablemente se excretan productos diferentes del metabolismo, lo cual involucró un consumo diferente de las fuentes de carbono, éste fenómeno también se ha observado en *Pseudokirchneriella subcapitata* donde el valor de pH inicial del medio de cultivo (7.5) se modificó terminando en un valor de pH de 8.3 (Gaete *et al.*, 2007).

Con respecto a las fuentes de carbono que se utilizaron para el medio de cultivo (Figura 15) se determinó que el glutamato en condiciones control aerobio se consumió en un 20% y en anaerobiosis un 40%; sin embargo, en otros trabajos se reportó que cuando *E. gracilis* heterotrófica se cultivó en presencia de  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Cr}^{6+}$ , en medio GME a pH 7.0, el glutamato se consumió en un 60% (Jasso-Chávez *et al.*, 2010; Lira-Silva *et al.*, 2011). En cambio, el malato fue uno de los principales sustratos que se consumieron en condiciones control aerobio y anaerobio (70% y 80% respectivamente). Tanto en células heterotróficas como fotoheterotróficas, el malato es uno de los sustratos más utilizados para la duplicación celular (Lira-Silva *et al.*, 2011). En presencia de  $80 \mu\text{M Cd}^{2+} + 100 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , en condiciones anaerobias el malato se consumió en un 80% (Figura 15), en otros trabajos donde también se cultivó a *E. gracilis* heterotrófica pero, en medio de cultivo GME aerobio a pH 3.5, se observó que éste se consumió preferentemente y sustentó la duplicación celular durante los primeros días de cultivo (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006; Lira-Silva *et al.*, 2011). Además, la secreción de este ácido orgánico se incrementa en *E. gracilis* heterotrófica ante un estrés inducido por la exposición de  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Cr}^{6+}$  a pH 7 (Lira-Silva *et al.*, 2011). En otros estudios se encontró que el malato se puede unir fuertemente al aluminio, formando un complejo malato-aluminio (III), en concentración de 10 mM de malato y 10 mM  $\text{AlCl}_3$  (Tashiro *et al.*, 2007). La presencia de malato en el medio de cultivo, ya sea por su excreción o su no consumo, podría ser un mecanismo de resistencia ante el estrés por metales pesados, ya que este ácido orgánico podría quelar (acomplejar) al  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , haciéndolos menos tóxicos para las células.

El etanol se consumió rápidamente en condiciones aerobias >90% (Figura 15), como lo reportado por Jasso-Chávez *et al.*, (2010). El EtOH entra a la célula por difusión, y en el citosol se oxida a acetaldehído mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADHc), después en la mitocondria el acetaldehído es oxidado hacia acetato por una aldehído deshidrogenasa (mtxALDH) y mediante la enzima Acetato tiocinasa (ATK) se formó el Acetil CoA, el cual entra al Ciclo de Krebs (Figura 3) (Jasso-Chávez *et al.*, 2010).

Sin embargo, en condiciones anaerobias el EtOH no se consumió, quizá debido a la ausencia de alguna de estas enzimas o al estado redox de las células provocado por la condición de microaerofilia o de anaerobiosis.

La cantidad de oxígeno producido por el metabolismo de *E. gracilis* fotosintética no excedió el 2% (v/v) del microambiente gaseoso del frasco, el cual permitió que una parte equivalente a  $5 \pm 3 \mu\text{mol}$  de  $\text{O}_2$  disuelto en el medio de cultivo (50 mL) mantuvo una condición de microaerofilia (Santiago-Martínez *et al.*, 2015). La fotosíntesis y la respiración celular en condiciones aerobias (Tabla 4) aumentó ligeramente en presencia de la combinación de metales y la actividad fotosintética aumentó más del doble, en comparación con el control. Por otra parte la actividad del complejo IV (Cyt-c) y de la oxidasa alterna indicaron que también hubo un consumo de oxígeno no asociado a la síntesis de ATP. En condiciones anaerobias, la respiración y la actividad fotosintética disminuyeron con respecto a la condición control, mientras que la actividad del complejo Cyt-c y de la oxidasa alterna se mantuvieron similares a las determinadas en células control. Cervantes-García *et al.*, (2014) determinaron que la exposición a concentraciones altas de  $\text{Cu}^{2+}$  ( $>100\mu\text{M}$ ), en condiciones aerobias, provocó una disminución drástica en la densidad celular y un daño celular (clorosis), (como se observó en las células aerobias expuestas a altas concentraciones de metales [ $>40$ ]  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ ; Figura 10, Figura 12 A), posiblemente debido a la inactivación del fotosistema II. Estos resultados sugirieron un daño en el cloroplasto pero no en la mitocondria en las células anaerobias expuestas a la combinación de los metales.

Peña-Castro *et al.*, (2004) determinaron cambios inducidos por metales divalentes como  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , en la microalga *Scenedesmus incrassatulus* y que el efecto tóxico provocado por la exposición a  $\text{Cu}^{2+}$  puede ser reversible si se quita el metal del medio de cultivo (únicamente este metal). Además, en células expuestas a una concentración de  $31 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  se removió el 24% del metal (en condiciones aerobias), mientras que a  $63 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  la remoción fue del 32 %. En cambio, en este trabajo se demostró que cuando *E. gracilis* fotoheterotrófica fue expuesta a la combinación de estos dos metales en el medio de cultivo, la remoción de  $\text{Cd}^{2+}$  es mayor (60 %) en comparación con la remoción del  $\text{Cu}^{2+}$  (25 %).

