

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Euglena gracilis* AL ESTRÉS POR COBRE

David Cervantes García, Daniel González-Mendoza*, Lourdes Cervantes-Díaz, Adriana Morales Trejo y Onecimo Grimaldo Juárez

Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera a Delta s/n, Código Postal 21705, Ejido Nuevo León - Baja California, México

Roberto Zamora-Bustillos

Instituto Tecnológico de Conkal, km 16.3, Antigua Carretera Mérida-Motul, C. P. 97345 Conkal - Yucatán, México

Recebido em 1/1/11; aceito em 21/2/11; publicado na web em 15/4/11

PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Euglena gracilis* TO COPPER STRESS. The objective of this study was to evaluate the toxic effect of Cu^{2+} in the physiological development of *E. gracilis*. The results showed that *E. gracilis* had an effect on the dose-dependent growth to the concentration of metal. The exposure of *E. gracilis* metal at doses of 0.8 and 1.6 mM of Cu^{2+} showed a significant negative effect on the stability of DNA and photosynthetic pigments involved in capturing light in the antenna complex after 144 h of exposure to the metal.

Keywords: *Euglena gracilis*; copper; photosynthetic pigments.

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.¹

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 (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.²

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.³ En este sentido el protista acuático de vida libre *Euglena gracilis* representa un modelo biológico idóneo para ser empleado en procesos de biorremediación. 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.⁴

Estas propiedades hacen que *Euglena gracilis* pueda ser considerada como un organismo con potencial biotecnológico en la biorremediación 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 más estudiado.⁵ Sin embargo; el efecto tóxico del cobre en la fisiología de *E. gracilis* ha sido poco abordado, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto tóxico del Cu^{2+} en el desarrollo fisiológico de *E. gracilis*.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron experimentos empleando cultivos axénicos de *Euglena gracilis* cepa Z (generosamente donada por el Dr. T. Ishikawa). El experimento consistió en realizar el crecimiento del microorganismo en un medio de cultivo mínimo con la siguiente formulación: acetato de sodio (1 g/L), extracto de carne (1 g/L), Triptona (2 g/L), extracto de levadura (2 g/L) y $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 mg). Los experimentos se realizaron inoculando 1×10^6 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 CuCl_2 . 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 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 7 días y se determinó la tasa de crecimiento k en número de divisiones celulares por día (divisiones/día) a partir de la siguiente fórmula:

$$k = 3.332 \frac{\log N_n - \log N_o}{tn}$$

donde N_n es la densidad celular al final del bioensayo; N_o es la densidad celular inicial nominal y tn 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 (Ik) usando la siguiente fórmula:

$$Ik = \frac{kc - ki}{kc} \times 100$$

donde kc es la tasa de crecimiento para la concentración k ; y ki corresponde a la tasa de crecimiento promedio para el control. El experimento se realizó por triplicado con muestreos diarios.

*e-mail: daniassaf@gmail.com

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 de Cu^{2+} . Posteriormente, 100 mg 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 carotenoides totales y clorofila a y b fueron evaluados a 470 y 662, 649 nm usando un espectrofotómetro. Donde se empleó las ecuaciones de Lichtenthaler y Wellbum,⁶ que a continuación se describen para el cálculo de los pigmentos fotosintéticos:

$$\text{Ca} = 11.75 \text{ A662} - 2.350 \text{ A645}$$

$$\text{Cb} = 18.61 \text{ A645} - 3.960 \text{ A662}$$

$$\text{Cx+c} = 1000 \text{ A470} - 2.270 \text{ Ca} - 81.4 \text{ Cb}/227$$

Donde Ca (clorofila a); Cb (clorofila b); y $\text{C}_{\text{x+c}}$ (carotenoides totales).

Análisis de la fragmentación del ADN de *Euglena gracilis*

Biomasa de *E. gracilis* (100 mg) expuestas a las diferentes dosis del metal fueron colectadas por triplicado al final del experimento de acuerdo a la técnica propuesta por González-Mendoza *et al.*⁷ Una vez obtenido las muestras de ADN, estas fueron observadas por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) teñido con bromuro de etidio por 25 min. Posteriormente los fragmentos fueron visualizados y el porcentaje de daño se calculó por densitometría usando el programa image j.

