

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ciencias Agrícolas

TEMA:

RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL PROTISTA *Euglena gracilis* A LA EXPOSICIÓN POR COBRE

OPCIÓN: TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTA:

JUDITH BALDERAS SIORDIA

EJIDO NUEVO LEÓN, MEXICALI, B.C.

MAYO DEL 2 011

La presente tesis titulada “**RESPUESTA FISIOLÓGICA DEL PROTISTA *Euglena gracilis* A LA EXPOSICIÓN POR COBRE**”, realizada por la alumna: **Judith Balderas Siordia**, bajo la dirección del **Dr. Daniel González Mendoza**, fue aceptada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado como requisito parcial para obtener el Título de:

## **INGENIERO AGRÓNOMO**

**Consejo particular:**

**Presidente:** \_\_\_\_\_

**Dr. Daniel González Mendoza**

**Secretario:** \_\_\_\_\_

**Dr. Onécimo Grimaldo Juárez**

**Sinodal:** \_\_\_\_\_

**Dra. Lourdes Cervantes Díaz**

**“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”**

## Índice

<b>Contenido</b>	<b>paginas</b>
Índice de cuadro	II
Índice de figuras	III
Dedicatoria	IV
Agradecimiento	V
Apoyo	VI
Resumen	VII
Introducción	1
Antecedentes	3
Objetivos	7
Hipótesis	8
Materiales y métodos	
1. Desarrollo experimental para evaluar el efecto del pH en el crecimiento de <i>E. gracilis</i> .	9
1.1. Análisis estadísticos.	9
1.2. Resultados y discusión.	10
2. Desarrollo experimental para evaluar la toxicidad de Cu <sup>2+</sup> en crecimiento de <i>E. gracilis</i> (Krebs) cepa Z fotosintética.	12
2.1. Análisis de pigmentos fotosintéticos.	13
2.2. Análisis estadísticos.	14
2.3. Resultados y discusiones.	14
Conclusiones Generales.	17
Literatura Citada.	18

## INDICE DE CUADRO

Contenido	Pagina
Tabla 1: crecimiento de <i>Euglena Gracilis</i> a los 0( $x_0$ ) y 7(x) días.	10
Tabla 2: Variables de crecimiento de <i>Euglena gracilis</i> a los siete días de crecimiento	10

## INDICE DE FIGURAS

Contenido	pagina
Figura 1: Cinética de crecimiento de <i>E. gracilis</i> a diferentes valores de pH.	11
Figura 2: Curva de Crecimiento de cultivo de <i>Euglena gracilis</i> expuesto a cobre.	14
Figura 3: Tasa de crecimiento (k) de <i>E. gracilis</i> a diferentes concentraciones de cobre después de 144h de exposición.	15
Figura 4: Cambios en los niveles de pigmentos fotosintéticos de <i>Euglena gracilis</i> expuestos a diferentes dosis de Cu <sup>2+</sup> después de 144h de exposición.	16

## DEDICATORIAS

A mis padres, porque creyeron en mi y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis hermanos, tíos, primos, abuelos y amigos.

Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco al Dr. Daniel González por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo.

Gracias también a mis queridos compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos casi tres años de convivir dentro y fuera del salón de clase.

A mis padres y a mis hermanos que me acompañaron en esta aventura de forma incondicional, entendieron mis ausencias que a pesar de la distancia siempre estuvieron atentos para saber cómo iba mi proceso.

**Gracias a todos**

El trabajo a presentar fue financiado totalmente por el CONACYT proyecto:  
**“Mecanismos de Resistencia a Metales Esenciales y no esenciales en  
Microorganismos Acuáticos: uso del Protista *Euglena gracilis* como Modelo  
de Estudio”** con Clave: 79234



