

Short Communication

Evaluación de la bioacumulación de cobre en *Euglena gracilis* mediante la técnica de fluorescencia de rayos X

David Cervantes-García¹, Jose Luis Rubalcaba-Sil²
Daniel Gonzalez-Mendoza¹ & Mónica Avilés-Marín¹

¹Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC)
Carretera a Delta s/n, C.P. 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México

²Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio Colisur, Cubículo FE-11
Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria Delegación Coyoacán
04510 Ciudad de México, México

RESUMEN. En esta investigación se evaluó el efecto de la exposición de cobre en la capacidad de bioacumulación de metal en células de *Euglena gracilis*. La acumulación de metal medida con la técnica de fluorescencia de rayos X (XRF) mostró que la acumulación de Cu⁺² en *E. gracilis* fue dosis dependiente y se incrementó significativamente en las células tratadas con 0.4 y 0.8 mM de Cu⁺² con respecto al control. No se descarta la presencia de una estrategia de acumulación en *E. gracilis* que podría involucrar la participación de una serie de múltiples procesos, como producción de vacuolas. Futuros estudios al respecto deberán orientarse a evaluar la capacidad de bioacumulación de *E. gracilis* para su aplicación en programas de biorremediación de sistemas acuáticos.

Palabras clave: *Euglena gracilis*, XRF, cobre, contaminación, tolerancia, ecotoxicología.

Assessment of copper bioaccumulation in *Euglena gracilis* by X-Ray fluorescence technique

ABSTRACT. The effect of the exposure to copper in metal bioaccumulation capacity in cells from *Euglena gracilis* was evaluated in this study. Metal accumulation measured with the X-ray fluorescence (XRF) technique showed that the accumulation of Cu⁺² in *E. gracilis* was dose dependent and was significantly increased in cells treated with 0.4 and 0.8 mM of Cu⁺² with respect to control. The presence of an accumulation strategy in *E. gracilis* that could involve the participation of a number of multiple processes, such as production of vacuoles, is not discarded. Future studies should be oriented to evaluate the potential for bioaccumulation of *E. gracilis* to be applied in bioremediation of aquatic systems programs.

Keywords: *Euglena gracilis*, XRF, copper, pollution, tolerance, ecotoxicology.

Corresponding author: Daniel González-Mendoza (danasaf@gmail.com)

En el mundo muchas zonas de desarrollo urbano se encuentran cerca de los ecosistemas costeros, los cuales se pueden ver afectados por efluentes de origen industrial, actividades portuarias y de la escorrentía urbana que, a menudo, contiene altas concentraciones de metales potencialmente tóxicos (Cuong *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2013). Dada su presencia y persistencia en ambientes acuáticos, los elementos potencialmente tóxicos (EPT) son un grupo de contaminantes que se evalúa con frecuencia (Johnston & Roberts, 2009). En este sentido, el cobre (Cu⁺²) es un micronutriente esencial para los vegetales y a menudo se encuentra en altas concentraciones en ecosistemas acuáticos (Chen

et al., 2007). Un exceso de este metal puede estimular la formación de radicales libres de especies reactivas de oxígeno y generar estrés oxidativo en el organismo, causando efectos nocivos en la estructura celular (González-Mendoza *et al.*, 2009). Lo anterior ha motivado el uso de organismos modelo, que permitan la evaluación rápida de EPT en ecosistemas acuáticos. Para la selección de microorganismos empleados en la eliminación de iones metálicos se considera su tasa de crecimiento, nivel de tolerancia a EPT y concentración de EPT en el medio (Garbisu *et al.*, 2002). En este sentido, *Euglena* sp. es un organismo ampliamente estudiado ya que tiene la capacidad de crecer en

ambientes acuáticos que poseen altas concentraciones de diferentes metales (Rehman, 2011). Adicionalmente, *E. gracilis* puede ser una alternativa ecotoxicológica para usarlo como indicador de contaminación en medios acuáticos (Ahmed & Hader, 2010). Esto involucra el uso de técnicas de determinación rápida de la capacidad de bioacumulación de los microorganismos cuando se desarrollan en un ambiente con metales.