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 ($\alpha = 0.05$).

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 el crecimiento de *E. gracilis* disminuyó al aumentar las dosis del metal (Figura 1), siendo significativamente mayores la inhibición del crecimiento (0.54 y 0.30) con las dosis de 0.8 y 1.6 mM de Cu^{2+} , respectivamente, al final del experimento (Figura 2). Por otra parte al evaluar el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento se observó que la dosis media inhibitoria (IC_{50}) fue de 0.66 mM de Cu^{2+} al final del experimento. En este sentido, nuestros resultados contrastan con lo reportado por Einecker *et al.*,⁸ quien encontró que la dosis media inhibitoria media fue de 0.22 mM de Cu^{2+} .

Así mismo, Rochetta y Kupper⁹ encontraron que dosis de 50 μM de Cu^{2+} causaron el 90% de muerte en células de *E. gracilis* a los 7 días de exposición. Aunque hay que considerar que para tener una comparación confiable entre los diferentes experimentos que se han realizado y nuestros resultados, se requiere que factores como la concentración del metal y condiciones de cultivo del organismo empleados en las diferentes investigaciones sean similares. Otro parámetro empleado para valorar la capacidad de adaptación de *E.*

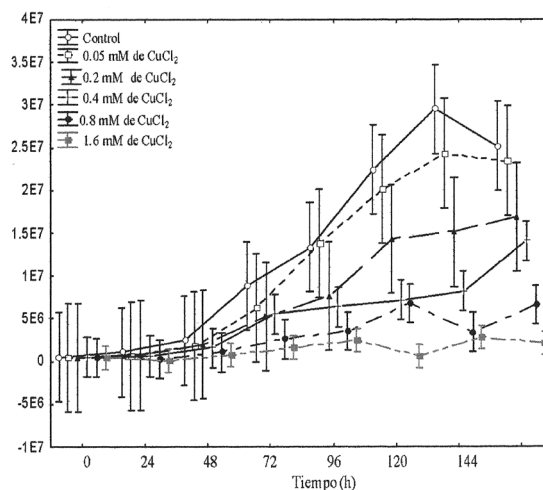


Figura 1. Curva de crecimiento de *Euglena gracilis* expuestas a diferentes dosis (mM) de CuCl_2 a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h después de la exposición al metal

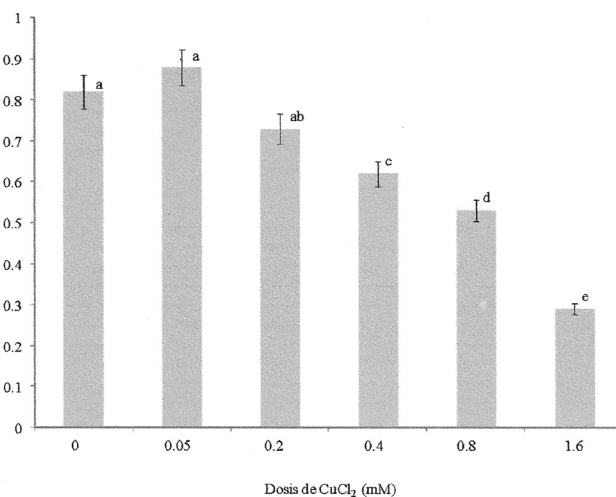


Figura 2. Efecto de diferentes dosis de CuCl_2 (0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM) en la tasa de crecimiento (k) de células de *Euglena gracilis* después de 144 h de exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

gracilis al Cu^{2+} fue la producción de pigmentos fotosintéticos, los cuales están relacionados con la viabilidad celular ya que se asocian con la capacidad fotosintética del organismos.¹⁰ En este sentido, los resultados mostraron que la producción de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales presentaron un comportamiento dosis dependiente ya que se observó una disminución significativa a mayores dosis del metal (Figura 3). Esta reducción en las concentraciones de pigmentos fotosintéticos pueden ser el resultado del efecto directo de los iones de Cu^{2+} que pueden inhibir la síntesis de la clorofila y carotenoides.¹¹ El posible modo de acción del metal en los pigmentos fotosintéticos podría ser debido al incremento de especies reactivas de oxígeno (vía reacción de Fenton), y la disminución de la capacidad antioxidante de la célula. Así como a la capacidad de los iones de Cu^{2+} de interactuar con los grupos N y S de proteínas y alterar la permeabilidad de la membrana.¹² Similares resultados han sido observados en *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) donde dosis concentraciones subletales de Cu^{2+} , ocasionaron una rápida inactivación del fotosistema II, posiblemente como resultado de una disminución de los pigmentos fotosintéticos.¹³