Hasta el momento, existen diversos trabajos donde se evalúa la remoción de metales pesados en *E. gracilis* fotoheterotrófica donde únicamente se prueba un metal pesado o se pre-acondicionan con otro metal ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ ) con la finalidad de aumentar la resistencia y la acumulación de metales pesados (Avilés *et al.*, 2003; Devars *et al.*, 1998; Sánchez-Thomas *et al.*, 2016). La presencia de un metal pesado en la célula, puede producir un efecto tóxico específico e interferir en la desintoxicación de otro, afectando así la capacidad de remover estos al mismo tiempo, debido a esto es importante evaluar el efecto tóxico de la combinación de distintos metales pesados en cultivos de *E. gracilis*, bajo condiciones aerobias y anaerobias (Santiago-Martínez *et al.*, 2015).

Los resultados mostraron que *E. gracilis* fue capaz de remover cadmio y cobre en ambas condiciones experimentales, no obstante, las células se mantuvieron más viables en la condición anaerobia (Figura 11, Figura 12 B y C). En las figuras 17 y 19, se mostró que la acumulación es el principal mecanismo de remoción de metales pesados en ambas condiciones experimentales y a diferentes concentraciones. Sin embargo, cuando las células aerobias se expusieron a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  hubo una remoción del 11%, dada principalmente por la acumulación  $\text{Cd}^{2+}$ , en comparación con la condición aerobia donde se removió el 51%  $\text{Cd}^{2+}$ , pero principalmente por adsorción (Figura 16 y 18). Santiago-Martínez *et al.*, (2015) reportaron que *E. gracilis* removió el 90%  $\text{Cd}^{2+}$  del medio de cultivo cuando las células fueron expuestas a una concentración de 300  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  en condiciones anaerobias, mientras que en esta concentración pero, en condiciones aerobias, se removió solo el 75%, de la misma manera, cuando las células fueron expuestas a 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  se removió el 43% y el 100% del metal en cultivos aerobios y anaerobios, respectivamente. En cambio, cuando las células fueron expuestas a 80  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , el 19% y 100% de  $\text{Cd}^{2+}$  fue removido en cultivos aerobios y anaerobios, respectivamente, donde la acumulación intracelular fue el principal mecanismo de remoción de  $\text{Cd}^{2+}$ .

En otros estudios donde se utilizó a *E. gracilis* pre-tratada con 1.5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}^{2+}$ , se determinó que cuando las células son expuestas 50  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , se remueve el 80% del  $\text{Hg}^{2+}$  del medio de cultivo y que el 60% de este metal se acumuló en el cloroplasto (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002, 2005a, 2006), en cambio, en condiciones de oscuridad (cepa heterotrófica), el cadmio se acumuló en las mitocondrias (Avilés *et al.*, 2003). Por otro

lado, en la arquea marina *Methanosarcina acetivorans* cultivada en 1.5 mM Cd<sup>2+</sup> se determinó que la remoción de Cd<sup>2+</sup> es del 85% y que la arquea resistió concentraciones mayores de Cd<sup>2+</sup> cuando se pre-adaptan a 54 µM Cd<sup>2+</sup> durante varias generaciones. Asimismo, en *Methanosarcina acetivorans* se indujo el incremento en la síntesis de moléculas con grupos tiol, la síntesis de polyP y la formación de una biopelícula (Lira-Silva *et al.*, 2013).

El Cu<sup>2+</sup> es un metal esencial para las plantas (Machado-Estrada *et al.*, 2013) y microorganismos que realizan fotosíntesis. Debido a esto, es probable que en *E. gracilis*, el Cu<sup>2+</sup> se acumule intracelularmente para ser utilizado en su metabolismo (Figura 19). En condiciones aerobias, cuando las células fueron expuestas a una concentración de 25 µM, 50 µM y 100 µM Cu<sup>2+</sup>, la remoción fue de 20%, 45% y 48% respectivamente, y en condiciones anaerobias se removi6 el 18%, 100% y 100% a esas mismas concentraciones de Cu<sup>2+</sup> respectivamente. Es un hecho que, la exposición prolongada durante varias generaciones a un metal (Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, o Hg<sup>2+</sup>) le confiere una mayor resistencia a estos y otros metales pesados (Devars *et al.*, 2000).

En la microalga *Chlorella vulgaris* se ha determinado que el Cu<sup>2+</sup> es un metal muy t6xico, ya que inhibi6 su crecimiento cuando las células fueron expuestas a 5 µM de Cu<sup>2+</sup> (Ouyang *et al.*, 2012). Por otro lado, *E. gracilis* es 8 veces m6s grande que otras microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Microcystis aeruginosa*, por lo que tiene una capacidad mayor (en volumen) de acumular el metal pesado y acomplejarlo en el citosol y sus organelos (Park *et al.*, 2009), y tambi6n por ser m6s grande tiene mayor superficie y por ende mayor capacidad de adsorci6n.

