



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Remoción de materia orgánica por *E. gracilis* heterotrófica a partir de desechos de cultivos celulares.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ROCÍO DANIELA FEREGRINO MONDRAGÓN

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. RICARDO JASSO CHÁVEZ



Los Reyes Iztacala, Tlanepantla Edo. De México, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Hugo Virgilio Perales Vela
Vocal:	M. en C. Gloria Garduño Solórzano
Secretario:	Dr. Ricardo Jasso Chávez
1^{er} Suplente:	Dr. José Salud Rodríguez Zavala
2^{er} Suplente:	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.

Este proyecto fue apoyado por los donativos de ciencia básica CONACyT #156969 (Dr. Ricardo Jasso Chávez) y por el proyecto de infraestructura #281428 (Dr. Rafael Moreno Sánchez).

Asesor del tema:

Dr. Ricardo Jasso Chávez

Sustentante:

Rocío Daniela Feregrino Mondragón

DEDICATORIA

A mis padres Irma y Vicente quienes con su amor, paciencia, esfuerzo y sacrificio me han permitido llegar a cumplir todas mis metas, y que con su ejemplo me han enseñado a siempre dar la mejor versión de mí.

A mi hermana Samantha por su cariño y apoyo incondicional , durante todo este proceso, por estar conmigo en todas las noches de desvelo y por soportar mis locuras.

A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mi una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mis amigos Pedro y Adriana por apoyarme cuando más lo s necesito, por escucharme en momentos difíciles y por todo su cariño y apoyo a lo largo de mi carrera.

A mi tutor el Dr. Ricardo Jasso, quien desde el primer momento me brindó su amistad, su confianza y apoyo para la realización de este proyecto, y por sus consejos que me han guiado en el inicio de mi carrera como profesional.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad, por todos esos buenos momentos compartidos que alegraron mi día a día, por sus asesorías y consejos tanto académicos como personales. Gracias a todos, los llevaré siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a todo el equipo que conforma el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Al Dr. Israel Pérez por sus asesorías y consejos en la realización de esta investigación.

De igual manera mis agradecimientos a mi jurado: Dr. Hugo Perales, Mtra. Gloria Garduño, Dr. José Salud y Biol. Angélica Mendoza; gracias por su atención, su asesoría y sus aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A las instituciones que financiaron este proyecto, apoyo sin el cual no se habría podido llevar a cabo.

Finalmente gracias a todos los docentes y a la Universidad Nacional Autónoma de México por su motivación a desarrollarme como persona y profesional.

RESUMEN

El cultivo óptimo de *Euglena gracilis* se ha convertido en un tema de interés para su uso en biorremediación y para aprovechar su biomasa en la obtención de biocombustible y otros metabolitos de valor biotecnológico. A pesar de los avances obtenidos, aún se requiere optimizar su producción para reducir los costos y aprovechar eficientemente sus propiedades. En un intento por remover materia orgánica en aguas de desecho, se cultivó *E. gracilis* heterotrófica bajo condiciones aerobias y microaerofílicas, en presencia de sobrenadantes de desecho (SN de desecho) de cultivos de células eucariontes, ya que contienen una mezcla de nutrientes remanentes y productos secundarios que *E. gracilis* podría consumir y aprovechar para su crecimiento y la obtención de biomasa y metabolitos de interés biotecnológico. El análisis de los SN de desecho indicó que estos contenían glucosa, glutamato y etanol en concentraciones milimolares (mM) y albúmina, la cual se hidrolizó incubando el SN en presencia de papaína antes de añadirlos al medio, para favorecer la utilización de los aminoácidos presentes. Se realizaron cinéticas de crecimiento de siete días, durante los cuales se midió el consumo de los sustratos en el medio, mediante ensayos enzimáticos y cromatografía de gases. Al final de la curva se cosecharon las células y se aislaron fracciones mitocondriales y citosólicas para determinar su participación en la degradación de las fuentes de carbono. Para maximizar el consumo de materia orgánica y obtener metabolitos de relevancia biotecnológica, se incubaron suspensiones celulares de alta densidad en presencia de los sobrenadantes de desecho y se determinaron los contenidos de biomasa, proteína, paramilo y lípidos totales, de células provenientes de medios definidos o de sobrenadantes. La densidad celular obtenida en medios suplementados con SN de desecho en condiciones aerobias fue de 2.5×10^6 céls/mL, siendo el etanol el sustrato más abundante en el medio y el más utilizado. Similar a las mitocondrias aisladas de células cultivadas en G + M, se demostró que las mitocondrias aisladas de células cultivadas en medios con SN de desecho consumieron O_2 y formaron un gradiente electroquímico transmembranal que podría estar ligado a la síntesis de ATP, por la adición de glutamato, prolina y glutamina, aminoácidos resultantes de la hidrólisis de la albúmina. El consumo de sustratos y producción de metabolitos de interés comercial en cultivos de alta densidad y provenientes de medios definidos, no presentó diferencias significativas, pero tuvo la ventaja de que los SN disminuyeron su carga de materia orgánica. *E. gracilis* fue capaz de duplicarse y producir metabolitos de interés biotecnológico, a partir de los SN de desecho gracias a su metabolismo mitocondrial.

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE GRÁFICAS	8
2. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	9
3. INTRODUCCIÓN	11
3.1. Contaminación del agua.	11
3.2. Tratamiento y reutilización de desechos orgánicos.	12
3.3. <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica.....	12
3.3.1. Metabolismo de <i>Euglena gracilis</i> heterotrófica.....	13
3.3.2. Metabolismo Aerobio.	13
3.3.3. Metabolismo Microaerófilico.....	14
3.3.4. Metabolitos de interés biotecnológico.	16
4. ANTECEDENTES	17
5. JUSTIFICACIÓN.....	18
6. HIPÓTESIS	18
7. OBJETIVOS	19
7.1. Objetivo General.	19
7.2. Objetivos Particulares.	19
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
8.1. Condiciones de cultivo.....	19
8.2. Densidad celular.	21
8.3. Consumo de sustratos.	21
8.4. Consumo de O ₂ y producción de CO ₂	24
8.5. Cosecha de células.	24
8.6. Determinación de Proteína intracelular.....	24
8.7. Peso seco.....	25
8.8. Extracción de lípidos totales.	25
8.9. Derivatización de ácidos grasos.....	25
8.10. Extracción y determinación de Paramilo.....	26
8.11. Aislamiento de fracciones mitocondriales y citosólicas.	26
8.12. Medición de actividades mitocondriales.....	27
8.13. Medición de potencial de membrana.	28

8.14. Actividades enzimáticas.	28
9. RESULTADOS.....	29
9.1. Crecimiento de <i>E. gracilis</i> heterotrófica en sobrenadantes de desecho.	29
9.2. Consumo de sustratos.	32
9.3. Consumo de O ₂ y producción de CO ₂	33
9.4. Actividades mitocondriales.	34
9.5. Generación del potencial electroquímico transmembranal.	35
9.6. Actividades enzimáticas citosólicas.....	36
9.7. Cultivos de alta densidad.	37
9.7.1. Cinética de crecimiento.....	37
9.7.2. Consumo de sustratos.....	38
9.7.3. Rendimiento de biomasa y metabolitos de interés biotecnológico.....	39
10. DISCUSIÓN.....	40
11. CONCLUSIONES	44
12. REFERENCIAS.....	44
13. APÉNDICE	48
Apéndice 1. Composición de las soluciones de minerales traza del medio Hunter.	48
Apéndice 2.Preparación de la solución de vitaminas para el medio de cultivo.	49

1. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* cultivada en la mezcla de sobrenadantes de desecho esterilizados por filtración.

Gráfica 2. Contenido de albúmina en sobrenadantes de desecho después de 16h de incubación con 100µg/ml de papaína.

Gráfica 3. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* cultivada en presencia de sobrenadantes de desecho previamente incubados 12h con papaína y esterilizados por autoclave.

Gráfica 4. Consumo de O₂ y producción de CO₂ a lo largo de la curva en condiciones microaerófilas.

Gráfica 5. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* cultivada en presencia de sobrenadantes de desecho con inóculos iniciales de 2×10^6 céls/mL y provenientes de medios con SN de desecho, medio definido con glutamato + malato y medio definido de glucosa.

Gráfica 6. Consumo de sustratos en medios con SN de desecho como fuente de carbono, con inóculos iniciales de alta densidad provenientes de medios con sobrenadante de desecho, glutamato + malato o glucosa respectivamente.

Gráfica 7. Rendimiento de biomasa en peso seco y proteína, paramilo y lípidos totales. Rendimientos en medios con SN de desecho como fuente de carbono con inóculos iniciales de alta densidad provenientes de medios con SN de desecho, glutamato + malato o glucosa respectivamente.

2. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2-OG 2- oxoglutarato

Acetil –CoA Acetil- Coenzima A

ADH NAD⁺-Alcohol deshidrogenasa

ALDH NAD⁺-Aldehído deshidrogenasa

AOX Oxidasa alterna

ATK Acetato tiocinasa

ATP Adenosíntrifosfato

BHT Butilhidroxitolueno

BSA Del inglés: Bovine serum albumin: albúmina sérica de bovino

CCCP M-clorocarbonilcianurofenil hidrazona

CONAGUA Comisión Nacional del Agua

DBO Demanda bioquímica de oxígeno

DQO Demanda química de oxígeno

DTT Ditiotreitól

DW Del inglés: dry weight

EGTA Del inglés: EthyleneGlycol Tetra aceticAcid

EM NADP⁺-Enzima málica

EtOH Etanol

FID Del inglés: Flameionization detector

FRD Fumaratoreductasa

G + M Glutamato + malato

GABA Del inglés: gamma-Aminobutyricacid

GDH NADP⁺-Glutamato deshidrogenasa

Glc Glucosa

Glc6P Glucosa - 6 – fosfato

Glc6PDH NADP⁺-Glucosa-6–fosfato deshidrogenasa

HEPES Del inglés: hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid

HK Hexocinasa

INCICH Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

L-AlaDH L-alanina deshidrogenasa

L-iLDH Del inglés: NAD⁺-independentL-lactatedehydrogenase

L-Lac L-lactato

L-LDH NAD⁺-L- lactato deshidrogenasa

NAD⁺MDH NAD⁺-Malato deshidrogenasa

MOPS Del inglés: 3-Morpholinopropanesulfonic acid

NAD⁺ Nicotinadenindinucleótido

NAD⁺LDH Lactato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺

NADH+H⁺ Nicotinadenindinucleótido en su forma reducida

NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida

ONU Organización de las Naciones Unidas

PCA Del inglés: perchloric acid

PMSF Del inglés: phenylmethylsulfonyl fluoride

PNO Piruvato:NADP⁺ oxidorreductasa

Pyr Piruvato

RQ Rodoquinona

SDH Succinato deshidrogenasa

SDS Del inglés: sodium dodecyl sulfate

SN Sobrenadante de desecho

SSDH Succinato semialdehído deshidrogenasa

TMPDox Del inglés: tetramethyl-p-phenylenediamine oxidase

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

UQ Ubiquinona

α-KGDC NADP⁺-α-cetoglutaratodescarboxilasa

α-KG α - cetoglutarato

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Contaminación del agua.

El agua es un recurso natural indispensable para todos los seres vivos y es un elemento importante en el desarrollo sustentable de cualquier país (Oswald, 2011). Sin embargo, las actividades humanas producen aguas residuales y la gran mayoría se vierte directamente en el medio, deteriorando la calidad del agua, lo que también afecta la salud humana y la productividad económica (UNESCO, 2017).

La calidad del agua se mide con indicadores de la cantidad de materia orgánica biodegradable (demanda bioquímica de oxígeno, DBO), la materia orgánica no biodegradable (demanda química de oxígeno, DQO) y los sólidos suspendidos totales, dentro de los cuales se incluye la materia orgánica en suspensión, el aumento en el valor de estos indicadores incide en la afectación de los cuerpos de agua (CONAGUA, 2016). Según dichos parámetros, en México las regiones hidrológico-administrativas que corresponden a las aguas del Valle de México, Golfo Norte, Lerma-Santiago-Pacífico y Golfo Centro, se consideran como fuertemente contaminadas (Oswald, 2011). Dicha característica acelera el envejecimiento natural y acorta considerablemente la vida de los cuerpos de agua en un proceso llamado eutrofización, en el que al haber un exceso de nutrientes como nitrógeno, fósforo y materia orgánica, hay un crecimiento acelerado de microalgas y cianobacterias que al llegar a su máxima densidad poblacional decaen y se asientan en el fondo, lo que conlleva a su degradación realizada principalmente por bacterias que consumen el O₂ disuelto, haciendo poco factible la vida de la mayoría de las especies endémicas que forman ese ecosistema, provocando además que el cuerpo de agua deje de ser aprovechable para el abastecimiento de agua potable y para otras actividades (López et al. 2003).

El crecimiento urbano y poblacional aunado al problema de contaminación del agua, han incrementado el grado de presión sobre el recurso hídrico, que según la clasificación de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), para las aguas del Valle de México existe un grado de presión muy alto, lo que indica que la región está sometida a un estrés hídrico extremo. En este contexto, es indispensable el desarrollo de tecnologías orientadas al cuidado del ambiente, la reutilización de los residuos y a la generación de energías limpias de bajo costo (Oswald, 2011).