## RESUMEN

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que las variables de crecimiento como rango de crecimiento ( $\mu$ ) tiempo de duplicación (td) y constante de crecimiento (k) fueron superiores a valores de pH de 7 y 5.5 respectivamente. Caso contrario para el pH 3.5 donde el crecimiento del organismo de estudio fue negativo. Estos resultados permitieron garantizar la biodisponibilidad del Cobre (su bio-disponibilidad está entre el rango de pH 5.5 y 6) en el medio de cultivo, así como garantizar el crecimiento de *E. gracilis*. Posteriormente, se procedió a evaluar el rango de tolerancia de este organismo a  $\text{Cu}^{2+}$ , los resultados obtenidos indicaron que las células de *E. gracilis* presentaron una dosis media inhibitoria del crecimiento a la dosis de 0.66 mM de  $\text{Cu}^{2+}$ . Igualmente, se comprobó que la exposición de *E. gracilis* a las dosis crecientes del metal (0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mM) mostraron un efecto negativo sobre la estabilidad de los pigmentos fotosintéticos que participan en la captación de la luz en el complejo antena. Mediante el análisis de la clorofila total, relación de clorofila a/b y carotenoides totales a los 72 y 144 h después de la exposición al elemento. Confirmando el efecto negativo de dosis de 0.8 y 1.6 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la actividad metabólica de las células de *E. gracilis*.

## INTRODUCCIÓN

Durante, las últimas décadas, como resultado del desarrollo de asentamientos poblacionales y el impulso de diferentes actividades industriales se ha favorecido una mayor persistencia y bio-disponibilidad de compuestos químicos como los metales pesados en diferentes ecosistemas acuáticos (Gale et al., 2006). Los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) pueden ser esenciales o no esenciales para los seres vivos, pero todos ellos en exceso representan un riesgo latente para la salud de las especies que habitan estos ecosistemas entre ellas al ser humano. Dentro de los EPTs que tienen gran relevancia en la agricultura es el Cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ), el cual es requerido en el metabolismo y procesos celulares de las plantas, pero en cantidades elevadas puede generar serios problemas en la salud de los sistemas acuáticos (Yruela, 2005). Lo anterior ha generado la necesidad de desarrollar tecnologías para la remediación de ambientes acuáticos afectados por metales. En este sentido, el uso de microorganismos tolerantes con capacidad de almacenar metales ha demostrado ser una biotecnología con ventajas sobre los métodos físicos-químicos, ya que ofrece un menor impacto ambiental y menor costo económico (Mullapudi et al., 2008). En este sentido el protista acuático de vida libre *Euglena gracilis* representa un modelo biológico idóneo para ser empleado en procesos de bio-remediación. Este microorganismo forma parte del plancton de aguas dulces y puede ser cultivado de manera eficiente en condiciones controladas de laboratorio y con diferentes fuentes de carbono. Además presenta propiedades metabólicas y genéticas que le permite

desarrollarse en presencia de altas concentraciones de metales esenciales y no esenciales a diferentes valores de pH y bajo un régimen heterotrófico o fotosintético (Rodríguez-Zavala et al., 2007).

Estas propiedades hacen que *Euglena gracilis* pueda ser considerada como un organismo con potencial biotecnológico en la bio-remediación de sistemas acuáticos impactados por EPTs. En la actualidad existen diversos trabajos sobre el estudio del efecto de metales en este organismo siendo el cadmio el metal mas estudiado (Mendoza-Cozatl y Moreno-Sánchez, 2005). Sin embargo; el efecto toxico del cobre en la fisiología de *E. gracilis* ha sido poco abordado, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto toxico del  $\text{Cu}^{2+}$  en el desarrollo fisiológico de *E. gracilis*.

## ANTECEDENTES

Los metales se cuentan entre los materiales más útiles que se conocen. En el proceso de su aprovechamiento, el hombre los ha extraído de los depósitos subterráneos, los ha fundido, refinado y convertido en bienes de consumo que, después de usados, desecha. Durante cada una de estas operaciones se liberan metales al ambiente. La fundición y el refinado provocan a menudo la liberación de pequeñas cantidades de metales como productos secundarios. En el transcurso de su empleo, los metales están sujetos a corrosión y desgaste, lo cual conduce a pérdidas hacia el ambiente. En algunos casos el uso de un metal implica una liberación directa del mismo, de lo que son ejemplo el acetato fenilmercurico utilizado como fungicida y los aditivos de la gasolina constituidos por tetraetilo de plomo.

El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Específicamente, las bacterias han sido objeto de numerosos estudios por su participación en los ciclos bio-geoquímicos de los elementos esenciales para la vida (C, N, P y S), así como por su capacidad para transformar compuestos no esenciales, que eventualmente pueden representar una amenaza para el ambiente.