Debido a que en condiciones anaerobias no se mostr6 un da6o observable en las células, pero si en las aerobias (Figura 12 A y C) se evalu6 el da6o provocado por la producci6n celular de especies reactivas del ox6geno (ERO). La determinaci6n del estr6s oxidativo en los sistemas biol6gicos se puede medir como un aumento o disminuci6n de mol6culas redox sensibles, cuyo cambio responde ante un tipo de estr6s (Escriv6-L6pez, 2015). Adem6s, la exposici6n a un metal pesado a concentraciones t6xicas puede estimular la respuesta de la defensa antioxidante para disminuir el da6o inducido por el aumento de las ERO (Devars *et al.*, 1998; Santiago-Mart6nez *et al.*, 2015). En este trabajo

los resultados mostraron que al exponer a las células anaerobias a 80  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  + 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  el contenido de TBARS medido como MDA fue muy similar al control, ambos fueron ligeramente más bajos que lo reportado para la microalga *Scenedesmus sp* cuando fue expuesta a 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , donde el contenido de MDA fue de 0.29 nmol a las 6 h y de 0.14 nmol a los 7 días de exposición (Tripathi *et al.*, 2006), mientras que en condiciones control aerobio el contenido fue más bajo que lo reportado por Santiago-Martínez *et al.*, (2015) donde se determinaron  $88 \pm 13$  nmol MDA ( $10^7$  cels)<sup>-1</sup>.

En uno de los mecanismos evaluados para contender con la exposición a metales, se observó un aumento en el contenido de polyP en células expuestas a  $\text{Cd}^{2+}$  +  $\text{Cu}^{2+}$  este resultado indicó que éste podría estar uniéndose al metal, inactivándolo y permitiendo su acumulación en el interior de la célula, además la prueba estadística aplicada nos indicó que hay diferencias significativas en las células expuestas a la combinación de metales en condiciones anaerobias vs control anaerobio, excepto en las células cultivadas con 80  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  + 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  donde no hubo diferencias significativas (Figura 20). Este mecanismo ha sido descrito en la arquea marina *Methanosarcina acetivorans*, donde se determinó un incremento en el contenido intracelular de fosfato y polyP cuando las células fueron expuestas a altas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  (Lira-Silva *et al.*, 2013). Por otra parte en *Euglena gracilis* fotoheterotrófica cultivada en anaerobiosis, se encontró en un análisis elemental con microscopia de rayos X cadmio (Cd), fósforo (P) y azufre (S) en regiones electrodensas dentro y fuera del cloroplasto (Santiago-Martínez *et al.*, 2015), lo que sugirió que el polyP tiene la capacidad de acomplejar e inactivar al  $\text{Cd}^{2+}$ .

En otros organismos se ha evaluado la formación de una biopelícula, como lo reportado en *Pseudomonas sp* donde estas bacterias pueden tolerar hasta 7mM  $\text{Cd}^{2+}$  y 5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  (Chih-Ching *et al.*, 2013). En este trabajo, la exposición a metales pesados en condiciones aerobias no favoreció la formación de una biopelícula, con respecto a las células control (Figura 21), debido a que los metales fueron tóxicos para las células y no hubo duplicación celular. En el caso de las células en condiciones anaerobias (Figura 21), existió un aumento en la formación de biopelícula cuando fueron expuestas a 320  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  + 200  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , con respecto al control. No obstante, las células pre-adaptadas a metales pesados fueron expuestas a 80  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  + 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  no hubo un aumento en la formación de la biopelícula, quizá debido a que estas células ya han sido cultivadas por

un largo periodo a esa concentración de metal y han desarrollado otros mecanismos de resistencia a metales pesados, diferentes a la formación de la biopelícula. Cabe mencionar que la película y la membrana plasmática de *E. gracilis* son una barrera que le permite resistir ante un estrés inducido por metales como el  $\text{Cr}^{3+}$  (Jasso-Chávez *et al.*, 2010). Los resultados de la prueba estadística aplicada nos indicó que hay diferencias significativas en las células expuestas a la combinación de metales en condiciones anaerobias vs control anaerobio (Figura 21).

*Euglena gracilis* es una de las especies fotosintéticas que se han encontrado en efluentes industriales (Cervantes & Moreno, 1999) y con la finalidad de saber si *E. gracilis* era capaz de duplicarse y acumular metales pesados en aguas contaminadas, se realizó una serie de experimentos en los que *E. gracilis* fotoheterotrófica fue cultivada en agua residual. Cuando se cuantificaron los metales pesados y los metaloides presentes en esta agua, se encontró que la mayoría superaba los límites permisibles de la NOM-127-OM-127-SSA1-1994 (Tabla 5) con excepción del  $\text{Zn}^{2+}$ . Además, se cuantificó cadmio en el sobrenadante y este no se encontró presente, lo que sugiere que posiblemente estaba acumulado intracelularmente. Estos resultados indicaron que las células pre-adaptadas presentaron mecanismos para resistir una mezcla de metales pesados en una muestra real de un río contaminado por diferentes metales pesados y con un potencial biorremediador importante.

Por otra parte, en otros estudios se reportó la presencia del protista *Euglena pascheri* y la microalga *Lepocinclis ovum* en ambientes en condiciones extremas, tales como salinidad alta, en presencia de metales pesados ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ ) y en cuerpos acuáticos muy ácidos (pH 3.8 en primavera versus 6.5 en verano), en un lago al sur de Polonia (Ligeza & Wilk-Woźniak, 2011). Los resultados de este trabajo sugirieron que *E. gracilis* puede ser utilizada como un microorganismo biorremediador de sistemas acuáticos contaminados por metales pesados, aun en sistemas poco controlados (biorreactor) ya que no requiere de condiciones óptimas de crecimiento celular.

## 9. CONCLUSIONES

- Debido a su capacidad para crecer en muestras de agua de un río contaminado, la cepa adaptada a anaerobiosis y a la mezcla de  $\text{Cd}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$ , podría ser una herramienta muy importante en los procesos de tratamiento para la remoción de metales pesados de sistemas acuáticos.
- Estos resultados indicaron que *Euglena gracilis* es un organismo con potencial biotecnológico para biorremediar sistemas acuáticos contaminados a futuro y en condiciones controladas como un biorreactor.