La técnica de fluorescencia de rayos X (XRF), representa una alternativa viable, ya que es una poderosa técnica de análisis instrumental multi-elemental no destructiva de alta sensibilidad (ppm), que se basa en la detección de rayos X característicos emitidos por los átomos de una muestra irradiada por un haz primario de rayos X, generalmente producido en un tubo de rayos X de molibdeno o rodio (Ruvalcaba *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar que la técnica de XRF ha sido aplicada al estudio de acumulación de metales por plantas (Tsumumimoto & Tsuji, 2007), actualmente no hay información disponible sobre su aplicación en microorganismos como *E. gracilis* expuestos al cobre. Por otra parte, aún cuando estudios recientes han abordado el estudio de la respuesta fisiológica de *E. gracilis* a diferentes dosis de cobre (García-Cervantes *et al.*, 2011), su capacidad de bioacumulación como mecanismo de protección de la célula al ser expuesta a diferentes dosis de cobre ha sido poco estudiada. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de bioacumulación mediante la técnica de XRF y la respuesta antioxidante en células de *Euglena gracilis* expuestas a diferentes dosis de cobre.

Se realizaron experimentos empleando cultivos axénicos de *E. gracilis* cepa Z (Carolina Biological Supply®). 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⁻¹), extracto de carne (1 g L⁻¹), triptona (2 g L⁻¹), extracto de levadura (2 g L⁻¹) y CaCl₂H₂O₂ (10 mg). Los experimentos se realizaron inoculando 2x10⁵ células obtenidas de la fase exponencial (seis días de crecimiento) en matraces de 1 L con dosis de 0; 0,4; y 0,8, dosis menor y mayor a la dosis letal media de sulfato de cobre previamente obtenida (0,6 mM). Los matraces se mantuvieron bajo luz blanca fría continua con intensidad lumínica de 90 ± 10 μmol m⁻² s⁻¹, a temperatura de 24 ± 2°C y agitación manual dos veces al día. A los tres días después de la exposición con cobre la biomasa fue obtenida por centrifugación (1000 x g para 10 min en 10°C) y fue resuspendida en una solución de EDTA 0,02 M disuelta con agua bidestilada y desionizada (el lavado con EDTA extrae el cobre adsorbido a la superficie celular). Las células permanecieron en esta solución durante 3 min,

posteriormente se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, la biomasa de cada tratamiento fue secada y liofilizada, para su almacenamiento a temperatura ambiente en un desecador hasta su posterior uso.

El análisis multielemental directo de las muestras se efectuó mediante el equipo de XRF SANDRA (Sistema de análisis no destructivo por rayos X) del Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México (Ruvalcaba *et al.*, 2010). Para el análisis de las muestras se tomaron 300 mg de biomasa liofilizada de cada tratamiento y se comprimió, hasta formar una pastilla de 0,5 a 1,0 cm de diámetro. Para el análisis de las muestras con la técnica XRF, se empleó un haz de rayos X de molibdeno de 1 mm de diámetro, con potencial de 35 keV y 0,2 mA en el tubo. Cada irradiación duró en promedio 10 min. La detección de rayos X se realizó con un detector Si-PIN Amptek a 45° del haz primario de rayos X, y normal a la superficie de la muestra. Para la calibración del sistema y el análisis cuantitativo, se irradió bajo las mismas condiciones referencias certificadas de diversos materiales biológicos del National Institute for Standards and Technology (NIST) SRM 1573a (hojas de tomate), y la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA) SRM 16 (acelga), SRM 392 (alga), SRM 286 y SRM 336 (líquenes), y SRM 359 (col), estos últimos usualmente empleados en estudios con biomonitores con técnicas de rayos X patrocinados por la AIEA (Cervantes *et al.*, 2008). La intensidad de rayos X de los elementos detectados en las muestras se midió con el programa AXIL (Vekemans *et al.*, 1994) y el análisis cuantitativo se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Rousseau *et al.* (1996). La absorción de los iones de Cu²⁺ en los tejidos de *E. gracilis*, se calculó usando el factor de bioacumulación (FBA) que proporciona información sobre la habilidad del vegetal de acumular metales con respecto a la concentración de metales presentes en la solución nutritiva. El FBA se determinó usando la siguiente fórmula:

$$FBA = [Cu^{2+}] [Cu^{2+}]_0^{-1}$$

donde [Cu²⁺] es la concentración de cobre en la biomasa de *Euglena* (ppm) y [Cu²⁺]₀ es la concentración inicial del metal adicionado a la solución nutritiva (ppm).