Las interacciones entre las bacterias y los metales son conocidas y pueden ocurrir a nivel extracelular, en la superficie bacteriana ó intracelularmente.

A nivel extracelular, se ha determinado:

1) el papel de los microorganismos en la movilización e inmovilización de metales

(Chen *et al.*, 1995; Ford y Ryan, 1995); y

2) la secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad por estos elementos (sideróforos) (Schwyn y Neilands, 1987; Lindsay y Riley, 1994)).

Las interacciones con la superficie celular dependen del tipo de bacteria, ya que el metal interactúa con los grupos específicos cargados negativamente en cada uno de ellos (Brierley y Brierley, 1997). A nivel intracelular, como consecuencia de la acumulación del metal ocurren transformaciones enzimáticas (Silver y Misra, 1988) ó la síntesis de proteínas específicas conocidas como metalotioninas (Kasan, 1993). Un tipo particular de interacción bacteria-metal, ampliamente reseñado en la bibliografía que no se desarrollará en esta ocasión, es la capacidad que tienen las bacterias para utilizar algunos metales como fuente de energía o aceptores finales de electrones en el metabolismo (Lovley, 1991).

Los avances tecnológicos para el abatimiento de la contaminación por metales tóxicos consisten en el uso selectivo y en el mejoramiento de estos procesos naturales para el tratamiento de residuos particulares. Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son muy diversos (Fig. 1). Sin embargo, existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos: la bio-sorción; la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas. Estos procesos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos fisicoquímicos y biológicos. Las tecnologías que utilizan estos procesos se

encuentran actualmente en uso para controlar la contaminación de diversas fuentes, incluyendo las actividades de fundición y de minería.

Los métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con metales que incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación, resultan costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja. El uso de sistemas biológicos para la eliminación de metales pesados a partir de soluciones diluidas tiene el potencial para hacerlo mejor y a menor costo.

Los métodos químicos resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación.

Los microorganismos y sus productos pueden ser bio-acumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, por esto las tecnologías basadas en los microorganismos ofrecen una alternativa o ayudan a las técnicas convencionales para la eliminación/recuperación de metales.

Muchos metales pesados son esenciales para el crecimiento y el metabolismo microbiano en bajas concentraciones, e. g. Cu, Zn, Mn, mientras que a otros no se les conoce función biológica, e. g. Au, Ag, Pb, Cd. Una característica de estos metales y de elementos relacionados es que pueden ser altamente tóxicos para las células vivas. Por lo tanto, si se considera el uso de células vivas para un sistema de eliminación de metales, la toxicidad puede conducir a un envenenamiento e inactivación. El uso de biomasa muerta o productos derivados

de ella elimina el problema de la toxicidad, no solo de la provocada por metales disueltos, sino también por condiciones adversas de operación, además del componente económico de mantenimiento incluyendo el suplemento de nutrientes. Sin embargo, las células vivas pueden presentar una variedad más amplia de mecanismos para la acumulación de metales como el transporte, la formación de complejos extracelulares y la precipitación. De manera adicional, la tolerancia y resistencia a los metales pesados son propiedades que están muy distribuidas en los microorganismos de todos los grupos

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto toxico del  $\text{Cu}^{2+}$  en el crecimiento y viabilidad celular en la cepa de *Euglena gracilis*.

## HIPOTESIS

La adición de diferentes concentraciones de cobre no tiene efectos en el crecimiento y viabilidad celular de *Euglena gracilis*

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Desarrollo experimental para evaluar el efecto del pH en el crecimiento de *E. gracilis*

El experimento consistió en realizar el crecimiento del microorganismo en un medio de cultivo mínimo con la siguiente formulación: Acetato de sodio (1g/l), extracto de carne (1g/l), Triptona (2 g/l), Extracto de levadura (2 g/l) y  $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mg). El ajuste de los valores de pH (7, 5.5 y 3.5) se realizó usando NaOH, y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  respectivamente. Los experimentos se realizaron inoculando matraces de 250 ml con una biomasa inicial de  $1 \times 10^6$  de células. El experimento se realizó por triplicado con muestreos diarios por 7 días. El crecimiento se determinó usando una cámara Neubauer con un factor de la cámara de  $1 \times 10^4$  y un factor de dilución de 2.