3.2. Tratamiento y reutilización de desechos orgánicos.

Frente al deterioro de la calidad del agua, el tratamiento de las aguas residuales cobra una gran importancia, ya que estas pueden ser una fuente sustentable de energía, nutrientes y otros subproductos útiles (UNESCO, 2017). Uno de los métodos más usados para el tratamiento de aguas residuales es la biorremediación, la cual logra la remoción o biotransformación de contaminantes, incluyendo nutrientes y xenobióticos. Este tratamiento biológico depende de la capacidad de los organismos para degradar los contaminantes orgánicos a productos inocuos como dióxido de carbono, agua y biomasa (Olguín, 2003).

La biorremediación asistida por microalgas es un tema de gran interés debido a su capacidad para degradar nutrientes como nitrógeno, fósforo y materia orgánica, que son los principales causantes de la eutrofización. Además, la ilimitada fuente de nutrientes de las aguas residuales provee un medio de crecimiento sostenible para las algas, incrementando la densidad y el contenido de lípidos, por lo que se considera como una posible fuente de extracción de biodiesel (Mahapatra et al, 2013).

Las lagunas algales de oxidación y estabilización han sido uno de los principales métodos para llevar a cabo dicho proceso, y han resultado ser efectivas y de bajo costo. El uso de Cyanophyta ha sido efectivo para la depuración de aguas residuales urbanas disminuyendo los valores en DBO al usar organismos y nitrógeno. A partir de ello también se han desarrollado lagunas de alta densidad algal con el fin de dar un tratamiento más eficiente a los desechos orgánicos, con la producción de biomasa para alimentación animal. Se han utilizado especies de Chlorophyta y a la Euglenophyta *Euglena gracilis*, ya que han demostrado ser eficientes para degradar diversos compuestos orgánicos, aunque no se cuenta con mucha información sobre los mecanismos y los procesos biológicos que se llevan a cabo en estos (Candela, 2016).

3.3. *Euglena gracilis* heterotrófica.

Una de las especies más estudiadas es *Euglena gracilis* Klebs, la cual pertenece al grupo de los Euglenoideos, un grupo monofilético de flagelados unicelulares de vida libre que se encuentran en su mayoría en cuerpos de agua continentales. Se caracterizan por poseer una película constituida de glicoproteínas, esta es flexible y le confiere a las células la capacidad de cambiar su forma a través del movimiento, lo que se le conoce como metabolia, y adaptar su tamaño según el ambiente en el que se encuentre (Leander et al. 2007; Farmer, 2012). Pueden perder sus cloroplastos cuando se cultivan en la oscuridad llevando a cabo un

metabolismo heterótrofo y los recuperan una vez que se cultivan en presencia de luz. El género *Euglena* se conoce además por producir paramilo (β -1,3 glucano) como polisacárido de reserva. A su vez el paramilo puede ser transformado a ésteres de cera en condiciones de hipoxia, siendo ésta una prometedora materia prima para producir biodiesel (Schwartzbach et al. 1975; Osafune et al. 1990). Se ha determinado que *Euglena* puede crecer en condiciones aeróbicas y microaerofílicas en un amplio intervalo de pH de 3 a 8, su metabolismo puede ser fotosintético con la producción de O_2 en presencia de luz, o heterótrofo con el consumo de sustratos orgánicos (Santiago-Martínez et al., 2015).

3.3.1. Metabolismo de *Euglena gracilis* heterotrófica.

Se ha demostrado que *Euglena gracilis* heterotrófica puede consumir una amplia variedad de sustratos, dicho consumo puede cambiar dependiendo de la concentración de O_2 , por lo que se presentan características particulares para el metabolismo aerobio y microaerofílico (Tucci et al., 2010).

3.3.2. Metabolismo Aerobio.

En condiciones aeróbicas los sustratos más utilizados para cultivar a *E. gracilis* son: etanol, glutamato, malato, DL- lactato y glucosa (Jasso-Chávez et al., 2010; Lira-Silva et al., 2011). De ellos, el etanol, es el que se consume con mayor velocidad, ya que éste puede difundir a través de la membrana plasmática y mitocondrial, y una vez en la matriz es oxidado a acetaldehído por la enzima NAD^+ -ADH con la producción de NADH. Así mismo, el acetaldehído es oxidado a acetato por la NAD^+ -ALDH aumentando la producción de NADH, mientras que se ha propuesto que el acetato podría ser usado por la acetato tiocinasa para sintetizar Acetil-CoA y entrar al ciclo de Krebs (Figura 1) (Yoval-Sánchez et al., 2011). El glutamato en combinación con el etanol también incrementó la producción de biomasa, este es metabolizado por la GABA-2-oxocetoglutarato aminotransferasa y la succinato-semialdehído deshidrogenasa, ésta última enzima junto con la α -KGDC en *Euglena* reemplazan la función de la 2-oxocetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de Krebs común (Buetow, 1989; Rodríguez-Zavala et al., 2006).

En el citosol, el malato puede ser oxidado a piruvato + CO_2 por la $NADP^+$ -ME con la producción de NADPH o ser transportado en conjunto con el glutamato a la matriz mitocondrial por medio de la lanzadera malato-aspartato y ser oxidado en el ciclo de Krebs por la NAD^+ -MDH (Buetow, 1989; Lira-Silva et al., 2011). Por otro lado, el D y L-lactato externos o producidos por la glucólisis son oxidados en la mitocondria por las D- y L- i LDH. Estas enzimas son membranales y transfieren

directamente los electrones de la oxidación de lactato a la ubiquinona, de esta forma entran a la cadena respiratoria (Jasso-Chávez et al. 2001). Otra ramificación de la cadena respiratoria de *Euglena* es la vía de la Oxidasa Alterna resistente a cianuro que transfiere directamente los electrones del ubiquinol al O₂ y que está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo (Castro-Guerrero et al. 2004).

Se ha reportado que el crecimiento de *E. gracilis* es menor cuando la fuente de carbono es glucosa, requiriendo concentraciones mayores a 30 mM en el medio de cultivo (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003); una vez que comienza su consumo, ya sea como sustrato externo o por la degradación del paramilo, la glucosa es convertida a piruvato por la vía glucolítica. Sin embargo, *Euglena* no posee un complejo de piruvato deshidrogenasa, por lo que el piruvato es reducido por una NAD⁺-LDH o por una Piruvato: NADP oxidorreductasa, cuando se encuentra en condiciones de hipoxia ya que ésta última es inactivada por O₂ (Jasso-Chávez et al. 2001).

3.3.3. Metabolismo Microaerófilico.

En condiciones de baja tensión de O₂ la *Euglena* sintetiza ésteres de cera de cadena mediana a larga, siendo el miristil miristato (C: 14) el de mayor abundancia, a través de un proceso llamado fermentación de ésteres de cera, que se realiza parcialmente en la mitocondria con la degradación del paramilo, en el cual la enzima PNO descarboxila el piruvato proveniente de la glucólisis a acetyl-Co-A, el cual es a su vez usado como aceptor final de electrones y como precursor para la síntesis de ácidos grasos. Los ácidos grasos son reducidos a alcoholes, esterificados con otros ácidos grasos y acumulados en el citosol en forma de ceras (Tucci et al. 2010).

3.3.4. Metabolitos de interés biotecnológico.

Euglena gracilis sintetiza varios compuestos de interés para la producción industrial como son: vitamina E, ésteres de ceras, aminoácidos y paramilo (Buetow, 1989). Este último se compone de cadenas lineales de glucosa con enlaces β -1,3 y es sintetizado en presencia de un exceso de sustratos en el medio, éste se almacena en forma de gránulos en el citoplasma y puede exceder el 50% del peso seco de la célula (Kiss et al. 1988; Kuda et al., 2009).

El paramilo se considera un compuesto con potencial para el uso médico y veterinario, ya que ha presentado efectos inmuno-estimulantes. Incluso derivados sulfatados del paramilo han mostrado tener una actividad anti-VIH (Koizumi et al. 1993). Adicionalmente, se encontró actividad antibacteriana y activación de macrófagos mediante la adición de cargas positivas al polisacárido (Sakagami et al., 1989). Así mismo, éste polisacárido ha sido usado en la dieta de especies de importancia comercial para activar su respuesta inmune y promover el crecimiento. Se ha probado también que este polímero posee actividad antitumoral y anti-infecciosa en animales y posiblemente en humanos (Rodríguez-Zavala et al., 2006). El paramilo o extractos de células de *Euglena*, también se han utilizado en alimentos y bebidas incrementando su valor nutricional, al igual que en cosméticos (Shibakami et al., 2013). Con la adición de grupos acilo al paramilo se ha mostrado su potencial como componente de materiales termoplásticos, y sus residuos pueden ser utilizados como fertilizantes (Shibakami et al., 2014).

Otro de los productos de interés resultado del metabolismo de *E. gracilis* son las ceras, éstas se acumulan en el citosol durante su metabolismo microaerófilico y pueden alcanzar hasta 40 μ g de ésteres de cera (10^6 células⁻¹) (Inui et al., 1992). Se sabe que el ácido graso saturado que más sintetiza *E. gracilis* es el ácido mirístico (C14); sin embargo, en un estudio en el que se cultivó a *Euglena* en aguas residuales domésticas sin tratamiento previo, se encontró un mayor contenido de ácidos grasos de 18 carbonos como el ácido esteárico (C18), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolenico (C18:3), representando una abundancia de 50%, y de ácido palmítico con un 42%. Dicho contenido de ácidos grasos hace que el aceite obtenido de *Euglena* tenga propiedades adecuadas para su uso como biodiesel, ya que los aceites con mayor cantidad de palmitato y oleato tienen una mejor estabilidad oxidativa, mayor ignición y lubricación (Mahapatra et al., 2013)

Por todo lo anterior, el cultivo de *Euglena gracilis* se ha convertido en tema de interés para su uso como biorrefinería, para la obtención de biocombustible

y biomasa de alto valor, aunque aún se requiere optimizar su producción para reducir los costos y aprovechar eficientemente sus propiedades.

4. ANTECEDENTES

Euglena gracilis tiene la capacidad de catabolizar varios sustratos simultáneamente. Sin embargo, cuando se cultiva heterotróficamente en la oscuridad y aerobiosis con la combinación de glutamato + malato + etanol, se incrementa la producción de biomasa alcanzando 29×10^6 cél/mL (10.8 g peso seco x L⁻¹), en comparación con la combinación de glutamato + malato + glucosa, en donde se obtienen 20×10^6 céls/mL. Por su parte, en presencia de sólo glucosa 5×10^6 céls/mL. El alto rendimiento de biomasa obtenido con la combinación de glutamato + malato + etanol se debe a que el 2-oxoglutarato derivado del glutamato y el malato entran al ciclo de Krebs y favorecen el metabolismo del acetato, producto del catabolismo del etanol, consumiendo más del 90% de etanol después de 24 h de incubación. Bajo estas condiciones, la acumulación de paramilo fue menor en cultivos con glucosa o etanol por separado (Rodríguez-Zavala et al., 2006).

Así mismo, se ha evaluado el contenido de ésteres de cera en cultivos microaerófilicos de *E. gracilis* heterotrófica (previamente crecidos en condiciones aerobias) en tres tipos de medios definidos: Koren-Hutner, etanol y glucosa solos, siendo éste último sustrato el que obtuvo un mayor rendimiento con 2.10 g x L⁻¹ de ésteres de cera (Inui, 1983). Esto se debe a que la utilización de glucosa como fuente de carbono favorece la acumulación de paramilo en condiciones aerobias, el cual después es degradado y los esqueletos de carbono son utilizados en la síntesis de ésteres de cera, cuando se pasa a microaerofilia (Schwartzbach, 2017).

También se han realizado cultivos de *Euglena* en medio Koren-Hutner y glucosa-peptona, que después de tres días de incubación aeróbica se pasaron a condiciones anaeróbicas con la suplementación de 1% de ácido oleico. La combinación de estas condiciones dió como resultado un aumento en la producción de biomasa de 15.7g peso seco x L⁻¹ y un mayor rendimiento de ésteres de cera de 7.7 g x L⁻¹, ya que la adición de ácidos grasos insaturados al medio de cultivo, proporciona precursores de la fermentación de ésteres de cera (Tani et al. 1987).

Por otro lado se han realizado cultivos de *E. gracilis* heterotrófica en un medio con melaza, residuo de la cristalización del azúcar de caña, en condiciones aeróbicas a pH de 3.5, con un contenido de 18.7 gx L⁻¹ de azúcares reductores (como glucosa). Posteriormente, se sometieron las células a condiciones

anaerobias y se determinó la biomasa y los ésteres de cera, obteniendo una cantidad de 1.25g peso seco x L⁻¹ y 0.53 g ésteres de cerax L⁻¹, respectivamente (Inui, 1983). Se obtuvo la misma biomasa (1.24g DW x L⁻¹) y un contenido máximo de lípidos de 24.6% al cultivar a *Euglena* en aguas residuales domésticas sin tratamiento. Al mismo tiempo, se evaluó la remoción de nutrientes observándose la remoción del 92% del carbono orgánico total y una tasa de crecimiento fue mayor en comparación con otros géneros de microalgas cultivadas en aguas residuales (Mahapatra, 2013). Estos dos últimos estudios no obtuvieron rendimientos comparables con aquellos obtenidos en medios definidos. Sin embargo, poseen la ventaja de reutilizar residuos de la actividad humana con fuentes de carbono aprovechables para el crecimiento de *Euglena*.