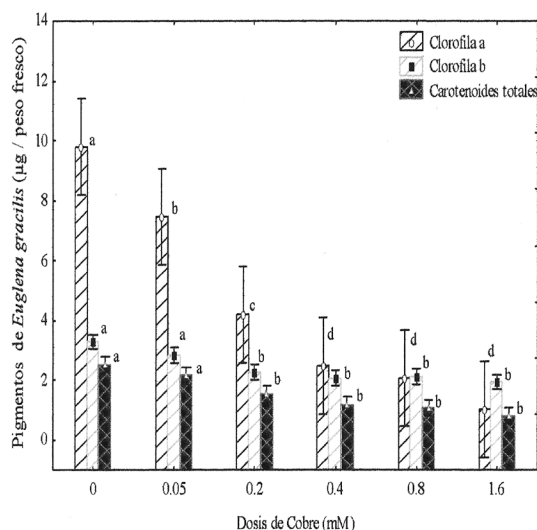


Figura 3. Cambios en los niveles de pigmentos fotosintéticos de *Euglena gracilis* expuestas a 0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM de CuCl_2 después de 144 h de exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

Por otra parte, los radicales libres generados por la exposición a metales pueden alterar el balance redox de las bases pirimidínicas y dañar al ADN.¹⁴

En este sentido nuestros resultados mostraron que la exposición de *E. gracilis* a las dosis altas de Cu^{2+} (0.8 y 1.6 mM) generaron cambios significativos en la integridad del ADN (% de daño del ADN) comparado con el control (Figura 4).

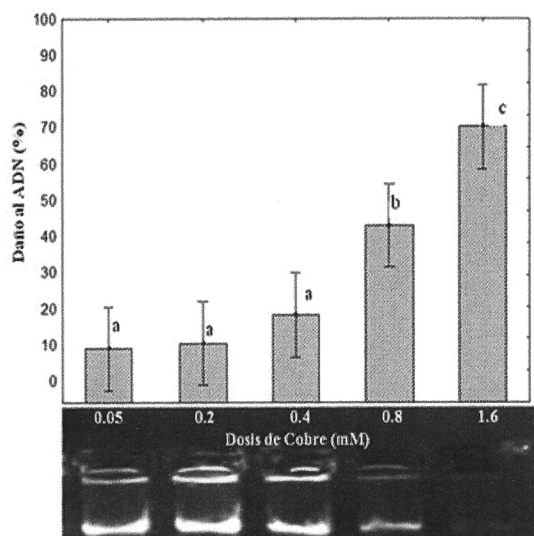


Figura 4. Niveles de daño del ADN en *Euglena gracilis* tratada con 0.05, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mM de CuCl_2 a las 144 h después de la exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

Esto posiblemente a que el Cu^{2+} ha mostrado tener un mayor impacto en la modificación de las bases nitrogenadas del DNA, reflejándose en un mayor daño celular.¹⁴ Estos resultados son similares con lo reportado por Cai y Cherian¹⁵ en donde la exposición de células a metales a diferentes dosis generaba daños visibles en la integridad del ADN, indicando su posible función como un biomarcador de efecto a la exposición de metales. Por otra parte, se observó que los diversos efectos observados en los pigmentos fotosintéticos y en la integridad

del ADN se incrementaron de manera proporcional a la cantidad de metal presente en el medio de cultivo. Estos resultados, desde el punto de vista ecotoxicológico, tienen relevancia para emplear a *Euglena gracilis* como un organismo bioindicador de contaminación por elementos potencialmente tóxicos (eg. cobre) en sistemas acuáticos. Lo anterior también ha sido propuesto por Ahmed y Häder¹⁶ quienes observaron que dosis crónicas de cobre tienden a generar cambios en parámetros fotosintéticos (eg. fluorescencia de la clorofila a) en *E. gracilis*. No obstante, el uso de los pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) y degradación de DNA podrían ser herramientas que podrían contribuir a una mayor aceptación del uso de este organismo como agente indicador de contaminación del agua por metales esenciales. Por otra parte la presencia de moléculas como fitoquelatinas y compuestos fenólicos, pueden actuar en los procesos de acumulación de metales como cadmio en células de *E. gracilis*.⁴