#### 1.1. Análisis estadístico

Las variables evaluadas fueron: constante de crecimiento (k), tiempo de duplicación (días), y el rango de crecimiento ( $\mu$ ). Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico STATISTICA (Statistical Package version 5.5, Statsoft, USA) mediante una prueba de ANOVA y prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## 1.2. Resultados y Discusión

Los resultados mostraron que el mayor crecimiento de las células de *Euglena gracilis* a los ocho días fueron obtenidos a valores de pH 7 y 5.5 respectivamente (Tabla 1). En donde los valores de rango de crecimiento a pH 7.0 (0.40) fue superior a los valores a pH 5 (0.38) respectivamente.

Tabla 1. Crecimiento de *Euglena gracilis* a los 0 ( $X_0$ ) y 7 ( $X$ ) días

pH	Biomasa inicial ( $X_0$ )	Biomasa final ( $X$ )
7.0	$0.5 \times 10^6$	$8677083.33 \pm 631476.85$
5.5	$0.5 \times 10^6$	$7133333.33 \pm 90062.84$
3.5	$0.5 \times 10^6$	$89153.66 \pm 514.60$

Datos son reportados como medias  $\pm$  DS ( $n=3$ )

Estos resultados son de interés debido a que en ambientes acuáticos la disponibilidad de los elementos potencialmente tóxicos se incrementa en ambientes con valores de pH ligeramente ácidos (Campbell y Stokes, 1995).

Por lo contrario las variables de crecimiento en medio de cultivos crecidos a pH 3.5, mostraron valores significativamente menores a los presentados a pH 7 y 5.5 (Tabla 2). Lo cual nos indica el efecto negativo de ambientes extremadamente

Tabla 2. Variables de crecimiento de *E. gracilis* a los siete días de crecimiento

pH	K (constante de crecimiento)	$\mu$ (Rango de crecimiento)	TD (Tiempo de duplicación)
7.0	$0.587 \pm 0.01$	$0.40 \pm 0.01$	$1.7 \pm 0.04$
5.5	$0.546 \pm 0.02$	$0.38 \pm 0.02$	$1.8 \pm 0.09$
3.5	$0.120 \pm 0.01$	$0.08 \pm 0.01$	$15.35 \pm 12.7$

Datos son reportados como medias  $\pm$  DS ( $n=3$ )

Ácidos en el desarrollo de *E. gracilis*. Estos resultados contrastan con los reportados por Sato et al. (2005) en donde el mayor crecimiento de *E. gracilis* cepa SMZ fue a pH de 3.5. Caso contrario a lo reportado por Danilov y Ekelund (2001) en donde encontraron que el mejor crecimiento de *E. gracilis* fueron obtenidos dentro del rango de 4 y 8, siendo el óptimo a pH 6. Esto es interesante ya que aunque en nuestro estudio la cepa de *E. gracilis* creció de forma limitada en ambientes extremadamente ácidos (pH de 3.5), si tiene la capacidad de crecer en ambientes donde los metales generalmente pueden estar biodisponibles (Figura 1).