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a los antecedentes indicados sobre la captación de nutrientes, producción de biomasa y metabolitos de valor comercial, tanto en cultivos definidos como experimentales de *Euglena gracilis* heterotrófica, es de interés evaluar su comportamiento en medios de cultivo enriquecidos con residuos orgánicos, ya que como se ha demostrado previamente este protista puede adaptar su metabolismo a las condiciones de su entorno, en lo que se refiere a pH, concentración de O₂ y fuentes de carbono disponibles. Lo anterior da la ventaja de utilizar eficientemente los componentes de dichos desechos, evitando la contaminación por su descarga directa a cuerpos de agua, obteniendo también la disminución de costos en la producción de compuestos de interés biotecnológico como son el paramilo y las ceras. Por ello, en éste proyecto se busca reutilizar y aprovechar sobrenadantes de desecho de cultivos de células eucariotas, ya que estos contienen nutrientes remanentes que *Euglena* podría ser capaz de utilizar.

6. HIPÓTESIS

Si se cultiva a *Euglena* en presencia de sobrenadantes con alto contenido de materia orgánica, entonces este organismo contará con fuentes de carbono suficientes para producir biomasa y compuestos de interés biotecnológico.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General.

Evaluar el catabolismo de *Euglena gracilis* heterotrófica en sustratos provenientes de desechos orgánicos y su efecto en la producción de biomasa y metabolitos de interés biotecnológico.

7.2. Objetivos Particulares.

Determinar el crecimiento de *E. gracilis* en condiciones aerobias y microaerofílicas, en medios enriquecidos con sobrenadantes de desecho de cultivos celulares (SN de desecho).

Cuantificar los sustratos en los sobrenadantes y determinar su consumo por *E. gracilis*.

Determinar el papel del metabolismo mitocondrial en la remoción de los sustratos orgánicos en cultivos de *E. gracilis*.

Determinar la producción de biomasa, paramilo y lípidos totales en los cultivos de *Euglena* con SN de desecho.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Condiciones de cultivo.

Se realizaron cultivos de *E. gracilis* Klebs heterotrófica (cepa Z like) en condiciones aeróbicas en matraces de 250mL; y microaerofílicos en viales de 100mL sellados herméticamente con tapones de teflón, asegurados con collares de aluminio (Santiago-Martínez et al., 2015), se iniciaron con una densidad celular de 2×10^5 céls/mL y se mantuvieron en incubación con agitación de 7 a 9 días en oscuridad y a 25°C.

Los SN de desecho que se utilizaron para el cultivo de *E. gracilis* se obtuvieron de residuos de cultivos de *Entamoeba histolytica*, células tumorales,

Trypanosoma cruzi, y *Saccharomyces cerevisiae*, del departamento de bioquímica del INCICH.

Tanto a los cultivos con sobrenadantes como a los medios control se les añadieron minerales descritos por Hunter y colaboradores (1956), cuyas concentraciones finales en el medio fueron: 2 mM de MgSO₄, 1.5 mM de NH₄PO₄, 10 mM de KH₂PO₄, 2 mL de minerales traza A y 1mL de minerales traza B (Apéndice 1). Por último, se añadieron 2 ml/L de un stock de vitaminas compuesto por tiamina, FeCl₃ y cianocobalamina (Apéndice 2). La solución de vitaminas y el sobrenadante de levaduras se esterilizaron usando un filtro de 0.2 µm (Millipore, USA) y se añadieron al medio antes de sembrar.

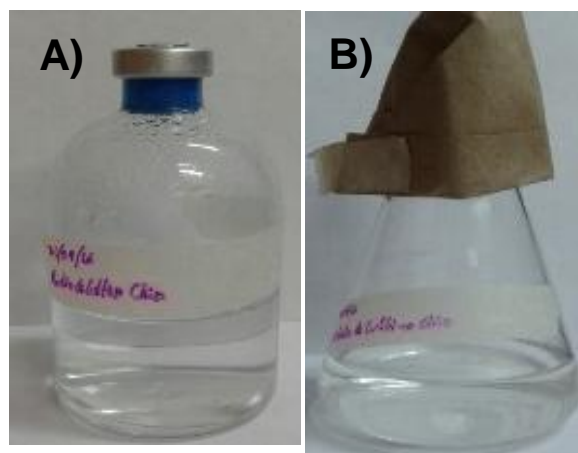


Figura 2. A) Vial utilizado en condiciones Microaerofílicas, B) Matraz Erlenmeyer en condiciones aerobias.

Conforme se determinaba la capacidad de crecimiento, el contenido y consumo de sustratos en el medio, se fueron estableciendo diferentes condiciones de cultivo, con el fin de obtener una condición en la que se aprovecharan lo mejor posible los nutrientes en los SN de desecho, obteniendo un mayor rendimiento en cuanto a producción de biomasa y un bajo costo en la preparación y esterilización del medio.

Primera condición. Inicialmente se cultivó a *E. gracilis* en cada sobrenadante por separado para determinar en cuál concentración había un mayor crecimiento, los sobrenadantes fueron esterilizados por un filtro de 0.2 µm (Millipore, USA), mezclando diferentes volúmenes del sobrenadante con agua destilada y la adición de una solución de vitaminas (1mL/L de cultivo), a un pH cercano al neutro.

Segunda condición. Posteriormente se prepararon los medios de cultivo con la mezcla de todos los sobrenadantes y 1/3 del volumen final de agua destilada, adicionando también vitaminas y minerales esenciales para el crecimiento de *Euglena*, ajustando el pH a 3.5 para evitar la contaminación del cultivo y favorecer

el consumo de los sustratos (principalmente ácidos carboxílicos), la esterilización también fue por filtración.

Tercera condición. Se adicionó papaína pura (50 µg/mL) al medio de cultivo con la mezcla de sobrenadantes de la segunda condición, y se incubó con agitación durante 12 h. Esta incubación se realizó con el fin de degradar la albúmina remanente en el medio y que se pudieran consumir los aminoácidos liberados por la papaína, además de que esto permitiría la esterilización con autoclave sin que se precipitara la albúmina. En ésta condición el pH inicial también se ajustó a 3.5, ya que en dicho valor se favorece la actividad de la enzima. De igual forma se adicionaron vitaminas y minerales al medio de cultivo.

8.1.1. Cultivos de alta densidad

Se hicieron incubaciones con una alta densidad celular inicial (2×10^6 céls/mL aprox.), para evaluar un posible aumento en la velocidad de consumo de sustratos en los desechos. Esto se realizó a partir de células de la cosecha al último día de la curva de crecimiento en condiciones de esterilidad, para así utilizar el paquete de células obtenido como inóculo inicial de medios con sobrenadantes. Además, con el fin de evaluar si existían diferencias en el tipo de cultivo de donde se originaba el inóculo para la resiembra, es decir si provenía de un medio definido o de un cultivo enriquecido con sobrenadantes de desecho, los pellets se obtuvieron bajo condiciones estériles tanto de cultivos en medio definido (Hutner con glucosa y con glutamato + malato como fuentes de carbono) como de cultivos en medio con sobrenadantes.

8.2. Densidad celular.

Para determinar el crecimiento de todas las condiciones, cada día se tomaron alícuotas de 50 µL del cultivo en condiciones de esterilidad, de las cuales se realizó una dilución 1:10 con agua destilada y 5µL de HCl al 0.1%, para determinar la densidad celular con una Cámara de Neubauer. También se tomó 1mL de los cultivos para la cuantificación de sustratos presentes en el medio y se midió el pH a lo largo de la curva de crecimiento (Rodríguez – Zavala et al., 2010).

8.3. Consumo de sustratos.

Se determinó la concentración de sustratos en el medio de acuerdo a la metodología descrita por Jasso-Chávez et al. (2001), al inicio y al final de la

curva de crecimiento por ensayos enzimáticos (A, B y C), en un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Agilent, USA) o por cromatografía de gases (D y E), en un Cromatógrafo Shimadzu modelo GC-2010. Para ello se tomaron muestras de 1mL en todas las condiciones de cultivo y se centrifugaron a 14462 x g por 10 min; del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 50 a 200µL de cada muestra para la cuantificación de las fuentes de carbono (Jasso-Chávez et al., 2001).

A) Glutamato.

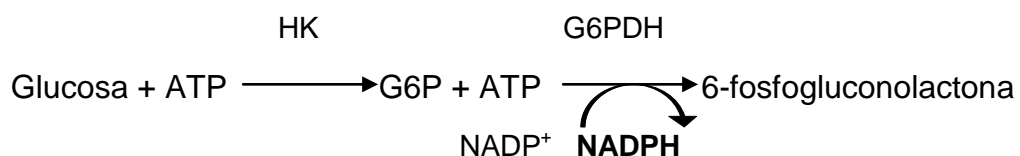
El consumo de glutamato se midió a través de un ensayo enzimático, midiendo la generación de NADPH que absorbe a 340 nm y el cual es producto de la reacción de la glutamato deshidrogenasa que cataliza la oxidación de L-glutamato a 2-oxoglutarato en presencia de NADP⁺



Para llevar a cabo dicha reacción, se utilizaron celdas de cuarzo que contenían: 1 mM de NAD⁺, 1.17 UI de glutamato deshidrogenasa comercial, de 50 a 150 µL del sobrenadante de las muestras y una solución amortiguadora de Tris - Hidracina (150 mM /400 mM), a pH 9, teniendo un volumen final de 2 mL a 37°C (Jasso- Chávez et al., 2001).

B) Glucosa

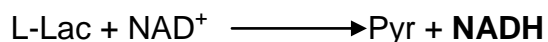
La concentración de glucosa se determinó también por medio de la generación de NADPH producto de una reacción acoplada de la fosforilación de la glucosa en presencia de ATP por la HK, y la oxidación de la glucosa 6- fosfato (Glc6P) por la Glc6P deshidrogenasa con la conversión de NADP⁺ a NADPH. La reacción se llevó a cabo con 3 mM de ATP, 5 mM de MgCl₂, 15 UI de hexocinasa comercial, 10 UI de G6PDH, 0.75 mM de NADP⁺ y 50 a 150 µL del sobrenadante de las muestras en un volumen final de 2 mL con un buffer de 120 mM de KCl, 10 mM de MOPS y 1 mM de EGTA (buffer KME) a pH de 7.2 (Jasso – Chávez et al., 2001).



C) L-Lactato

Para cuantificar el lactato presente en el medio se utilizaron en las celdas de reacción: 0.15 mM de NAD^+ , 27.5 UI de L-LDH comercial, 50 a 150 μL del sobrenadante de las muestras y una solución de 500 mM hidracina y 400 mM glicina pH 9, para asegurar que la reacción llevada a cabo por la L-lactato deshidrogenasa estuviera favorecida hacia la producción de lactato, ya que la hidracina forma un complejo con el piruvato (hidrazona), y de esa forma cuantificar la concentración de lactato en base a la generación de NADH que absorbe a 340nm (Jasso – Chávez et al., 2001).

L-LDH



D) Etanol

Se determinó el consumo de etanol por cromatografía de gases utilizando una columna capilar HP-PlotU de 30 m de largo y 0.32 mm de diámetro interno (Agilent Technologies, USA) y un detector de ionización de flama (FID). Se tomaron 100 μL del sobrenadante de las muestras previamente centrifugadas y se pasaron por un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm (Millex), se inyectaron 2 μL del filtrado y se dejó correr la muestra durante 20 min. La inyección en el cromatógrafo se realizó con las siguientes condiciones: temperatura de la columna 180°C, 75 kPa de presión, flujo total de 24.7 ml/min, y un Split de 75 (Yoval-Sánchez et. al. 2011).

La cantidad de etanol se determinó con el valor del área bajo la curva del pico de etanol, cuyo tiempo de retención es de 3.7 min y se extrapolaron los valores con una curva estándar.

E) Acetato

Para la determinación de acetato en el medio, se le agregaron 10 μL de HCl concentrado al sobrenadante obtenido de las muestras centrifugadas como se describió anteriormente, se filtraron 100 μL de la mezcla, se inyectaron 2 μL , y se dejó correr la muestra durante 20 min en una columna db-1701 (Agilent Technologies, USA) a 230°C, 81 kPa de presión, flujo total de 28 ml/min y un Split de 25 (Jasso – Chávez et al., 2015).

8.4. Consumo de O₂ y producción de CO₂.

Para corroborar que los cultivos microaerofílicos se encontraran en condiciones de hipoxia y para saber si se llevaba a cabo un metabolismo oxidativo, se midió la concentración de O₂ y CO₂ a lo largo de la curva de crecimiento, por medio de cromatografía de gases inyectando 5µL del espacio vacío de los frascos microaerofílicos. Para la determinación de O₂ se utilizó una columna HP-MOLESIEVE, a 200 °C, 100 kPa de presión, flujo total de 13.9 ml/min y un Split de 5, y para medir el CO₂ se utilizó la HP-PLOT/U con un flujo total de 45 ml/min y las mismas condiciones de temperatura, presión y Split que se usaron para medir el etanol (Jasso – Chávez et al., 2015).