## Anexo 1. Tablas de análisis estadísticos *t-Student* para muestras independientes

El análisis estadístico *t-Student* para muestras independientes o no pareadas, se realizó en el programa Origin 8 para todos los resultados, algunos fueron realizados a partir de la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{\frac{SD_1}{\sqrt{n}}}$$

Donde:

$\overline{X}_1$  Promedio 1 (del resultado a comparar).

$\overline{X}_2$  Promedio 2 (con el que se hará la comparación).

$SD_1$  Desviación estándar del promedio 1.

$\sqrt{n}$  Número de datos.

Tabla 7. Análisis estadístico *t-Student* en curva de crecimiento bajo condiciones aerobias (Figura 10), comparación de la combinación de metales vs control, a los 18 días de cultivo.

<b>AEROBIO</b>		<b>Media</b>	<b>Desviación</b>	<b>Estadístico-t</b>	<b>Grados de</b>	<b>Prob&gt; t </b>
Cd $\mu\text{M}$	<b>n</b>	(Densidad	<b>estándar</b>		<b>libertad (n-1)</b>	
+		celular)				
Cu $\mu\text{M}$						
20+25	3	5.22	0.18	*	2	0.001
40+50	3	0.6	0.1	*	2	0.0005
80+100	4	0.17	0.16	-245.92	3	1.48261 E-7
160+200	3	0.16	0.163	-213.08	2	2.2023 E-5
320+400	3	0.2	0.1	-348.14	2	8.2505 E-6

\*Realizados con la fórmula de *t-Student*.

Tabla 8. Análisis estadístico *t-Student* en curva de crecimiento bajo condiciones anaerobias (Figura 11), comparación de la combinación de metales vs control, a los 18 días de cultivo.

<b>ANAEROBIO</b>		<b>Media</b>	<b>Desviación</b>	<b>Estadístico-t</b>	<b>Grados de</b>	<b>Prob&gt; t </b>
Cd $\mu\text{M}$	<b>n</b>	(Densidad	<b>estándar</b>		<b>libertad (n-1)</b>	
+		celular)				
Cu $\mu\text{M}$						
20+25	4	1.62	0.256	-7.5922	3	0.00474
40+50	5	1.89	0.829	-1.909	4	0.1288
80+100	5	2.51	0.468	-0.419	4	0.6962
160+200	5	0.99	0.604	-5.947	4	0.0040
320+400	5	0.39	0.195	-25.18	4	1.4748 E-5

Tabla 9. Análisis estadístico *t-Student* de la cuantificación de polyP (Figura 20) en combinación de metales en anaerobiosis vs control.

<b>polyP</b>		<b>Desviación</b>	<b>Estadístico-t</b>	<b>Grados de</b>	<b>Prob&gt; t </b>	
<b>ANAEROBIO</b>	<b>n</b>	<b>media</b>	<b>estándar</b>	<b>libertad (n-1)</b>		
Cd $\mu\text{M}$						
+ Cu $\mu\text{M}$						
20+25	3	9734	2321	*	2	0.0025
40+50	3	11823	4997	*	2	0.10
80+100	3	17302	3022	*	2	0.01

\*Realizados con la fórmula de *t-Student*.

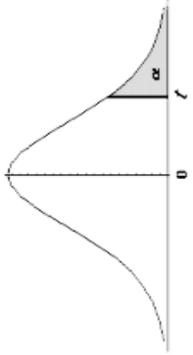
Tabla 10. Análisis estadístico *t-Student* de la formación de biopelícula (Figura 21) en condiciones aerobias (# de veces) vs control.

<b>BIOPELÍCULA</b>						
<b>AEROBIA</b>	<b>n</b>	<b>media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Estadístico-t</b>	<b>Grados de libertad (n-1)</b>	<b>Prob&gt; t </b>
Cd $\mu\text{M}$ + Cu $\mu\text{M}$						
Control	7	0.6811	0.2702	-2.4365	6	0.0507
80+100	8	1.78819	1.63652	-10.01371	7	2.12017 E-5
320+400	9	1.02341	0.32976	-59.66754	8	6.9158 E-12

Tabla 11. Análisis estadístico *t-Student* de la formación de biopelícula (Figura 21) en condiciones anaerobias (# de veces) vs control.

<b>BIOPELÍCULA</b>						
<b>ANAEROBIA</b>	<b>n</b>	<b>media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Estadístico-t</b>	<b>Grados de libertad (n-1)</b>	<b>Prob&gt; t </b>
Cd $\mu\text{M}$ + Cu $\mu\text{M}$						
Control	18	2.25375	0.73023	10.7703	17	5.1621 E-9
80+100	9	0.1043	0.04416	-20.08705	8	3.93721 E-8
320+400	9	1.8761	0.7876	5.62253	8	4.97033 E-4

## Anexo 2. Tabla de *t*-Student



**Tabla de la *t* de Student.**

Contiene los valores  $t$  tales que  $p[T > t] = \alpha$ ,  
donde  $n$  son los grados de libertad.