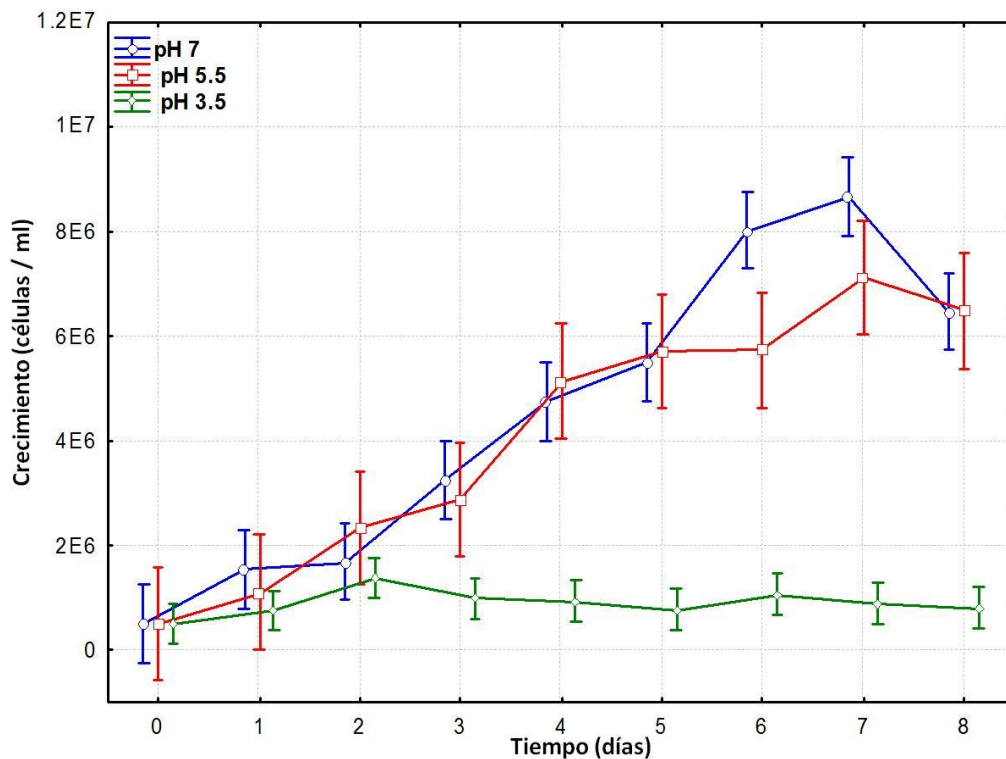


Figura 1. Cinética de crecimiento de *E. gracilis* a diferentes valores de pH

## 2. Desarrollo experimental para evaluar la toxicidad del $\text{Cu}^{2+}$ en crecimiento de *Euglena gracilis* (Krebs) cepa Z fotosintética

Se realizaron experimentos empleando cultivos axenicos de *Euglena gracilis* cepa Z (generosamente donada por el Dr. Takahiro Ishikawa). El experimento consistió en realizar el crecimiento del microorganismo en un medio de cultivo mínimo con la siguiente formulación: Acetato de sodio (1g/l), extracto de carne (1g/l), Triptona (2 g/l), Extracto de levadura (2 g/l) y  $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mg). Los experimentos se realizaron inoculando  $1 \times 10^6$  de células obtenidas de la fase exponencial (6 días de crecimiento) en matraces de 50 mL con 0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM de sulfato de cobre. Los matraces se mantuvieron bajo luz blanca fría continua con una intensidad lumínica de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a una temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y con agitación manual dos veces al día. La densidad celular (N) se determinó cada 24 h por conteo directo en microscopio utilizando cámara de Neubauer durante siete días y se determinó la tasa de crecimiento k en número de divisiones celulares por día (divisiones/día) a partir de la siguiente fórmula:

$$k = 3.332 \frac{\text{Log } N_n - \text{Log } N_o}{t_n}$$

Donde  $N_n$  es la densidad celular al final del bioensayo;  $N_o$  es la densidad celular inicial nominal y  $t_n$  es el tiempo transcurrido entre el inicio y final del bioensayo (en días).

También se determinó el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento ( $I_k$ ) usando la siguiente fórmula:

$$I_k = \frac{k_c - k_i}{k_c} \times 100$$

Donde  $k_c$  es la tasa de crecimiento para la concentración  $k$ ; y  $k_i$  corresponde a la tasa de crecimiento promedio para el control. El experimento se realizó por triplicado con muestreos diarios.

## 2.1. Análisis de pigmentos fotosintéticos

Las muestras de células de *E. gracilis* fueron colectadas por centrifugación (2500 rpm) a las 72 y 144 h después de la exposición a las diferentes dosis del metal. Posteriormente, 100 mg en promedio de biomasa fresca de *E. gracilis* fueron homogenizados en oscuridad con 1 ml de acetona fría (100%) por 1 min. Una vez homogenizados, los tubos eppendorf de 2 ml conteniendo las muestras de *E. gracilis* y acetona fueron centrifugados a 2500 rpm por 5 min a 4°C. Finalizado el proceso de centrifugación, el sobrenadante de cada muestra fue colectado y el contenido de clorofila a y b y carotenoides totales fueron evaluados a 662, 649 y 470 nm usando un espectrofotómetro de acuerdo a la propuesto por Fargosava et al. (2006). Donde se empleo las ecuaciones de Lichtentaler y Wellbum (1985) que a continuación se describen para el cálculo de los pigmentos fotosintéticos:

$$C_a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$C_b = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000 A_{470} - 2.270 C_a - 81.4 C_b/227$$