Para la cuantificación se tomaron los valores del área bajo la curva del tiempo 0 (el tiempo inicial del cultivo) como el 100% y a partir de ellos se obtuvieron los porcentajes de los días siguientes.

8.5. Cosecha de células.

Las células se cosecharon en la fase estacionaria temprana (día 7 a 8) por centrifugación a 1844 x g por 10 min a 4 °C. Se tomaron muestras del sobrenadante para medir el pH final del cultivo y el botón de células se resuspendió con 50 mL de un buffer compuesto de 250 mM de sacarosa, 10 mM de HEPES y 0.5 mM de EGTA a pH 7.2 (buffer SHE). Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante, el botón de células se resuspendió con el mismo buffer y se llevó a un volumen final de 1 mL, del cual se tomaron 200 µL y se les adicionó BHT al 0.02%. Las muestras se almacenaron a -20°C para posteriormente determinar la cantidad de proteína y extraer los lípidos totales. El resto de la cosecha se utilizó para la determinación del peso seco (Rodríguez – Zavala et al., 2010).

8.6. Determinación de Proteína intracelular

La proteína se determinó adicionando 200 µL de (1% p/V) desoxicolato de sodio a las muestras previamente almacenadas a -20°C en tubos de ensayo de vidrio, se agitaron por vortex y se diluyeron con 1 mL de agua bidestilada, después, se mezcló con 2 mL de reactivo de Biuret y se homogeneizó. Se incubaron los tubos por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 20 min, para eliminar la turbiedad causada por el paramilo. Finalmente, se leyó la absorbancia a 540 nm utilizando una curva estándar preparada con BSA (100mg/mL) para calcular la concentración de proteína (Rodríguez – Zavala et al., 2010).

8.7. Peso seco.

Los pellets de células provenientes de la cosecha lavados con SHE se colocaron en crisoles de porcelana, de los que se obtuvo el peso después de calentarlos a 90°C. Los crisoles con la muestra fueron calentados a la misma temperatura por 6 h, para secar las muestras, posteriormente se colocaron en un desecador hasta que el peso fue constante, después, se dejó enfriar y se pesaron en una balanza analítica (Rodríguez – Zavala et al., 2010).

8.8. Extracción de lípidos totales.

Las células fueron cosechadas a 1844 x g durante 10 min y sonicadas por 5 ciclos 10 s sonicación / 30 s descanso. Se tomaron 25 µL de las muestras sonicadas y se resuspendieron con 2 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) en tubos de ensayo, se añadieron 25 µL de ácido margárico (1 µg/µL) como estándar interno, se agitó por vortex durante 30 s, se añadió 1 mL de solución salina (0.9% NaCl) y se agitó nuevamente por 30 s. Posteriormente, se centrifugaron las muestras en una centrífuga clínica a 3000 rpm por 5 minutos y se obtuvo un sistema bifásico del cual se separó la fase inferior, que contenía las sustancias lipídicas, y se colocó en nuevos tubos de ensayo; se repitió la extracción con la fase superior, que contenía las sustancias no lipídicas. Una vez obtenida la fase lipídica de la segunda extracción se añadió una pizca de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua contaminante, se adicionaron 200 µL de una mezcla de metanol-BHT en caso de que la muestra siguiera turbia. Se filtraron las muestras pasándolas por puntas de micropipeta (de 100-1000 µL) con un filtro de algodón y se evaporaron los solventes con N₂ a 40 °C aprox (El Hafidi et al., 2004).

8.9. Derivatización de ácidos grasos.

Los extractos lipídicos previamente obtenidos se resuspendieron con 100 µL de tolueno y se añadieron 2 mL de una mezcla de metanol-BHT, se homogenizaron las muestras y se adicionaron 50 µL de H₂SO₄ concentrado y 1 mL de solución de 0.9 % (p/V) NaCl, se homogenizó nuevamente, se añadieron 2 mL de n-hexano y se agitó por vortex durante 20 s. Después, se centrifugaron las muestras en centrífuga clínica a 3000 rpm por 5 min se obtuvo un sistema bifásico del cual se separó la fase superior, y se colocó en tubos de ensayo con tapa de rosca, mientras que a la fase inferior se le añadió nuevamente H₂SO₄

concentrado, solución salina y n-hexano para repetir la extracción. La fase obtenida de ambas extracciones se calentó a 90 °C durante 1 h añadiendo n-hexano en caso de que el volumen disminuyera. Posteriormente se colocaron los tubos en hielo para detener la reacción, se evaporaron los solventes con N₂ a 40 °C aproximadamente y se almacenaron las muestras a -20 °C. Para cuantificar los lípidos totales se resuspendieron los extractos obtenidos en 100 µL de n-hexano y se analizaron por cromatografía de gases en una columna omegawax 320 con las siguientes condiciones: 220 °C (programando una rampa de temperatura de 200 a 220 °C aumentando 10 °C a los 5 y 20 min), 75 kPa de presión, flujo total de 66.1 ml/min, y Split de 50 (El Hafidi et al., 2004).

8.10. Extracción y determinación de Paramilo.

Se tomaron alícuotas de 500 µL de los medios de cultivo al último día de la curva de crecimiento (de 0.8 x 10⁶ céls/mL en cultivos microaerofílicos y 2 x 10⁶ céls/mL en cultivos aerobios), se centrifugaron a 1800 x g por 10 minutos al botón de células se le añadieron 50 µL de 30 % (V/V) PCA (ácido perclórico) y se agitó de 1 a 2 min.

Posteriormente se centrifugó a 8327 x g por 2 min, se descartó el sobrenadante y al pellet se le adicionó 1 mL de 1 % (p/V) SDS, se homogeneizaron nuevamente las muestras por vortex y se calentaron en baño maría en agua hirviendo durante 15 min. Al finalizar el tiempo las muestras se centrifugaron a 8327 x g por 15 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets con 1 mL de 0.1 % (p/V) SDS, se centrifugaron las muestras y los pellets se resuspendieron con 1 mL de 1 M NaOH; finalmente, las muestras se guardaron a -20 °C hasta su uso (Rodríguez– Zavala et al., 2010).

Para determinar el contenido de paramilo en las células se utilizó el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois), en el que se mezclaron alícuotas de 20 a 50 µL de las extracciones previamente almacenadas a -20 °C con 600 µL de 5 % fenol y 1250 µL de H₂SO₄ concentrado (95 – 98 %), se homogeneizaron las muestras y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm, utilizando una curva estándar preparada con glucosa (1mg/mL) y como blanco agua destilada aplicando el mismo tratamiento (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003).

8.11. Aislamiento de fracciones mitocondriales y citosólicas.

Se realizaron cultivos de 1 L con SN de desecho, aerobios y microaerofílicos con densidad inicial de 0.4 x 10⁶ céls/mL. Al séptimo día de crecimiento los cultivos

se cosecharon por centrifugación a 3,836 x g por 10 min a 4 °C, el botón de células se resuspendió con 200 mL de buffer SHE pH 7.2, se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió con el mismo buffer, posteriormente se le añadió 1 mM DTT/cisteína y 1 mM PMSF para inhibir la proteólisis, se llevó a un volumen de 40 mL con buffer y se rompieron las células con 3 ciclos de 13 s de sonicación y 1 min de descanso. El homogenado se centrifugó a 614 x g por 10 min a 4 °C, el sobrenadante resultante, que contiene el citosol, mitocondrias y microsomas, se centrifugó a 15,344 x g por 10 min a 4 °C, para separar la fracción mitocondrial (pellet) de el citosol y microsomas (sobrenadante). El pellet fue resuspendido con 10 mL de buffer SHE y se centrifugó nuevamente a 15,344 x g 10 min descartando el sobrenadante y añadiendo BSA deslipidada (20 µL/mL). El sobrenadante anteriormente obtenido (conteniendo citosol y microsomas) se ultracentrifugó a 225,000 x g por 45 min para aislar la fracción citosólica en el sobrenadante resultante. Ambas fracciones se mantuvieron en hielo para determinar actividades enzimáticas y función mitocondrial (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003).

8.12. Medición de actividades mitocondriales.

Para medir la función mitocondrial se determinaron las actividades de la L-iLDH, complejo II (SDH), complejo IV (TMPDox) y Oxidasa Alterna (AOX) (Tabla 1). También se determinó el consumo de O₂ utilizando como sustratos derivados del metabolismo de aminoácidos y aminoácidos que *Euglena* podría consumir del sobrenadante de desecho (Tabla 2). El consumo de O₂ se midió con un electrodo tipo Clark en una celda de 1.7 mL con un buffer de 120 mM KCl, 20 mM MOPS y 2 mM EGTA a pH 7.2 (Buffer KME), saturado de aire (210 µM O₂ a 25 °C) incubando las mitocondrias con agitación constante a 25 °C.

Tabla 1. Sustratos y actividades medidas en fracciones mitocondriales

Sustrato	Actividad/complejo
L-lactato	L- iLDH
Succinato	Complejo II
TMP/ascorbato de sodio	Complejo IV
D- lactato + azida	Oxidasa Alterna

Sustratos para medir el consumo de aminoácidos:

- 10 mM 2- Oxoglutarato
- 5 mM Malato + 10 mM Glutamato
- 5 mM Malato + 10 mM Prolina
- 5 mM Malato + 10 mM Alanina
- 5 mM Malato + 10 mM Glutamina

La velocidad de respiración se calculó considerando una solubilidad del oxígeno de 420 nanoátomos gramo de Oxígeno por mL a una altitud de 2240 m a 25 °C (Jasso- Chávez y Moreno- Sánchez, 2003).

8.13. Medición de potencial de membrana.

La formación del potencial de membrana se determinó en suspensiones de mitocondrias aerobias (0.16 mg de proteína), incubadas a 25 °C en 2 mL de buffer KME con 2 mM Pi, 2 mM de $MgCl_2$ y 50 nM de Rodamina 123 como indicador fluorescente. La señal de fluorescencia se midió a una longitud de onda de 523 nm de emisión y utilizando una longitud de onda de excitación de 494 nm; los sustratos utilizados fueron: 25 μ M malato + 10 mM glutamina, 25 μ M malato + 10 mM glutamato, 25 μ M malato + 10 mM prolina y 25 μ M malato + 1 mM succinato semialdehído (Jasso – Chávez et al., 2001).

8.14. Actividades enzimáticas.

También se evaluaron las actividades de enzimas involucradas en el metabolismo de sustratos presentes en los sobrenadantes de desecho en las fracciones citosólicas como: Malato deshidrogenasa (NAD^+ -MDH), enzima mállica ($NADP^+$ - EM), glutamato deshidrogenasa ($NADP^+$ -GDH), hexocinasa (HK), L-lactato deshidrogenasa (NAD^+ -LDH) y L-alanina DH. La determinación de actividad de estas enzimas se llevó a cabo de la misma forma en la que se cuantificaron los sustratos, en un espectrofotómetro con detector de arreglo de diodos, siguiendo la formación de NADH o NADPH (Jasso – Chávez et al., 2001).

Estas determinaciones junto con las actividades mitocondriales, se evaluaron con el fin de determinar qué vías metabólicas tomaban más importancia en la remoción de las fuentes de carbono en los SN de desecho.

9. RESULTADOS

9.1. Crecimiento de *E. gracilis* heterotrófica en sobrenadantes de desecho.

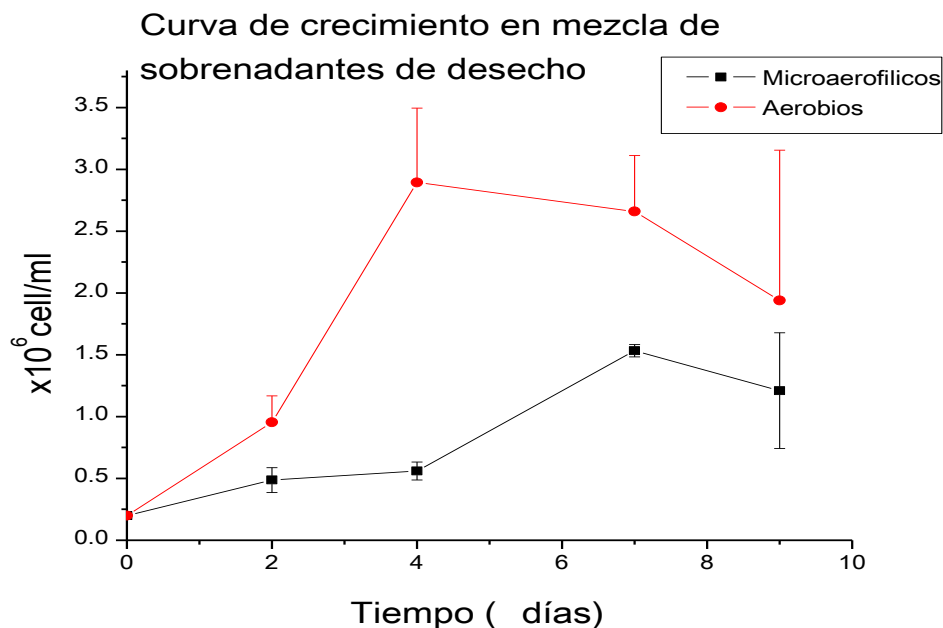
Para la primera condición de cultivo en donde se sembró a *E. gracilis* en cada sobrenadante por separado, se obtuvo una densidad celular mayor en condición aerobia que en microaerofílicos, para los todos los tipos de sobrenadantes, y hubo un mayor crecimiento en los sobrenadantes de desecho de *T. cruzi* (Tabla 2). A pesar de que se encontró mayor crecimiento en el SN de *T. cruzi*, se decidió utilizar la mezcla de los tres sobrenadantes para evaluar si el crecimiento aumentaba y aprovechar los sustratos que contenía cada uno.