Por lo que es muy posible que la participación de mecanismos como, la producción de ácidos orgánicos, producción de polisacáridos, y/o la presencia de ligandos de alta afinidad, contribuyan al proceso de acumulación de Cu^{2+} por la biomasa de *E. gracilis* (variable no evaluada). Por lo que futuros estudios deben ser encaminados para el estudio de la capacidad de bioacumulación de cobre y de los posibles mecanismos que participarían. Lo cual contribuirá a desarrollar estrategias para el uso de este organismo en procesos de biorremediación en ecosistemas acuáticos.

CONCLUSIONES

En el presente estudio el uso de los pigmentos fotosintéticos y de daño en la integridad del ADN, evaluados pueden ser empleados como indicadores fisiológicos para entender en parte el modo de acción del cobre en el aparato fotosintético del *E. gracilis*. Por otra parte, la capacidad de tolerancia de *E. gracilis* (0.66 mM) nos indica la posible presencia de mecanismos de tolerancia a este metal. Así como el uso de *E. gracilis* como una herramienta potencial en los procesos de diagnóstico de salud de ecosistemas acuáticos expuestos a cobre.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de esta investigación mediante el proyecto No 79234. Así como al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP).

REFERENCIAS

- Gale, S. A.; King, C. K.; Hyne, R. V.; *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, 25, 1887.
- Yruea, I.; *Braz. J. Plant Physiol.* **2005**, 17, 145.
- Mullapudi, S.; Siletzky, M.; Kathariou, S.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, 75, 1464.
- Rodríguez-Zavala, J. S.; García-García, J. D.; Ortiz-Cruz, M. A.; Moreno-Sánchez, R.; *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst.* **2007**, 42, 1365.
- Mendoza-Cózatl, D. G.; Moreno-Sánchez, R.; *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1706, 88.
- Lichtenthaler, H. K.; Wellburn, A. R.; *Biol. Soc. Trans.* **1985**, 11, 591.
- González-Mendoza, D.; Argumedo-Delira, R.; Morales-Trejo, A.; Pulido-Herrera, A.; Cervantes-Díaz, L.; Grimaldo-Juarez, O.; Alarcón, A.; *Genet. Mol. Res.* **2010**, 9, 162.
- Einicker-Lamas, M.; Mezian, G. A.; Fernandes, T. B.; Silva, F. L.; Guerra, F.; Miranda, K.; Attias, M.; Oliveira, M. M.; *Environ. Pollut.* **2002**, 120, 779.
- Rocchetta, I.; Küpper, H.; *New Phytol.* **2009**, 182, 405.

10. MacFarlane, G. R.; Burchett, M. D.; *Mar. Pollut. Bull.* **2001**, *42*, 233.
11. Xing, W.; Huang, W. M.; Liu, G. H.; *Environ. Toxicol.* **2010**, *25*, 103.
12. González-Mendoza, D.; Quiroz-Moreno, A.; Medrano, R. E.; Grimaldo-Juarez, O.; Zapata-Perez, O.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2009**, *64*, 391.
13. Perales-Vela, H. V.; Gonzalez-Moreno, S.; Montes-Horcasitas, C.; Canizares-Villanueva, R. O.; *Chemosphere* **2007**, *67*, 2274.
14. Frenzilli, G.; Ferrucci, M.; Giorgi, F. S.; Blandini, F.; Nigro, M.; Ruggieri, S.; Murri, L.; Paparelli, A.; Fornai, F.; *Behav. Pharmacol.* **2007**, *18*, 471.
15. Cai, L.; Cherian, M. G.; *Toxicol. Lett.* **2003**, *136*, 193.
16. Hoda, A.; Donat-Peter, H.; *J. Appl. Phycol.* **2010**, *22*, 785.