Donde  $C_a$  (clorofila a);  $C_b$  (clorofila b); y  $C_{x+c}$  (carotenoides totales)

## 2.2. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico STATISTICA (Statistical Package version 5.5, Statsoft, USA) mediante una prueba de ANOVA y prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## 2.3. Resultados y Discusión

Entre los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) de interés ecotoxicológico, el cobre tiene gran relevancia por sus efectos fisiológicos en los organismos ya que alteran diversas enzimas esenciales en los procesos metabólicos celulares. En el presente trabajo los resultados indicaron que el crecimiento de las células de *E. gracilis* evaluado mediante la densidad celular presentó una disminución de la población expuesta a las diferentes dosis de cobre con respecto al tiempo de exposición (Figura 2).

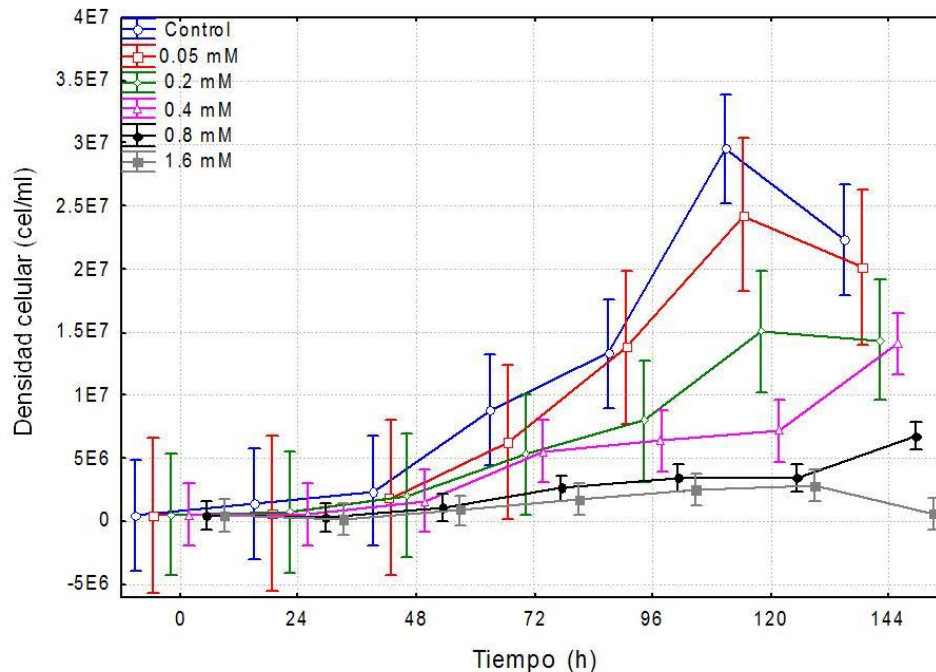


Figura 2. Curva de crecimiento de cultivos de *Euglena gracilis* expuestos a Cobre

Lo cual también se reflejo en la tasa de crecimiento a las 144 h después de la exposición al metal (Figura 3). Siendo las dosis de 0.8 y 1.6 mM las dosis que afectaron en mayor grado la tasa de crecimiento (K) en *E. gracilis*.