Tabla 2. Densidad celular de *E. gracilis* ($\times 10^6$ céls/mL), se muestra el promedio \pm SD de tres réplicas obtenidas en cultivos de diferentes sobrenadantes de desecho y los principales sustratos encontrados en cada uno.

	S.N. de desecho de <i>E. histolytica</i>	S.N. de desecho de células tumorales	S.N. de desecho de <i>T. cruzi</i>
Microaerofílicos	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	1.7
Aerobios	1.4 \pm 0.6	0.8 \pm 0.1	2.3
Sustratos del medio			
Albúmina	+	+	+
Glucosa	+	+	-
Etanol	+	-	-
Lactato	-	+	-
Aminoácidos	-	+	+

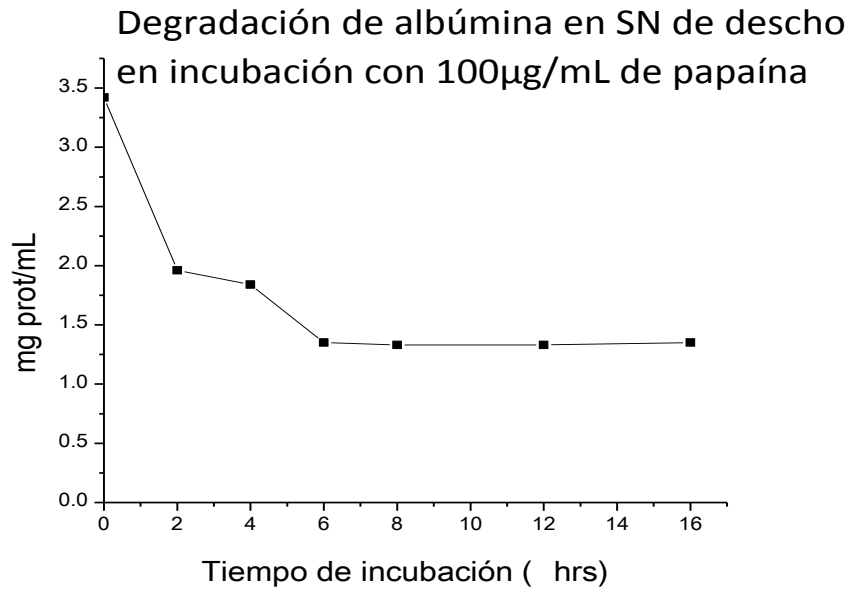
En la segunda condición, en la que se utilizó la mezcla de sobrenadantes más un tercio del volumen final de agua como medio de cultivo a pH 3.5, se obtuvo una densidad celular máxima de $2.8 \pm 0.6 \times 10^6$ céls/mL al 4 día de cultivo y de $1.5 \pm 0.05 \times 10^6$ céls/mL al día 7 de la curva para la condición aerobia y microaerofílica, respectivamente (Gráfica 1). En este caso la mezcla de los sobrenadantes se esterilizaba por filtración lo cual hacía que el proceso de preparación de los medios fuera complicado y costoso, por lo que se buscó una

alternativa para continuar con los experimentos y poder realizar cultivos de mayor volumen.



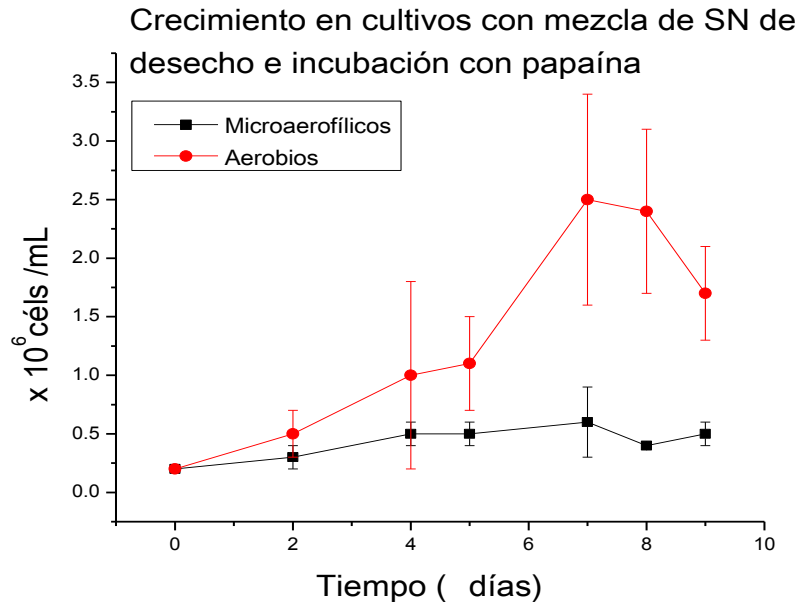
Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* cultivada en la mezcla de sobrenadantes de desecho esterilizados por filtración. Los valores mostrados son el promedio \pm DS (n=3)

La alternativa para la esterilización de los sobrenadantes era por autoclave; sin embargo, debido a la albúmina contenida en cada uno, al realizar este tipo de esterilización la albúmina se precipitaba, lo que hacía que el medio ya no fuera utilizable. Por ello se procedió a incubar el SN con papaína pura (100 μ g/mL) antes de esterilizar por autoclave, para degradar la albúmina remanente y que de esta forma se pudiera esterilizar de una manera más fácil y menos costosa, a la vez de que los aminoácidos liberados por la papaína pudieran ser consumidos por las células. En la gráfica 2 se muestra una curva de degradación de la albúmina en el medio a diferentes tiempos de incubación, en la que se observa que se degrada más del 60% a partir de las 6 h.



Gráfica 2. Contenido de albúmina en sobrenadantes de desecho después de 16hr de incubación con 100 µg/ml de papaína.

Posteriormente, en una tercera condición de cultivo utilizando los sobrenadantes pre-incubados con papaína y esterilizados por autoclave, se realizó la curva de crecimiento (Gráfica 3) en la que se obtuvo una fase exponencial del día 5 al 7, con una densidad máxima de $2.5 \pm 1 \times 10^6$ céls/mL, para cultivos aerobios, mientras que para los microaerofílicos disminuyó el crecimiento con un valor máximo de $0.6 \pm 0.3 \times 10^6$ céls/mL.



Gráfica 3. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* cultivada en presencia de sobrenadantes de desecho previamente incubados 12h con papaína y esterilizados por autoclave. Los datos muestran el promedio \pm la desviación estándar (n=3).

El crecimiento de *E. gracilis* se vio afectado en la condición microaerófila por la esterilización con autoclave probablemente debido a la evaporización del etanol contenido en el sobrenadante de amibas. Por dicha razón en los siguientes cultivos se realizó la misma esterilización por autoclave pero con la suplementación del etanol esterilizado por filtración.

9.2. Consumo de sustratos.

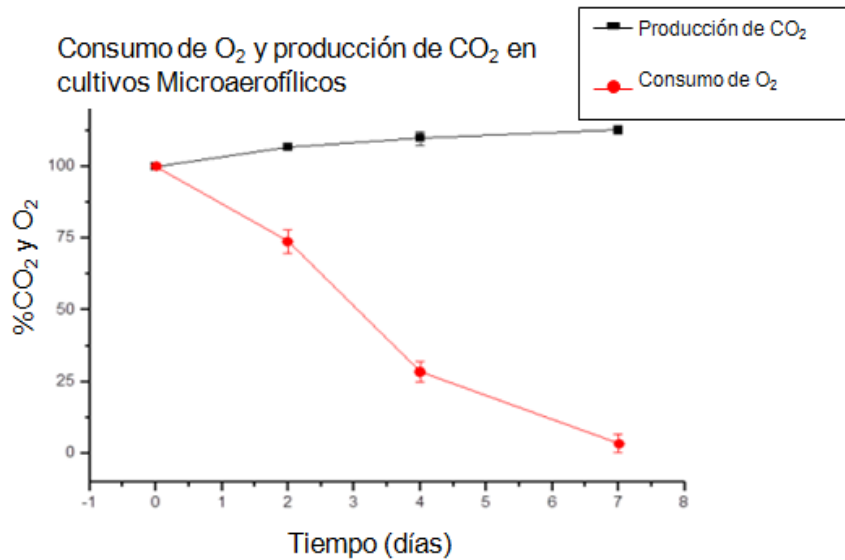
Se evaluó la concentración de sustratos en el medio con SN al inicio y al final de la curva de crecimiento en condiciones aerobias y microaerófilas, y se determinó que el sustrato más importante en el medio y con mayor concentración fue el etanol (Tabla 3.), con una concentración de 13-14 mM en ambas condiciones (aerobios y microaerófilicos), consumiéndose casi por completo al final del cultivo; lo mismo se observó en el contenido de glutamato, mientras que la glucosa, L-lactato y acetato no fueron consumidos. Por otro lado el pH aumentó a 4.7 para cultivos aerobios y a 4.5 para microaerófilicos.

Tabla 3. Contenido de sustratos y pH en el medio, al inicio y final del cultivo, en condiciones aerobias y microaerofílicas. Los resultados mostrados son el promedio \pm la desviación estándar de 3 a 5 cultivos con triplicado, los datos marcados con * son de una sola repetición (n= 1).

Sustrato	Aerobios		Microaerofílicos	
	Al inicio del cultivo	Al día 8 del cultivo	Al inicio del cultivo	Al día 8 del cultivo
Etanol (mM)	13 \pm 6.2	0.04 \pm 0.03	14 \pm 5.5	0.02 \pm 0.01
Glutamato (mM)	2.2 \pm 0.5	0.1 \pm 0.03	1.7 \pm 0.9	0.1 \pm 0.02
Glucosa (mM)	3.6 *	2.7 *	2.5 *	2.5 *
L-lactato (mM)	0.2 *	0.2 *	0.1 *	0.09 *
Acetato (mM)	0.2 *	0.2 *	0.1 *	0.12 *
pH	3.5 *	4.7 \pm 0.4	3.5 *	4.5 \pm 0.35

9.3. Consumo de O₂ y producción de CO₂.

Por otra parte se determinó el porcentaje de O₂ y CO₂ en condición microaerofílica, donde se observó un consumo de O₂ desde el inicio del cultivo y una producción de CO₂ (Gráfica 4). Estos resultados verifican que realmente se obtiene una condición de microaerofilia.



Gráfica 4. Consumo de O₂ y producción de CO₂ a lo largo de la curva de crecimiento en condiciones microaerofílicas. Los resultados están dados en porcentaje, considerando la concentración del tiempo inicial como el 100%.

9.4. Actividades mitocondriales.

Una vez determinado el consumo de sustratos en los sobrenadantes, se procedió a aislar las fracciones mitocondriales y citosólicas, para evaluar la participación de los aminoácidos liberados por la actividad de la papaína, en el aporte energético para el crecimiento de *E. gracilis* en el SN de desecho y evaluar el metabolismo en dicho proceso.

En la tabla 4 se muestra el consumo de O₂ por las mitocondrias aisladas de *E. gracilis* cultivada en medios con SN de desecho, en medio definido con glutamato + malato y en medio definido con glucosa, con la adición de diferentes sustratos. Se mostró un mayor consumo de O₂ con la adición de glutamato + malato y alanina en mitocondrias provenientes de células aerobias cultivadas en SN, siendo comparables con las de medio definido de G+M. Este consumo también fue mayor respecto a la adición de los otros aminoácidos (glutamina y prolina) y a la adición de 2-oxoglutarato, que es un derivado de la degradación del glutamato. También se determinaron las actividades de la L-ILDH, complejo II, complejo IV y oxidasa alterna, las cuales fueron similares a las obtenidas con mitocondrias provenientes de células cultivadas en medios definidos, estos experimentos sirvieron para corroborar que las mitocondrias aisladas de células provenientes del cultivo en SN de

desecho eran funcionales y sus actividades comparables a las obtenidas en condiciones control.

Tabla 4. Consumo de O₂ en fracciones mitocondriales de *E. gracilis* cultivada en medios con sobrenadante de desecho (SN), o en medios definidos (glutamato + malato y glucosa respectivamente). Las unidades están dadas en natgO/min*mg proteína, los resultados muestran el promedio ± la SD de 3 experimentos. N.D.= no determinado.