El experimento se realizó al azar con tres repeticiones. Las diferencias significativas entre las muestras tratadas y control fueron analizadas usando la prueba de Kruskal-Wallis (Statistical Package version 5.5, Statsoft, USA). En la Figura 1 se muestra los espectros típicos de fluorescencia de rayos X para una muestra y las concentraciones de Cu²⁺ en solución, donde se observó un incremento en la intensidad de los rayos X de Cu²⁺ conforme se incrementó la dosis de metal. Los resultados de acumulación del Cu²⁺ en las células de *E. gracilis* tratadas con respecto al control

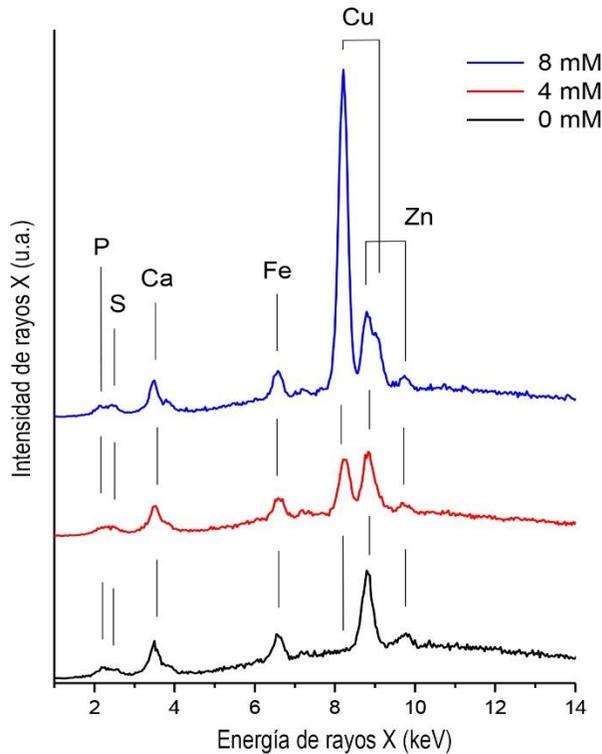


Figura 1. Espectros de fluorescencia de rayos X de *Euglena gracilis* en función de la dosis de cobre en solución.

mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de 0,4 y 0,8 mM de cobre ($P = 0,0273$). A medida que se incrementó la dosis de cobre de 0,4 mM a 0,8 mM se observó una mayor acumulación de metal en la biomasa de *E. gracilis* con respecto al control, de 6000 a 12000 ppm, respectivamente (Fig. 2). Con respecto al factor de bioacumulación (FBA), los resultados indicaron que *E. gracilis* tiene un FBA alto, que puede incrementarse a medida que se duplica la dosis de metal presente en el medio de cultivo (Tabla 1).

Siguiendo el criterio de Brooks (1998), quien clasifica como hiper-acumuladores a los organismos que presentan más de 1000 ppm de metal(es) en sus tejidos. En base a estos resultados, se puede señalar que *E. gracilis* es un organismo hiper-acumulador de Cu^{2+} dadas las altas concentraciones detectadas en su biomasa. Además, estos resultados indican la presencia de una estrategia de acumulación que podría involucrar la participación de múltiples procesos, tales como la producción de vacuolas (Einicker-Lamas *et al.*, 2002). Por otra parte, no se descarta la presencia de ligandos de alta afinidad, por ejemplo es posible que estén presentes proteínas como la fitoquelatin sintetasa. Ésta

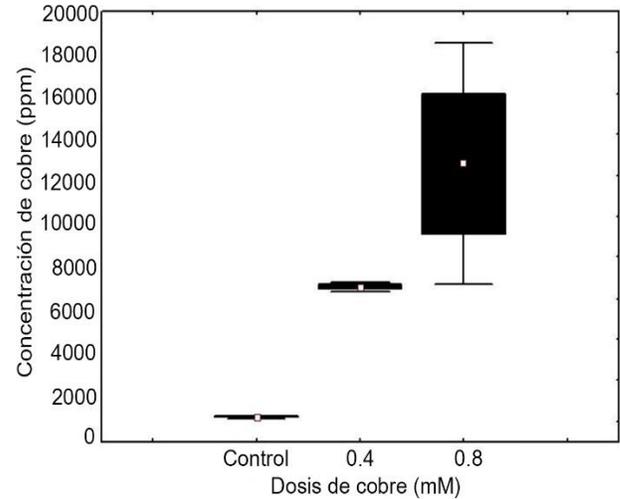


Figura 2. Concentración de cobre (ppm) determinada por la técnica de XRF en células de *Euglena gracilis* expuestas a diferentes concentraciones de Cu^{2+} en medio de cultivo durante 72 h. Los bloques muestran la mediana, 25 y 75%, las barras indican los valores mínimo y máximo, $n = 3$.