$n \setminus \alpha$	0,30	0,25	0,20	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1	0,7265	1,0000	1,3764	3,0777	6,3137	12,7062	31,8210	63,6559	127,3213	318,3088	636,6192
2	0,6172	0,8165	1,0607	1,8856	2,9200	4,3027	6,9645	9,9250	14,0890	22,3271	31,5991
3	0,5844	0,7649	0,9785	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8408	7,4533	10,2145	12,9240
4	0,5686	0,7407	0,9410	1,5332	2,1318	2,7765	3,7469	4,6041	5,5976	7,1732	8,6103
5	0,5594	0,7267	0,9195	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	4,7733	5,8934	6,8688
6	0,5534	0,7176	0,9057	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	4,3168	5,2076	5,9588
7	0,5491	0,7111	0,8960	1,4149	1,8946	2,3646	2,9979	3,4995	4,0293	4,7853	5,4079
8	0,5459	0,7064	0,8889	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	3,8325	4,5008	5,0413
9	0,5435	0,7027	0,8834	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	3,6897	4,2968	4,7809
10	0,5415	0,6998	0,8791	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	3,5814	4,1437	4,5869
11	0,5399	0,6974	0,8755	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	3,4966	4,0247	4,4370
12	0,5386	0,6955	0,8726	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	3,4284	3,9296	4,3178
13	0,5375	0,6938	0,8702	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	3,3725	3,8520	4,2208
14	0,5366	0,6924	0,8681	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	3,3257	3,7874	4,1405
15	0,5357	0,6912	0,8662	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	3,2860	3,7328	4,0728
16	0,5350	0,6901	0,8647	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	3,2520	3,6862	4,0150
17	0,5344	0,6892	0,8633	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,2224	3,6458	3,9651
18	0,5338	0,6884	0,8620	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,1966	3,6105	3,9216
19	0,5333	0,6876	0,8610	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,1737	3,5794	3,8834
20	0,5329	0,6870	0,8600	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,1534	3,5518	3,8495
21	0,5325	0,6864	0,8591	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,1352	3,5272	3,8193
22	0,5321	0,6858	0,8583	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,1188	3,5050	3,7921
23	0,5317	0,6853	0,8575	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,1040	3,4850	3,7676
24	0,5314	0,6848	0,8569	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7970	3,0905	3,4668	3,7454
25	0,5312	0,6844	0,8562	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,0782	3,4502	3,7251
26	0,5309	0,6840	0,8557	1,3150	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,0669	3,4350	3,7066
27	0,5306	0,6837	0,8551	1,3137	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,0565	3,4210	3,6896
28	0,5304	0,6834	0,8546	1,3125	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,0469	3,4082	3,6739
29	0,5302	0,6830	0,8542	1,3114	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,0380	3,3962	3,6594
30	0,5300	0,6828	0,8538	1,3104	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,0298	3,3852	3,6460
40	0,5286	0,6807	0,8507	1,3031	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	2,9712	3,3069	3,5510
80	0,5265	0,6776	0,8461	1,2922	1,6641	1,9901	2,3739	2,6387	2,8870	3,1953	3,4163
120	0,5258	0,6765	0,8446	1,2886	1,6576	1,9799	2,3578	2,6174	2,8599	3,1595	3,3735
$\infty$	0,5244	0,6745	0,8416	1,2816	1,6449	1,9600	2,3263	2,5758	2,8070	3,0902	3,2905

## 10. REFERENCIAS

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ASTDRa) ToxFAQs™  
Cobre [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts132.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts132.html) CAS#: 7440-50-8.  
BufordHwy NE, Atlanta, GA. Página modificada el 9 de diciembre del 2014.  
Consultado el 17 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ASTDRb) ToxFAQs™  
Cadmio [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts5.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts5.html) CAS#: 7440-43-9.  
BufordHwy NE, Atlanta, GA. Página modificada el 9 de diciembre del 2014.  
Consultado el 17 de octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Arnal, N., Astiz, M., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2011). Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(6): 1779-1786.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24(1): 1.
- Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N., & Moreno-Sánchez, R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*. 180(1): 1-10.
- Barceló, D., Ayora, C., Carrera, J., Castaño, S., Folch, M., García Calvo, E., & López de Alda, M. (2008). Contaminantes orgánicos emergentes en aguas continentales y aspectos relacionados con el marco normativo y planificación hidrológica en España. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC ed.) Pp 91-116.
- Buetow, D. E. (1989). The Biology of *Euglena*: Vol. IV: Subcellular Biochemistry and Molecular Biology. *Academic Press*. Pp. 247-314.
- Cantoral-Uriza, E. A. (2013). La tierra de diatomita para la eliminación de metales pesados en cuerpos de agua continentales. Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM Campus Juriquilla. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Ficología*. (2) 8-11.

- Castañeda-Tamez P. (2014). Generación de un consorcio mediante el co-cultivo del protista *Euglena gracilis* y la arquea *Methanosarcina acetivorans* para la producción de metano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Castro-Guerrero, N. A., Jasso-Chávez, R., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta –Bioenergetics*. 1710(2): 113-121.
- Castro-Guerrero, N. A., Rodríguez-Zavala, J. S., Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., & Moreno-Sánchez, R. (2008). Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd<sup>2+</sup> stress in *Euglena*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 40(3): 227-235.
- Cervantes, C. & Moreno Sánchez R. (1999). Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. México: AGT Editor S.A. Pp. 24, 68, 106-108.
- Cervantes, M. (2007). Conceptos fundamentales sobre ecosistemas acuáticos y su estado en México. Pp. 37-67. En Ó. Sánchez, M. Herzig, E. Peters, R. Márquez-Huitzil & L. Zambrano (ed.). *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México*. Instituto Nacional de Ecología-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, DF, México.
- Cervantes-García, D., Rubalcaba-Sil, J. L., Gonzalez-Mendoza, D., & Avilés-Marín, M. (2014). Evaluación de la bioacumulación de cobre en *Euglena gracilis* mediante la técnica de fluorescencia de rayos X. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 42(3): 662-665.
- Chávez, T., Castro, L., Díaz-Barriga, M., & Monroy, F. (2011). Modelo conceptual de riesgo ambiental por arsénico y plomo en el distrito minero de Santa María de la Paz, San Luis Potosí, México. *e-Gnosis*. 9(2011): 1-25.