SUSTRATO	MEDIO DE SN Aerobio	MEDIO DE SN Microaerofílico	MEDIO DE G+M Aerobio	MEDIO DE GLUCOSA Aerobio
L – lactato(L-iLDH)	69±33	25±18	62±23	32±11
Glutamato + malato	45±25	11±3	53±28	32±10
Malato+Glutamina	13±9	21 (n=1)	33±19	30±24
Malato+Prolina (n=1)	6	14	43±24	37±18
Malato+L-alanina	35±32	7 (n=1)	N. D.	N. D.
2 - oxoglutarato (n=1)	6	21	30±11	46±40
Ascórbico + TMPD(complejo IV)	82±42	62±29	147±40	90±47
Succinato(complejo II)	18±9	40±11	N. D.	N. D.
AOX (L-lac+ azida)	22±11	28 (n=2)	N. D.	N. D.

9.5. Generación del potencial electroquímico transmembranal.

Se determinó el potencial electroquímico transmembranal en mitocondrias aisladas de *E. gracilis* cultivadas en condiciones aerobias en medio con SN de desecho, como se muestra en la figura 2, se determinó la formación de un potencial de membrana por la disminución de la fluorescencia de la rodamina 123, con la adición de malato + los aminoácidos: glutamato, prolina y glutamina, indicando de esta forma que el consumo de éstos está ligado a la formación de un gradiente electroquímico y por lo tanto podría estar ligado a la síntesis de ATP. Así mismo, se determinó la formación del potencial de membrana con la adición de succinato semialdehido que es parte del ciclo de Krebs en este organismo.

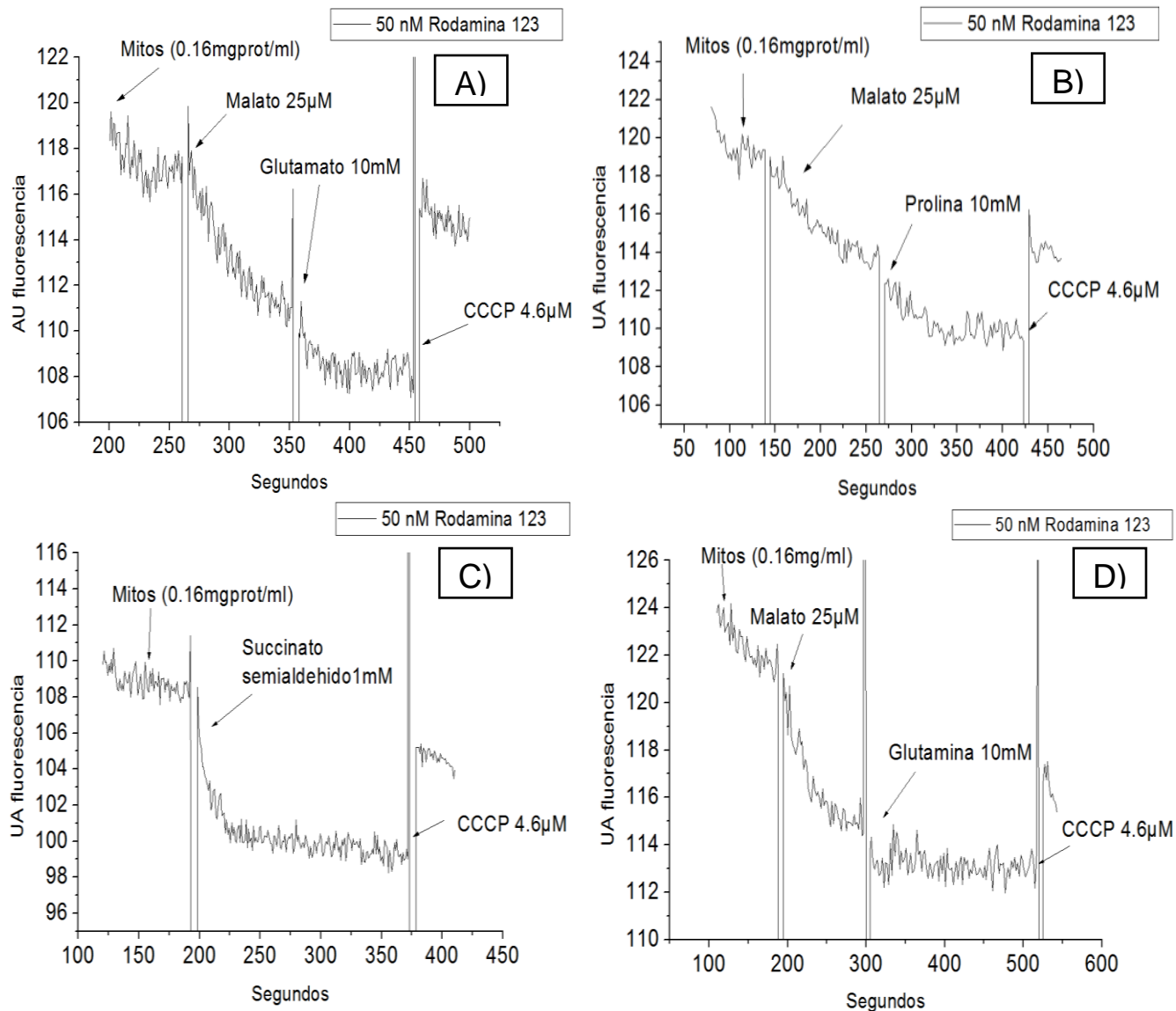


Figura 2. Determinación de potencial de membrana en fracciones mitocondriales aisladas de *E. gracilis* cultivada en sobrenadantes de desecho. A) Disminución de la fluorescencia o formación de potencial de membrana con la adición de 10 mM de glutamato, B) con 10 mM de prolina, C) con 1 mM de succinato semialdehido y D) con 10 mM de glutamina. En todos los casos se utilizaron 0.16 mg prot mitocondrial/mL y 4.6 µM del desacoplante CCCP al final del trazo.

9.6. Actividades enzimáticas citosólicas.

En la tabla 5 se muestran los resultados de las actividades enzimáticas determinadas en fracciones citosólicas provenientes de células cultivadas en medios con SN, y medios definidos de glutamato+malato y glucosa. Se observó una mayor actividad de la NAD⁺-MDH y la hexocinasa en citosoles de células en SN, en comparación con medios control, mientras que la actividad de la NADP⁺-GDH no fue detectada en para citosoles provenientes de células cultivadas en SN de desecho, lo que nos indica que el consumo del glutamato está siendo llevado a cabo solo en la mitocondria.

Tabla 5. Actividades enzimáticas en fracciones citosólicas de *E. gracilis* cultivada en medios con SN de desecho y en medios definidos. Las unidades están dadas en nmol/min* mg proteína, los resultados que se muestran son el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos. N.D.= no detectado.

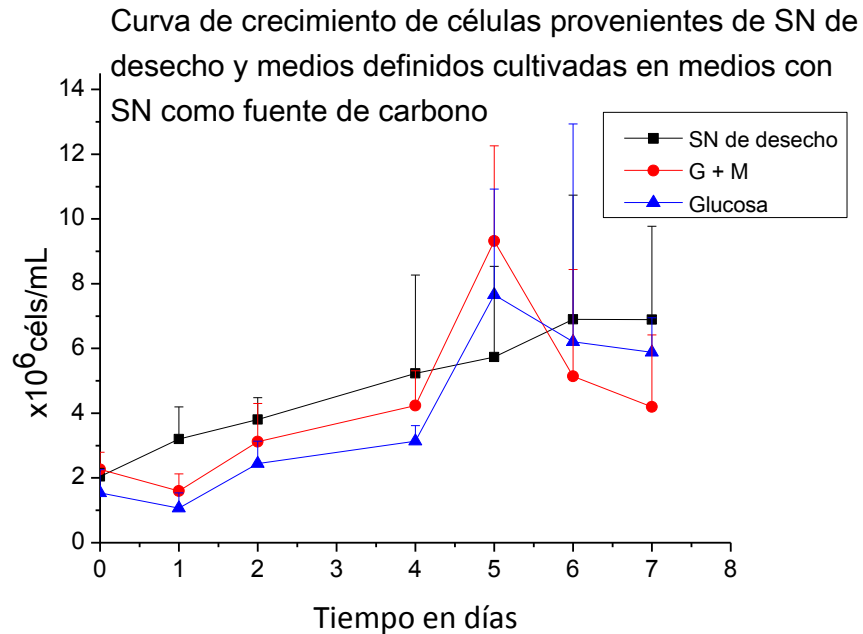
Enzima	MEDIO SN Aerobios	MEDIO SN Microaerofílicos	MEDIO G+M Aerobio	MEDIO GLUCOSA Aerobio
Malato deshidrogenasa	845 \pm 284	1017 \pm 503	77.8 \pm 81	237 \pm 147
Enzima málica	22 \pm 6.5	15.5 \pm 5.5	9.7 \pm 5	20 \pm 7.5
Glutamato deshidrogenasa (NADP ⁺ /NAD) *forward	N.D	N.D.	4.7 \pm 5.7	8.8 \pm 7.8
Hexocinasa	38 \pm 20.5	67 \pm 48.5	5.2 \pm 5.5	10.8 \pm 15.7
L-Lactato deshidrogenasa	38 \pm 7.5	18 \pm 11	66.7 \pm 58.7	19 \pm 9

9.7. Cultivos de alta densidad.

9.7.1. Cinética de crecimiento

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento en cultivos con inóculos iniciales de (2×10^6 cels/mL) provenientes de medio con SN de desecho, y medios definidos de glutamato + malato y glucosa, respectivamente. En dicha condición se

obtuvo la máxima densidad celular al día 5 para los inóculos provenientes de medios definidos y al día 6 para los provenientes de SN, después de la cual se observó una fase estacionaria (Gráfica 5). Los cultivos con inóculo proveniente de glutamato + malato fueron los que presentaron un mayor número de células ($9.3 \pm 2.9 \times 10^6$ céls/mL), seguido del proveniente de glucosa ($7.7 \pm 3.3 \times 10^6$ céls/mL), mientras que el menor fue el proveniente de SN de desecho ($6.9 \pm 3.8 \times 10^6$ céls/mL).



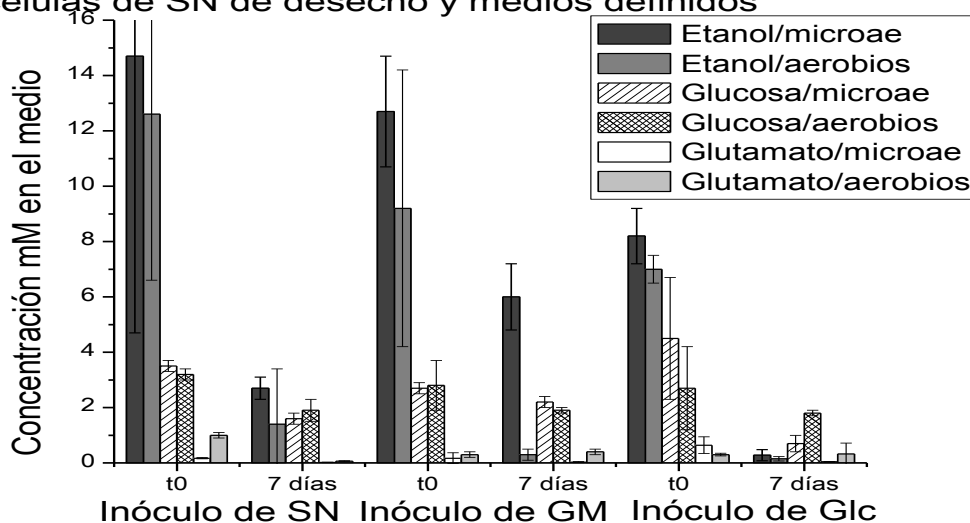
Gráfica 5. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* cultivada en presencia de sobrenadantes de desecho con inóculos iniciales de 2×10^6 céls/mL y provenientes de medios con SN de desecho (línea negra), medio definido con glutamato + malato (línea roja) y medio definido de glucosa (línea azul). Los datos muestran la media \pm la SD (n=3).

9.7.2. Consumo de sustratos

En cuanto al consumo de sustratos presentes en el SN de desecho en los cultivos de alta densidad, se observó que el sustrato más importante o más consumido fue el etanol (Gráfica 6), siendo mayormente consumido por las células provenientes de medio definido de glucosa con un 97 % y 96 % de consumo para condición microaerofílica y la aerobia, respectivamente, seguido de las células de SN de desecho con un 80% de consumo para microaerofílica y 88 % aerobios de consumo para la condición aerobia. La glucosa se consumió más por las células provenientes de medio de glucosa que las de SN de desecho y

glutamato+malato, con una disminución de la concentración del sustrato en el medio mayor en condición aerobia que en la microaerofílica. Por último el glutamato fue consumido en un 88 % para la condición microaerofílica y 94 % para condición aerobia de células provenientes de SN de desecho, mientras que para las células provenientes de medio definido el glutamato sólo disminuyó su concentración en microaerofilia.