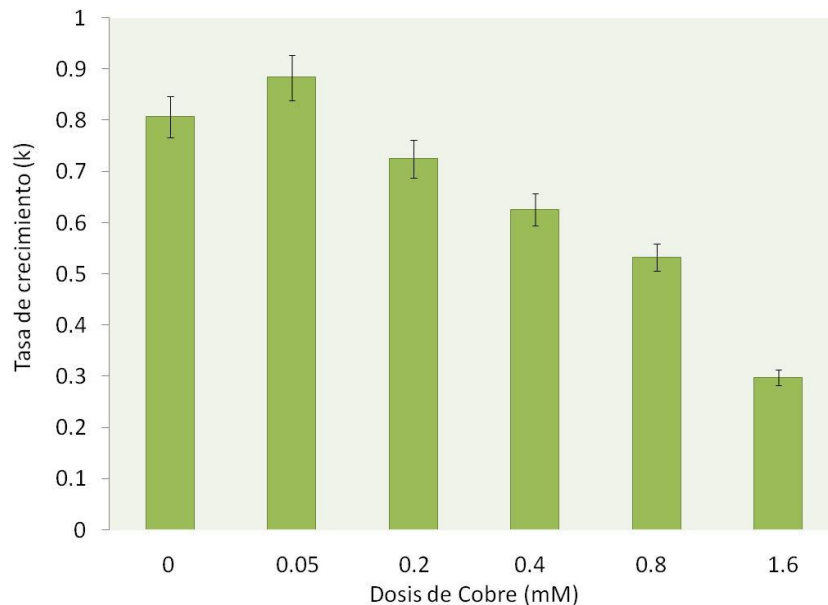


Figura 3.- Tasa de crecimiento (k) de *E. gracilis* a diferentes concentraciones de Cobre después de 144 h de exposición.

Por otra parte al evaluar el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento se observo que la dosis media inhibitoria media (IC50) fue de 0.66 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  al final del experimento (Figura 4). Estos resultados contrastan con lo reportado por Einecker et al. (2002) quien encontró que dosis media inhibitoria media fue de 0.22 mM de  $\text{Cu}^{2+}$ . Lo que indica la posible presencia de mecanismos de tolerancia que podrían estar involucrados en los resultados obtenidos en la cepa *E. gracilis* estudiada.

Otro parámetro empleado para valorar la capacidad de adaptación de *E. gracilis* a los cambios ambientales es la producción de pigmentos, lo cual refleja la viabilidad

celular asociándose con la capacidad fotosintética. Los resultados de la prueba de Tukey's, mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la producción de clorofila a, b y carotenoides totales entre el control y los cultivos expuestos a las diferentes dosis de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 4) al final del experimento. Lo que permite establecer que el  $\text{Cu}^{2+}$  tiene un efecto negativo en la fisiología del organismo que se manifiesta por una disminución de la capacidad fotosintética, coincidiendo con los reportes de otros autores en estudios efectuados en otros microorganismos.

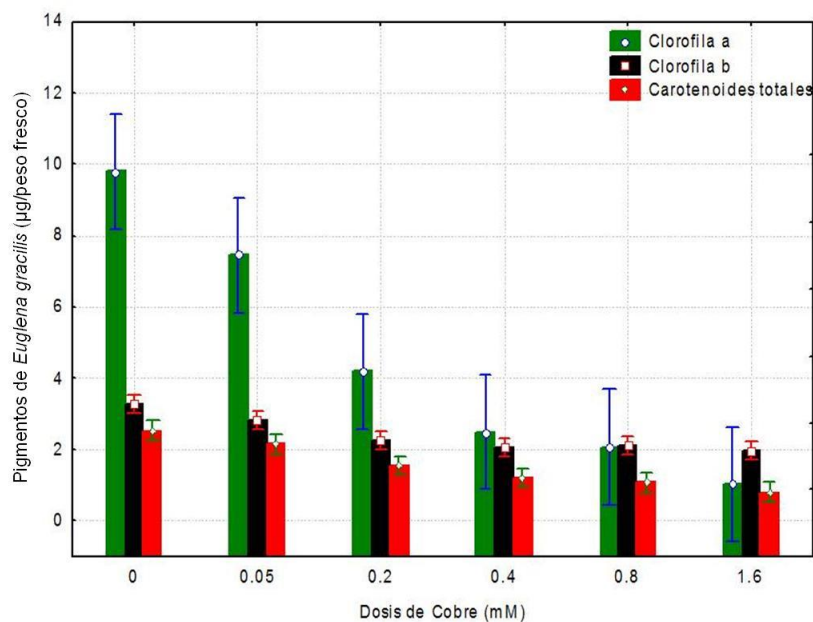


Figura 4. Cambios en los niveles de pigmentos fotosintéticos de *Euglena gracilis* expuestos a diferentes dosis de  $\text{Cu}^{2+}$  después de 144 h de exposición.