- Chih-Ching, C., Lin, B. C., & Wu, C. H. (2013). Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas sp.* *Biochemical Engineering Journal*. 78, 132-137.
- Comisión Nacional del Agua, México (CONAGUA). *Estadísticas del Agua en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Tlalpan, México, D. F., Edición (2013) Pp. 36-41. <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/SGP-2-14Web.pdf>. Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Comisión Nacional del Agua. CONAGUA (2014). <http://www.conagua.gob.mx/Contenido.aspx?n1=3&n2=63&n3=63> Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA). (2014). <http://www3.cec.org/islandora/es/item/11581-taking-stock-vol-14-es.pdf>. *En balance: emisiones y transferencias de contaminantes en América del Norte. Montreal, Canadá*. Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, Canadá. ISBN 978-2-89700-067-7. 14:142.
- Coto-Pérez, O., Marrero-Coto, J. & Díaz-Valdivia, A. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. 41 (1): 67-78.
- Devars, S., Hernandez R., & Moreno-Sanchez, R. (1998). Enhanced heavy metal tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34(2): 128-135.
- Devars, S., Avilés, C., Cervantes, C., & Moreno-Sánchez, R. (2000). Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*. 174(3): 175-180.
- Escrivá-López, C. (2015). Estudio de los valores de referencia para los parámetros de estrés oxidativo: malondialdehído y glutatión, medidos por cromatografía líquida de alta eficacia, en humanos y animales de experimentación. Tesis de Licenciatura.

Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, España.

- Espinosa, E., & Armienta, M. A. (2007). Mobility and fractionation of Fe, Pb and Zn in river sediments from a silver and base metals mining area: Taxco, México. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 42(10): 1391-1401.
- European Copper Institute©. (2016). Copper Market: Demand and Economic Value. <http://copperalliance.eu/industry/market>. Consultado el 21 de Enero del 2016. Disponible [en línea].
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2): 179-187.
- Ford, T., & Ryan, D. (1995). Toxic metals in aquatic ecosystems: a microbiological perspective. *Environmental Health Perspectives*. 103 (1): 25-28.
- Gaete, H., Aránguiz, F., Cienfuegos, G., & Tejos, M. (2007). Metales pesados y toxicidad de aguas del Rio Aconcagua en Chile. *Química Nova*. 30(4): 885-891.
- García-García, J. D., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2016). Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra-and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnology advances*. 34(5): 859-873.
- González-Roque, N. E. (2014). Aislamiento de una cepa de *Euglena gracillis* hiperacumuladora de metales pesados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- González-Álvarez, J. R., Rodríguez Hernández, M. Á., Novales Hernández, Z., Rodríguez Ramírez, E. A., & Sotolongo Calzadilla, R. (2014). Cirrosis hepática y anemia hemolítica por enfermedad de Wilson. Presentación de un caso pediátrico. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*. 18(3): 525-534.

- González-Medina, R., Moguel-Zetina, C., Bolio-Comas, M., & Canul-Pat, R. (2004). Concentración de Cd, Cr, Cu y Pb en sedimentos y en tres especies de pepino de mar (clase *Holothuroidea*) de las costas del Estado de Yucatán, México. *Ingeniería*. 8(2): 7-19.
- Greenblatt, C. L. & Schiff, J. A. (1959). A pheophytin like pigment in dark adapted *Euglena gracilis*. *Journal of Protozoology*. 6(1): 23-28.
- Greenpeace México A.C. (2012). Ríos mexicanos, ríos tóxicos. [http://www.greenpeace.org/mexico/global/mexico/report/2012/rios\\_toxicos.pdf](http://www.greenpeace.org/mexico/global/mexico/report/2012/rios_toxicos.pdf) p 5 y 6 Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Hashim, M. A., Mukhopadhyay, S., Sahu, J. N., & Sengupta, B. (2011). Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *Journal of environmental management*. 92(10), 2355-2388.
- Hernández-Zamora, M., Cristiani-Urbina, E., Martínez-Jerónimo, F., Perales-Vela, H. V., Ponce-Noyola, T., del Carmen Montes-Horcasitas, M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2015). Bioremoval of the azodye Congo Red by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(14): 10811-10823.
- Hernández-Zamora, M., Perales-Vela, H. V., Flores-Ortíz, C. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2014). Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to Congo Red. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 108: 72-77.
- Hurlbert, R. E., and Rittenberg, S. C. (1962). Glucose metabolism of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*; growth and enzymatic studies. *The Journal of protozoology*. 9(2): 170-182.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía © (INEGI) (2010). *Estadísticas económicas Industria minerometalúrgica septiembre*. [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/economicas/minero/im/minero.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/economicas/minero/im/minero.pdf) Consultado el 10 de Enero del 2016. Disponible [en línea].

Instituto Nacional de Estadística y Geografía © (INEGI) (2015). *Estadística de la industria minerometalúrgica cifras durante Diciembre de 2014*. [http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/notasinformativas/ind\\_miner/NI-IM.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/notasinformativas/ind_miner/NI-IM.pdf)

Consultado el 10 de Enero del 2016. Disponible [en línea].