Consumo de sustratos con inóculos de alta densidad con células de SN de desecho y medios definidos

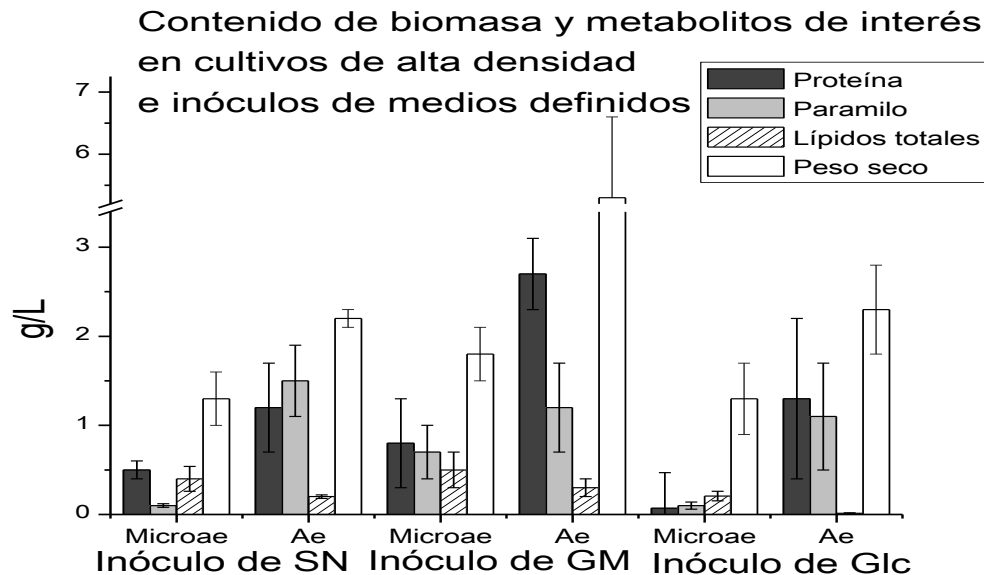


Gráfica 6. Consumo de sustratos en medios con SN de desecho como fuente de carbono, con inóculos iniciales de alta densidad, provenientes de medios con sobrenadante de desecho, glutamato + malato o glucosa, respectivamente. La gráfica muestra el promedio \pm la desviación estándar (n=3).

9.7.3. Rendimiento de biomasa y metabolitos de interés biotecnológico.

En la Gráfica 7 se muestran los resultados de rendimiento de biomasa determinada como peso seco, de proteína, de paramilo y de lípidos totales, en incubaciones de células provenientes de medio con SN de desecho y medios definidos. Para el contenido de proteína se mostró un mayor rendimiento con inóculo de glutamato + malato ($2.7 \pm 0.4 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ en cultivos aerobios y $0.8 \pm 0.5 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ en microaerofílicos) de igual manera con dichas células se obtuvo un mayor peso seco ($5.3 \pm 1.3 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ en aerobios y $1.8 \pm 0.3 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ en microaerofílicos). Por otro lado, el rendimiento en lípidos totales fue similar en condiciones microaerofílicas en células de SN de desecho y células de glutamato+malato ($0.4 \pm 0.14 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ y $0.5 \pm 0.2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente); sin embargo, en cuanto al paramilo la condición que obtuvo un mayor

contenido fue la del inóculo proveniente de SN de desecho en aerobiosis (con $1.5 \pm 0.4 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$).



Gráfica 7. Rendimiento de biomasa en peso seco y de proteína, de paramilo y de lípidos totales. Rendimientos en medios con SN de desecho como fuente de carbono con inóculos iniciales de alta densidad, provenientes de medios con SN de desecho, glutamato + malato o glucosa, respectivamente. La gráfica muestra el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$).

10. DISCUSIÓN

En la primera condición de cultivo en la que se incubó a *E. gracilis* en los SN de desecho por separado, se observó un mayor crecimiento en el sobrenadante de *T. cruzi* (Tabla 2). Esto probablemente se deba a que dicho medio de cultivo contiene hidrolizados proteicos provenientes de la albúmina y aminoácidos libres, de los cuales el glutamato representa del 10 al 17% siendo el más abundante (Atlas, 2010), y que es a la vez el aminoácido más utilizado como fuente de carbono y nitrógeno por *E. gracilis* (Oda et al., 1982).

Al mezclar los sobrenadantes y esterilizarlos por filtración no hubo diferencias aparentes en el crecimiento, lo cual fue una ventaja ya que se pudo aprovechar el desecho de los tres SN, obteniendo un crecimiento de 2.8×10^6 céls/ mL para aerobios y 1.5×10^6 céls/ mL en microaerofílicos (Gráfica 1). Sin embargo, al esterilizar los sobrenadantes por autoclave la densidad de la condición microaerofílica disminuyó a $0.6 \pm 0.3 \times 10^6$ céls/ mL (Gráfica 3). Esto puede deberse a que el etanol, que es uno de los sustratos en los que *E. gracilis* crece mejor (Jasso-Chávez et al., 2010; Rodríguez-Zavala et al.,

2010), se evapora con la esterilización con autoclave. A pesar de ello el crecimiento de las células aerobias no se ve tan afectado, esto sugiere que en el medio quedan remanentes de otros sustratos que pueden ser consumidos en aerobiosis, tales como los aminoácidos liberados por la incubación con papaína, la cual actúa preferentemente sobre alanina, leucina y prolina (Atlas, 2010), dichos aminoácidos se han reportado como una fuente de nitrógeno alternativa o como una fuente de carbono en *Euglena* (Richter et al., 2015).

En cuanto al consumo de sustratos, el que mejor se consumió fue el etanol seguido del glutamato (Tabla 3). Este resultado concuerda con lo ya reportado por Yoval- Sánchez et al. (2011) en donde se señalan que el etanol es el sustrato que *E. gracilis* consume con mayor velocidad, ya que este difunde a través de la membrana mitocondrial para oxidarse en la matriz. Por el contrario, la glucosa no se consumió, ya que la concentración inicial en el medio fue de 3.6 mM y se requirieron concentraciones mayores a 30 mM para ser consumida (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003). De la misma forma las concentraciones iniciales de L-lactato y acetato fueron bajas, y no fueron consumidos. Aunado a la baja concentración de glucosa, lactato y acetato, el medio se mantuvo con un pH ácido, siendo este de 4.7 al final del cultivo, lo cual favoreció la degradación del glutamato y el malato sobre los demás sustratos (Santiago-Martínez et al. 2015), el aumento de pH a lo largo de la curva, de 3.5 a 4.7, pudo ser provocado por la excreción de compuestos nitrogenados derivados del metabolismo de aminoácidos (Hernández – Pérez y Labbé, 2014). Además de favorecer la degradación de aminoácidos, el mantener el medio en un pH ácido representa una ventaja esto ya que restringe el crecimiento de microorganismos no acidófilos evitando de esa manera la contaminación de los cultivos (Waygood et al. 1980).

Por otra parte, el consumo de O₂ en fracciones mitocondriales de *Euglena* incubada en SN de desecho, resultó ser mayor con la adición de glutamato que con los otros aminoácidos (Tabla 4), similar al resultado obtenido en medio definido de glutamato + malato, lo que sugiere que las mitocondrias de células cultivadas en el desecho mantienen muy activo el metabolismo oxidativo debido a los aminoácidos presentes en el sobrenadante. Se sabe que el glutamato se incorpora al ciclo de Krebs, ya sea por la vía GABA o por la lanzadera de malato-aspartato, produciendo NADH, el cual es utilizado en la cadena de transporte de electrones (Buetow, 1989, Rodríguez- Zavala et al., 2010).

Para determinar el potencial de membrana se utilizó rodamina 123, un catión lipofílico que al producirse un gradiente electroquímico (interior negativo) transmembranal mitocondrial este entra a la mitocondria provocando una disminución en la señal de fluorescencia (Johnson et al. 1981), este efecto pudo observarse en la adición de los aminoácidos glutamato, prolina, succinato semialdehído y glutamina (Figura 2), lo que sugirió que al adicionar estos

aminoácidos, se lleva a cabo un transporte de electrones que genera el gradiente electroquímico que podría estar ligado a la síntesis de ATP. Este resultado se confirmó al restablecerse la señal de fluorescencia con la adición de CCCP, un translocador de protones que causa el desacoplamiento de dicho gradiente electroquímico.

Por otro lado, de las actividades enzimáticas citosólicas, la enzima que resultó tener mayor actividad fue la NAD^+ malato deshidrogenasa (Tabla 5), fue incluso mayor que en las fracciones citosólicas de medios definidos de glutamato + malato y glucosa. Esto puede deberse a que la NAD^+ MDH está involucrada en la transaminación de los aminoácidos presentes en el medio de SN de desecho, a través de la lanzadera de malato-aspartato (Buetow, 1989). Por otro lado, se ha determinado que en condiciones de anaerobiosis, pH ácido, con glutamato + malato y glucosa como fuente de carbono, la GDH citosólica con NAD^+ es la principal enzima encargada de la oxidación del glutamato y se induce la actividad de la enzima málica para la oxidación del malato (Santiago-Martínez et al. 2015). Sin embargo en los resultados de éste trabajo no se detectó la actividad forward de la GDH citosólica, esto puede ser un efecto del aumento del contenido de amonio, como consecuencia de la oxidación de los aminoácidos, induciendo la reacción reversa de dicha enzima, para actuar en la regulación homeostática del amonio en la célula o para la síntesis de glutamina (Spanaki y Plaitakis, 2011).

En cuanto a la actividad de la Hexocinasa, se obtuvieron actividades más altas en los medios con SN de desecho vs los medios definidos (Tabla 5.), a pesar de que la concentración de glucosa determinada en el sobrenadante de desecho es baja (3.6 mM). Esto puede deberse a una adaptación a la presencia de glucosa como fuente de carbono externa como lo sugiere Graves (1971), quien reportó niveles tres veces más altos de hexocinasa en células crecidas en glucosa, que en células con etanol o acetato como fuente de carbono, aunque no encontró diferencias en el consumo de glucosa en estas condiciones.

Estos resultados nos muestran que el consumo de los aminoácidos y otros sustratos en los sobrenadantes de desecho, se está llevando a cabo principalmente por el metabolismo mitocondrial el cual tiene un papel importante en la remoción de compuestos orgánicos.

En las incubaciones de alta densidad celular se obtuvo un mayor número de células al día cinco, para los inóculos provenientes de medio definido de glutamato + malato y glucosa, $9.3 \pm 2.9 \times 10^6$ céls/mL y $7.7 \pm 3.3 \times 10^6$ céls/mL, respectivamente, mientras que para las células provenientes de SN de desecho se obtuvieron $6.9 \pm 3.8 \times 10^6$ céls/mL. A pesar de que la densidad alcanzada en células provenientes de SN de desecho fue menor a las provenientes de medios definidos, el consumo en los sustratos fue similar para los 3 tipos de inóculos respecto al etanol y la glucosa, no así para el glutamato, que sólo se

consumió en las células provenientes de SN de desecho. Cabe destacar que la concentración de glucosa en el medio para ésta última determinación fue de 3.5 mM, valor por debajo de la concentración que se reporta como necesaria para que la glucosa pueda consumirse (Jasso-Chávez y Moreno-Sánchez, 2003). Por lo que se sugiere que el iniciar con un inóculo de alta densidad y un cultivo previamente adaptado a desechos orgánicos, hace más eficiente el consumo de los sustratos.

El rendimiento en proteína y biomasa en peso seco fue mayor para los inóculos de glutamato + malato (Gráfica 7), Estos valores obtenidos en peso seco fueron mayores a los reportados anteriormente en un medio definido de glutamato + malato donde se obtuvo 2.2 g de peso seco x L (Moreno- Sánchez et al. 2017). Este resultado en biomasa puede deberse a que las células provenientes de glutamato + malato mantienen un metabolismo mitocondrial más activo que el de células provenientes de glucosa o SN de desecho, por la degradación del glutamato, lo que les ayuda a crecer más en los sobrenadantes.

Por otro lado, el contenido en lípidos totales fue similar en células provenientes de sobrenadantes y G+M 0.4 ± 0.14 g/L y 0.5 ± 0.2 g/L, respectivamente. Estos fueron similares a los anteriormente reportados por Inui et al. (2014) en cultivos de *E. gracilis* en un medio con melaza, donde se obtuvieron 0.53 g/L. Un rendimiento mayor, de 7.7 g/L, fue obtenido en un medio definido con glucosa + glutamato + malato suplementado con 1 % de ácido oleico, en dicho estudio se sugiere que la adición de precursores de la síntesis de ésteres de cera puede aumentar su rendimiento (Tani et al. 1987).

En cuanto al contenido de paramilo, se obtuvo un mejor rendimiento en condiciones aerobias, en células provenientes de SN de desecho con 1.5 ± 0.4 g/L, éste valor fue mayor que el reportado por Rodríguez-Zavala et al., (2010), quienes obtuvieron un valor máximo de 0.624 ± 0.013 g/L en un medio de Glucosa + NH^+ , éstos resultados pueden deberse al contenido de etanol en el medio con SN de desecho, ya que según lo reportado por Nakazawa (2017), a partir del etanol y el acetato se puede llevar a la cabo la gloconeogénesis (la biosíntesis de la glucosa a partir de precursores no glucosídicos) y por lo tanto la síntesis de paramilo, ya que el etanol es oxidado a acetato por las reacciones secuenciales de la ADH y la ALDH y luego es convertido en acetil-CoA que se metaboliza a través del ciclo del glioxilato.