## CONCLUSIONES GENERALES

- *E. gracilis* presenta un rango de crecimiento en ambientes ácidos de 5.5, lo cual nos permiten garantizar la biodisponibilidad del Cadmio y Cobre en el medio de cultivo. Lo cual es importante para el estudio de la interacción con los elementos potencialmente tóxicos (EPTs), debido al efecto que tienen los valores de pH en la biodisponibilidad de los EPTs.
- Finalmente, se estableció el valor de pH de 5.5 para la realización de los experimentos de evaluación de la dosis letal media y dosis media de inhibición del crecimiento.
- En el presente estudio de evaluación para el efecto toxico del  $\text{Cu}^{2+}$  en *E. gracilis*, se determino que con una cantidad de 0.8 y 1.6 mM fueron las cepas mas afectadas, Por otra parte la tasa de crecimiento se observo que la dosis media inhibitoria media (IC50) fue de 0.66 mM de  $\text{Cu}^{2+}$ . Lo que indica la posible presencia de mecanismos de tolerancia que podrían estar involucrados en los resultados obtenidos en la cepa *E. gracilis* estudiada.

## LITERATURA CITADA

ATKINSON, B. W., F. BUX Y H. C. KASSAN. 1998. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water Science and Technology*.  
Belliveau, B. H., M. E. Starodub, C. Cotter y J.T. Trevors. 1987. Metal resistance and accumulation in bacteria. *Biotechnol. Adv.* 5:101-127.

BRIERLEY C, BRIERLEY J (1997) Microbiology for the metal mining industry. En Hurst CJ (Ed) *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C. 876pp.

BOSECKER, K. 1986. Bacterial metal recovery and detoxification of industrial waste. *Biotechnol. Bioeng.Symp.* 16:105-119.

DANILOV Y EKELUND. 2001. Applicability of growth rate, cell shape, and motility of *Euglena gracilis* as physiological parameters for bioassessment at lower concentrations of toxic substances: An experimental approach, DOI: 10.1002/1522-7278(2001)16:1<78::AID-TOX90>3.0.CO;2-9

FORD T, RYAN D (1995) Toxic metals in aquatic ecosystems: A microbiological perspective. *Environ. Health Perspect.* 103: 25-28.

GADD, G. M., Y A. J. GRIFFITHS. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.* 4:303–317. 18. Gadd, G. B. 1986. The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. En: *Immobilisation of Ions by Bio-sorption*. H. Ecclesy S. Hunt (eds.). Chichester: Ellis Horwood Ltd, pp. 135-147.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, MA. DEL CARMEN ÁNGELES. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos *TERRA Latinoamericana*, Vol. 23, Núm. 1, enero-marzo, 2005, pp. 29-37

LICHTENTHALER, H.K.; y WELLBURN, A.R.1985. Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf in Different Solvents. *Biol. Soc. Trans.* 11. 591-592.

LINDSAY J, RILEY T (1994) Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression. *Infect. Immun.* 62: 2309-2314.

MENDOZA-CÓZATL, DG.; MORENO-SÁNCHEZ R.2005. Cd<sup>2+</sup> transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta.* 1706 (1-2):88-97.

RODRÍGUEZ-ZAVALA, JS.; GARCÍA-GARCÍA, JD.; ORTIZ-CRUZ, MA.; MORENO-SÁNCHEZ, R. 2007. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 42(10):1365-1378.

SCHWYN B, NEILANDS J (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Ann. Biochem.* 160: 47-56

SHUMATE II, S. E. Y G. W. STRANDBERG. 1985. Accumulation of metals by microbial cells. En: *Comprehensive Biotechnology. Principles, Applications and regulations of Biotechnology in industry, Agriculture and Medicine*. M. Moo-Young, C. N. Robinson, y J. A. Howell (eds.). Pergamon Press, New York. Vol. 4, pp. 235-247.

SILVER S, MISRA T (1988) Plasmid-mediated heavy metal resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 717-43.

KASAN H (1993) The role of waste activated sludge and bacteria in metal-ion removal from solution. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 23: 79-117.

LOVLEY D (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Microbiol. Rev.* 55: 259- 287

TREVORS, J. T., G. W STRATTON, Y G. M. GADD. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447-464