Jasso-Chávez, R., & Moreno-Sánchez, R. (2003). Cytosol mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. *European Journal of Biochemistry*. 270(24): 4942-4951.

Jasso-Chávez, R., Pacheco-Rosales, A., Lira-Silva, E., Gallardo-Pérez, J. C., García, N., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Toxic effects of Cr (VI) and Cr (III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquatic Toxicology*. 100(4): 329-338.

Jasso-Chávez, R., Torres-Márquez, M. E., & Moreno-Sánchez, R. (2001). The membrane bound L-and D-lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 390(2): 295-303.

Jiménez-Millán, A., & Ruiz-Moreno, M. (2010). Enfermedad de Wilson. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica*. Madrid: SEGHNPAEP, ERGON (ed) ISBN: 978-84-8473-869-5. Pp189-197.

Kumar-Suresh, K., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., & Shin, K. H. (2015). Microalgae: A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and environmental safety*. 113: 329-352 doi: 10.1016 / j.ecoenv.2014.12.019.

Lenntech. Water Treatment Solutions©. *Efectos del Cadmio sobre la Salud*. (2015a) <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cd.htm#Efectos%20del%20Cadmio%20sobre%20la%20salud> Consultado el 17 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].

Lenntech. Water Treatment Solutions©. *Efectos del Cobre sobre la Salud*. (2015b). <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cd.htm#Efectos%20del%20Cadmio%20sobre%20la%20salud> Consultado el 17 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].

- Ligeza, S., & Wilk-Woźniak, E. (2011). The occurrence of a *Euglena pascheri* and *Lepocinclis ovum* bloom in an oxbow lake in southern Poland under extreme environmental conditions. *Ecological indicators*. 11(3): 925-929.
- Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I. S., Olín-Sandoval, V., García-García, J. D., 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.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., García-Contreras, R., Zepeda-Rodríguez, A., Marín-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2013). Cd<sup>2+</sup> resistance mechanisms in *Methanosarcina acetivorans* involve the increase in the coenzyme M content and induction of biofilm synthesis. *Environmental Microbiology Reports*. 5(6), 799-808.
- Lira-Silva, E., Santiago-Martínez, M. G., Hernández-Juárez, V., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R., & Jasso-Chávez, R. (2012). Activation of methanogenesis by cadmium in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PloSone*. 7(11), e48779.
- Machado-Estrada, B., Calderón, J., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2013). Accumulation of arsenic, lead, copper, and zinc, and synthesis of phytochelatins by indigenous plants of a mining impacted area. *Environmental Science and Pollution Research*. 20(6): 3946-3955.
- Marchioretto, M. M., Bruning, H., Loan, N. T. P., & Rulkens, W. H. (2002). Heavy metals extraction from anaerobically digested sludge. *Water Science & Technology*. 46(10):1-8.
- Marín-Galvín, R. (2015). Características físicas, químicas y biológicas de las aguas (2015).  
[http://api.eoi.es/api\\_v1\\_dev.php/fedora/asset/eoi:48101/componente48099.pdf](http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:48101/componente48099.pdf)  
Empresa Municipal de Aguas de Córdoba S.A EMACSA ©. Control de Calidad, Calidad y Medio Ambiente, Córdoba España. Consultado el 16 de Octubre del. Disponible [en línea].

- Maroto-Arroyo, M. E., and Rogel-Quesada, J. M. (2004). <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib15/028.pdf> Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección Ambiental de Suelos .Guadalajara, México. Consultado el 16 de Octubre del. Disponible [en línea]. Pp 297-305.
- Martínez-Flores, K., Souza-Arroyo, V., Bucio-Ortiz, L., Gómez-Quiroz, L. E. & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicológica Argentina*. 21(1): 33-49.
- Mejía-Sandoval, G., (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1:77-99.
- Méndez, J. P., Roma, A. D., & García, F. P. (2008). Plant contamination and phytotoxicity due to heavy metals from soil and water. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10(1), 19-44.
- Mendoza-Cózatl, D. G., & Moreno-Sánchez, R. (2005a). Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochemistry et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1706(1): 88-97.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005b). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(4): 653-671.
- Mendoza-Cózatl, D. G., Rodríguez-Zavala, J. S., Rodríguez-Enríquez, S., Mendoza-Hernandez, G., Briones-Gallardo, R., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Phytochelatin cadmium sulfide high molecular mass complexes of *Euglena gracilis*. *FEBS Journal*. 273(24): 5703-5713.
- Mendoza-Coatzl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., & Moreno-Sánchez, R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiologia Plantarum*. 115(2): 276-283.