Los últimos resultados mostrados sobre rendimiento, indicaron que es posible cultivar a *E. gracilis* en desechos orgánicos, obteniendo rendimientos en biomasa y metabolitos de interés biotecnológico, similares a los de medios de cultivo definidos, con la ventaja de que se logró remover los sustratos orgánicos presentes en el SN de desecho.

11. CONCLUSIONES

El protista *Euglena gracilis* fue capaz de duplicarse en medios de cultivo enriquecidos con sobrenadantes de desecho, logrando además remover los sustratos orgánicos del medio siendo el etanol el sustrato que se consumió más rápido. Por otro lado, al comenzar los cultivos con una alta densidad se promovió el consumo de los sustratos a pesar de que estos se hallaran en concentraciones menores a las óptimas reportadas previamente para *Euglena* heterotrófica.

Dicha remoción de sustratos se logró gracias a que el metabolismo mitocondrial de las células cultivadas en el SN de desecho se mantuvo activo, mostrando un consumo de oxígeno posiblemente ligado a la síntesis de ATP al adicionar aminoácidos como sustrato, esto se debió a que el SN de desecho contenía aminoácidos libres como producto de la hidrólisis de la albúmina por la papaína mismos que estaban siendo degradados; se observó lo contrario en mitocondrias de células cultivadas con glucosa que tuvieron una menor actividad mitocondrial ya que en ellas predomina el metabolismo citosólico en el que se lleva a cabo la glucólisis.

Con estos resultados se demostró que el metabolismo mitocondrial es esencial en la remoción de sustratos orgánicos, principalmente aminoácidos y que *E. gracilis* puede presentar gran adaptación metabólica en respuesta a las fuentes de carbono disponibles, ésta característica puede ser aprovechada para remover materia orgánica tratada. A partir de dicha materia orgánica se pudo obtener en aerobiosis una biomasa mayor a la reportada anteriormente en medios definidos, se observó un resultado similar en el rendimiento de paramilo y lípidos totales en células cultivadas en SN de desecho, y el costo del medio de cultivo, al ser de reuso, es de menor costo y de esta forma también se evitó la descarga de los desechos orgánicos al drenaje.

Con éstos resultados se demostró que el cultivo de la *Euglena gracilis* es una alternativa para obtener metabolitos de interés biotecnológico a partir de materia orgánica tratada, con rendimientos similares o mayores a los de un medio de cultivo convencional con la ventaja de que se remueven los contaminantes orgánicos, sin embargo aún se requieren pruebas toxicológicas en los metabolitos obtenidos a partir de éstos cultivos.

12. REFERENCIAS

- Atlas, M. R. (2010). Handbook of microbiological media. (4 a Ed) CRC Press. pp. 2043.
- Buetow, D. E. (1989). The mitochondrion. En: Buetow D. E. The biology of *Euglena*, Vol 4. (1a Ed). San Diego: Academic Press, pp. 247–314.
- Candela, O. R. D. (2016). Las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones. Una revisión bibliográfica. Escuela de Ciencias Agrícolas, pecuarias y del medio ambiente. Bucaramanga, pp. 60.
- Castro-Guerrero, N., Krab, K. y Moreno-Sánchez, R. (2004). The Alternative Respiratory Pathway of *Euglena* Mitochondria. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 36 (5): 459-469.
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua, México). (2016). Estadísticas del Agua en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Tlalpan, México, D. F., Edición 2016. 36-41. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/SGP-2-14Web.pdf>. Consultado: 16/ 03/ 2018.
- El Hafidi, M., Pérez, I., Zamora, J., Soto, V., Carvajal-Sandoval, G., y Baños, G. (2004). Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 287(6): 1387-1393.
- Farmer, M. A. (2012). Euglenozoa. Eucaryotic Microbes. (1a Ed). Georgia. pp. 311–321.
- Graves, L. B. (1971). Effects of Different Substrates on Glucose Uptake and Hexokinase Activity in *Euglena gracilis*. The Journal of Protozoology, 18(3): 543–546.
- Hernandez-Perez, A., y Labbe, J. I. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de biología marina y oceanografía. 49 (2): 157-173.
- Hutner, S.H., Bach, M.K. y Ross, G.T.M. (1956). A sugar-containing basal medium for vitamin B-12 assay with *Euglena*: application to body fluids. Journal of Protozoology, 3: 101–105.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1983). Production and Composition of Wax Esters by Fermentation of *Euglena gracilis*. Agricultural and Biological Chemistry, 47(11): 2669-2671.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y. y Kitaoka, S. (1992). Synthesis of reserved polysaccharide from wax esters accumulated as the result of anaerobic energy generation in *Euglena gracilis* returned from anaerobic to aerobic conditions. International journal of biochemistry, 24(5): 799-803
- Jasso-Chávez, R. y Moreno-Sánchez R. (2003). Cytosol-Mitochondria transfer of Reducing Equivalents in Heterotrophic *Euglena*. European Journal of Biochemistry. 270: 4942-4951.

- Jasso-Chávez, R., Pacheco-Rosales, A., Lira-Silva, E., Gallardo-Pérez, J., García, N. and 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., Santiago-Martínez, M., Lira-Silva, E., Pineda, E., Zepeda-Rodríguez, A., y Belmont-Díaz, J. et al. (2015). Air-Adapted Methanosarcina acetivorans Shows High Methane Production and Develops Resistance against Oxygen Stress. *PLOS ONE*, 10 (2): 21 p.
- Jasso-Chávez, R., Torres-Márquez, M. y Moreno-Sánchez, R. (2001). The Membrane-Bound - and -Lactate Dehydrogenase Activities in Mitochondria from *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390(2): 295-303.
- Johnson, L. V., Walsh, M. L., Bockus, B. J. y Chen, L. B. (1981). Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *Journal of Cell Biology*. 88(3): 526-535.
- Kiss J. Z., Roberts E. M., Brown R. M. y Triemer R. E. (1988). X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma*, 146 (2-3): 150–156.
- Koizumi, N, Sakagami, H, Utsumi, A, Fujinaga, S, Takeda, M, Asano, K, Sugawara, I y Yamamoto, N, (1993). Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral research*, 21(1): 1-14.
- Kuda, T, Enomoto, T, Yano, T. (2009). Effects of two storage β -1, 3-glucans, laminaran from *Eiceniabicyclis* and paramylon from *Euglena gracilis*, on cecal environment and plasma lipid levels in rats. *Journal of Functional Foods* 1(4): 399–404.
- Leander B. S., Esson H. J., y Breglia S. A. (2007). Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. *BioEssays* 29 (10): 987–1000.
- Lira-Silva, E., Ramírez-Lima, I., Olín-Sandoval, V., García-García, J., García-Contreras, R., Moreno-Sánchez, R. and Jasso-Chávez, R. (2011). Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 193 (1): 216-224.
- López C. D. J., Gárate L.I., Guzmán B.J.J., Rodríguez A., y Murillo R. M. (2003). Variabilidad del estado trófico y la biomasa del fitoplancton de Bahía Concepción, Golfo de California (1997-1999). *Hidrobiológica*. 13(3):195-206.
- Mahapatra, D., Chanakya, H. y Ramachandra, T. (2013). *Euglena sp.* as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*, 25(3): 855-865.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Jasso-Chávez, R., Saavedra, E., y García-García, J. (2017). Biochemistry and Physiology of Heavy Metal Resistance and Accumulation in *Euglena*. En S. Schwartzbach y S. Shigeoka, *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology* (1 a Ed.). Memphis, TN, USA: Springer. 91 - 124 pp.

- Nakazawa M, Andoh H, Koyama K, Watanabe Y, Nakai T, Ueda M, Sakamoto T, Inui H, Nakano Y, y Miyatake K (2015) Alteration of wax ester content and composition in *Euglena gracilis* with gene silencing of 3-ketoacyl-CoA thiolase isozymes. *Biosci Biotechnol Biochem* 50 (5):483–492.
- Oda, Y., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1982). Utilization and Toxicity of Exogenous Amino Acids in *Euglena gracilis*. *Microbiology*, 128(4): 853-858.
- Olguín, E. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, 22(1-2): 81-91
- Osafune, T., Sumida S., Ehara E. T., Ueno N., Hase E. y Schiff J.A. (1990). Lipid (wax) and paramylum as sources of carbon and energy for the early development of proplastids in dark-grown *Euglena gracilis* cells transferred to an inorganic medium. *Journal of Electron Microscopy*. 39 (5): 372-381.
- Oswald, S. U. (2011). Retos de la investigación del agua en México. Centro Regional de Investigaciones Multidisciplinarias. UNAM, Cuernavaca, pp.754.
- Padermshoke, A., Ogawa T., Nishio K., Nakazawa M., Nakamoto M., Okazawa A., Kanaya S., Masanori A. y Daisaku O. (2016). Critical Involvement of Environmental Carbon Dioxide Fixation to Drive Wax Ester Fermentation in *Euglena*. *PLOS ONE* 11(9): 16
- Richter, P., Liu, Y., An, Y., Li, X., Nasir, A., y Strauch, S. (2015). Amino acids as possible alternative nitrogen source for growth of *Euglena gracilis* Z in life support systems. *Life sciences in space research*. 4 (1): 1-5.
- Rodríguez-Zavala, J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernández G., y Moreno-Sánchez R. (2010). Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of applied microbiology*. 109(6): 2160-2172.
- Sakagami H., Unten S., Hanaoka A., Ohsawa N., Fujimaki M., Komatsu N., Ichikawa S., Hata N., Kondo H. y Konno K. (1989). Chemical modification potentiates paramylon induction of antimicrobial activity. *In vivo*, 3(4): 243-247
- Santiago-Martínez M. G., Lira-Silva E., Encalada R., Pineda E., Gallardo-Pérez J. C., Zepeda-Rodríguez A., Moreno-Sánchez R., Saavedra E., y Jasso-Chávez R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 288 (1): 104-112.
- Schwartzbach, S. y Shigeoka, S. (2017). *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. (1a Ed). Tennessee: Springer, pp. 304.
- Schwartzbach, S.D., Schiff J.A. y Goldstein N. (1975). Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. Control of paramylum degradation. *Plant Physiology*. 56 (2): 313-317.
- Shibakami, M., Tsubouchi, G. and Hayashi, M. (2014). Thermoplasticization of euglenoid β -1, 3-glucans by mixed esterification. *Carbohydrate Polymers*, 2014(105): 90-96.

- Shibakami, M., Tsubouchi, G., Nakamura, M. and Hayashi, M. (2013). Polysaccharide nanofiber made from euglenoid alga. *Carbohydrate Polymers*, 93(2): 499-505.
- Spanaki, C., &Plaitakis, A. (2011). The Role of Glutamate Dehydrogenase in Mammalian Ammonia Metabolism. *Neurotoxicity Research*, 21(1): 117–127.
- Tani, y., Okumura, m. y Il, S. (1987). Liquid wax ester production by *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51(1): 225-230.
- Tomita, Y., Yoshioka, K., Iijima, H., Nakashima, A., Iwata, O., Suzuki, K., Hasunuma, T., Kondo, A., Hirai, M. y Osanai, T. (2016). Succinate and Lactate Production from *Euglena gracilis* during Dark, Anaerobic Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1): 2050.
- Tucci, S., Vacula R., Krajcovic J., Proksch P. y Martin W. (2010). Variability of wax ester fermentation in natural and bleached *Euglena gracilis* strains in response to oxygen and de elongase inhibitor flufenacet. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(1): 63-69.
- UNESCO. (2017). Aguas residuales, el recurso desaprovechado. Informe mundial sobre el desarrollo de recursos hídricos de las Naciones Unidas. Disponible en: <http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/wwdr/2017-wastewater-the-untapped-resource/> Consultado: 28/ 03/ 2018
- Waygood, E. R., Hussain, A., Godavari, H. R., Tai, Y. C., y Badour, S. S. (1980). Purification and reclamation of farm and urban wastes by *Euglena gracilis*: Photosynthetic capacity, effect of pH, temperature, acetate and whey. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 23(3): 179–215.
- Yoval-Sánchez, B., Jasso-Chávez R., Lira-Silva E., Moreno-Sánchez R., y Rodríguez-Zavala J. S. (2011). Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 43(5): 519-530.

13. APÉNDICE

Apéndice 1. Composición de las soluciones de minerales traza del medio Hunter.

Solución de minerales traza A:

- 0.138 M de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$)
- 0.236 M de sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$)
- 0.0412 M de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$)

- 0.0032 M de cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 - 6\text{H}_2\text{O}$)

Solución de minerales traza B:

- 0.032 M de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$)
- 0.096 M de ácido bórico (H_3BO_4)

Apéndice 2. Preparación de la solución de vitaminas para el medio de cultivo.

- Preparación para 100 ml de solución:
- 0.01 g de tiamina (B1)
- 0.05 g de cloruro férrico (FeCl_3)
- 100 μL (2 mg) de un stock de cianocobalamina (B12) al 2 %
- Disolver en agua destilada y esterilizar por filtración.