- Montero, R., Serrano, L., Araujo, A., Dávila, V., Ponce, J., Camacho, R., & Méndez, A. (2006). Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 21(5): 335-342.
- Moreno-Sánchez, R., Covián, R., Jasso-Chávez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Moisés, F., & Torres-Márquez, M. E. (2000). Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1457(3): 200-210.
- Nieboer, E., & Richardson, D. H. (1980). The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*. 1(1): 3-26.
- Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA1-1994. “Bienes Y Servicios. Método de Prueba para la determinación de Cadmio, Arsénico, Plomo, Estaño, Cobre, Fierro, Zinc y Mercurio en Alimentos, Agua Potable y Agua Purificada por Espectrometría de Absorción Atómica.”
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. "Salud Ambiental, Agua para Uso y Consumo Humano-Límites Permisibles se Calidad y Tratamientos a que debe someterse el Agua para su potabilización".
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 de la Federación, D. O. (2000). Modificación a la norma oficial Mexicana. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, Octubre, 20, 1-8.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD©). (2012). <http://www.oecd.org/environment/indicators-modellingoutlooks/49884278.pdf>  
Perspectivas ambientales de la OCDE hacia 2050. Consecuencias de la inacción. SBN 978-92-64-1221-6. Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, Roma, (2002). [ftp://ftp.fao.org/agl/aglw/docs/cropsdrops\\_s.pdf](ftp://ftp.fao.org/agl/aglw/docs/cropsdrops_s.pdf) *Agua y cultivos, logrando el uso óptimo del agua en la agricultura*. Consultado el 18 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2006). [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/gdwg3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwg3_es_full_lowres.pdf) *Guías para la calidad del agua potable*. Vol. 1. Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Ouyang, H., Kong, X., He, W., Qin, N., He, Q., Wang, Y. & Xu, F. (2012). Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Chinese Science Bulletin*. 57(25): 3363-3370.
- Park, K. Y., Lim, B. R., & Lee, K. (2009). Growth of microalgae in diluted process water of the animal wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*. 59(11), 2111-2116.
- Peña-Castro, J. M., Martínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2004). Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. *Chemosphere*. 57(11): 1629-1636.
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Canizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*. 64(1): 1-10.
- Perspectivas ambientales de la OECD hacia el 2050. (2008). [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-environmental-outlook-to\\_2030\\_9789264040519-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-environmental-outlook-to_2030_9789264040519-en). Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *In Anales de la Facultad de Medicina*. 63(1):51-64.
- Ramos-Martínez, E., Olivos-García, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Sánchez, E. C., Tello, E., El-Hafidi M., Saralegui A., Pineda E., Delgado J., Montfort, I., & Pérez-Tamayo

- R. (2009). Entamoeba histolytica: oxygen resistance and virulence. *International Journal for Parasitology*. 39(6): 693-702.
- Rodríguez-Zavala, J. S., Ortiz-Cruz, M. A., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Characterization of an aldehyde hydrogenase from *Euglena gracilis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53(1): 36-42.
- Rodríguez-Zavala, J. S., García-García J. D., Ortiz-Cruz M. A., Moreno-Sánchez R. (2007). Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous substances & environmental engineering*. 42: 1365-78.
- Rosas-Rodríguez H. (2005). Contaminación de sedimentos del Río Anoaia por metales pesados (Barcelona-España). Universidad Privada Boliviana. *Investigación y desarrollo*. (5): 75-89.
- Sánchez, E., Colmenarejo, M. F., Vicente, J., Rubio, A., García, M. G., Travieso, L., & Borja, R. (2007). Use of the water quality index and dissolved oxygen deficit as simple indicators of watersheds pollution. *Ecological indicators*. 7(2): 315-328.
- Sánchez-Thomas, R., Moreno-Sánchez, R., & García-García, J. D. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*. 131: 19-31
- Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Zepeda-Rodríguez, A., & Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of hazardous materials*. 288: 104-112.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2009). <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales> Metales Pesados. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) México. Consultado el 17 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2015) [www.semarnat.gob.mx/sites/default/files/../rio\\_sonora\\_28\\_enero.pdf](http://www.semarnat.gob.mx/sites/default/files/../rio_sonora_28_enero.pdf) Remediación

- Ambiental, Río Sonora, Enero*. Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Segretin, M. E. (2013) <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Biomonitoreo%20y%20tratamiento%20de%20efluentes.pdf> *Biomonitoreo ambiental y tratamiento de efluentes. Comité Argentino para la Información y Desarrollo de Biotecnología ArgenBio*. Consultado el 17 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Tashiro, M., Furihata, K., Fujimoto, T., Machinami, T., & Yoshimura, E. (2007). Characterization of the malate-aluminum (III) complex using  $^1\text{H}$  and  $^{27}\text{Al}$  NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 45(6): 518-521.
- Torres, H. W. (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*. 26: 19-53.
- Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A., & Gaur, J. P. (2006). Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short and long-term exposure to  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . *Chemosphere*. 62(4): 538-544.
- UN-Water (is the United Nations interagency coordination ONU). (2005) [http://www.unwater.org/downloads/Water\\_facts\\_and\\_trends.pdf](http://www.unwater.org/downloads/Water_facts_and_trends.pdf) *Water: Facts and trends. WBCSD (World Business Council for Sustainable Development)*. Consultado el 16 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO) <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/world-water-scenarios/> *Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos (WWAP)*. Consultado el 8 de Agosto de 2015. Disponible [en línea].
- Velasco Trejo, J. A., de la Rosa Pérez, D. A., Ochoa, G. S., & Volke Sepúlveda, T. L. (2004). <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/372.pdf> *Primer informe del proyecto: Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. Instituto Nacional de Ecología (INE). ISBN: 968-817-557-9. 1:2-14

- Volke, S. T., Velasco, T. A., De la Rosa, P. A., & Solórzano, O. G. (2005). [http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgcenica/metales\\_eii2005.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/dgcenica/metales_eii2005.pdf) *Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Etapa II.* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. Instituto Nacional de Ecología (INE). Consultado el 18 de Octubre del 2015. Disponible [en línea].
- Yoval-Sánchez, B., Jasso-Chávez, R., Lira-Silva, E., Moreno-Sánchez, R., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2011). Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 43(5): 519-530.