Tabla 1. Factor de bioacumulación de *Euglena gracilis* a dosis de cobre. Medias con diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferente a $P = 0,05$. Los resultados con medias de tres réplicas por tratamiento.

| Dosis de Cu (mM) | Factor de bioacumulación (FBA) |
|------------------|--------------------------------|
| Control | 0 |
| 0,4 | 114 ± 11^a |
| 0,8 | 133 ± 30^{ab} |

es una proteína rica en cisteína (γ -glutamilcisteína (γ -Glu-Cys) dipeptidil transpeptidasa), que se localiza en el citoplasma donde participa en la síntesis de las fitoquelatinas (FQs) a partir del glutatión (GSH) y en presencia de ciertos metales (Loscos *et al.*, 2006).

Futuros estudios deben encaminarse a determinar la presencia de enzimas antioxidantes en células de *E. gracilis* tratadas con metales esenciales. *E. gracilis* es un organismo hiper-acumulador de Cu^{2+} dadas las altas concentraciones detectadas en su biomasa. Además, la técnica de XRF mostró una gran ventaja ya que gracias a su sensibilidad y la notable acumulación de Cu es factible evaluar directamente su presencia empleando una baja cantidad de biomasa y escaso consumo de insumos. No se descarta la presencia de una estrategia de acumulación en *E. gracilis* que podría involucrar la participación de múltiples procesos, tales como la producción de vacuolas o compuestos quelatantes.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de esta investigación mediante el proyecto No 79234. Así como al Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades recibidas para la realización del estudio.

REFERENCIAS

- Ahmed, H. & D.P. Häder. 2010. Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environ. Experim. Bot.*, 69: 68-75.
- Brooks, R.R. 1998. Plants that hyperaccumulate heavy metals, their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining. CAB International, New York, 380 pp.
- Cervantes, L., O. Ávila, J.L. Ruvalcaba, J. Miranda & R. Muñoz. 2008. The use of biomonitors and PIXE analysis in the study of air pollution in Mexico City. *X-ray Spectrom.*, 37: 156-162.
- Chen, C.W., C.M. Kao, C.F. Chen & C.D. Dong. 2007. Distribution and accumulation of heavy metals in the sediments of Kaohsiung harbor, Taiwan. *Chemosphere*, 66: 1431-1440.
- Cuong, D.T., S. Bayen, O. Wurl, K. Subramanian, K.K. Shing Wong, N. Sivasothi & J.P. Obbard. 2005. Heavy metal contamination in mangrove habitats of Singapore. *Mar. Pollut. Bull.*, 50: 1732-1738.
- Einicker-Lamas, M., G.A. Mezian, T.B. Fernandes, F.L. Silva, F. Guerra & K. Miranda. 2002. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environ. Pollut.*, 120: 779-786.
- Garbisu, C., J. Hernandez-Allica, O. Barrutia, I. Alkorta & J.M. Becerril. 2002. Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. *Rev. Environ. Health*, 17: 173-188.
- García, A., P. Bernárdez & R. Prego. 2013. Copper in Galician ria sediments: natural levels and harbour contamination. *Sci. Mar.*, 77(Suppl. 1): 91-99.
- García-Cervantes, D., D. González-Mendoza, L. Cervantes-Díaz, A. Morales-Trejo, O. Grimaldo-Juárez & R. Zamora-Bustillos. 2011. Respuesta fisiológica de *Euglena gracilis* al estrés por cobre. *Química Nova*, 34: 1211-1214.
- González-Mendoza, D., A. Quiroz-Moreno, R.E. Medrano, O. Grimaldo-Juarez & O. Zapata-Perez. 2009. Cell viability and leakage of electrolytes in *Avicennia germinans* exposed to heavy metals. *Z. Naturforsch. C*, 64: 391-394.
- Johnston, E. & D. Roberts. 2009. Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: a review and meta-analysis. *Environ. Pollut.*, 157: 1745-1752.
- Loscos, J., L. Naya, J. Ramos, M.R. Clemente, M.A. Matamoros & M. Becana. 2006. A reassessment of substrate specificity and activation of phytochelatin synthases from model plants by physiologically relevant metals. *Plant Physiol.*, 140: 1213-1221.
- Rehman, A. 2011. Heavy metals uptake by *Euglena proxima* isolated from tannery effluents and its potential use in wastewater treatment. *Russ. J. Ecol.*, 42: 44-49.
- Rousseau, R.M., J.P. Willis & A.R. Duncan. 1996. Practical XRF calibration procedures for major and trace elements. *X-Ray Spectrom.*, 25: 179-189.
- Ruvalcaba, J.L., D. Ramírez, V.F. Aguilar & F. Picazo. 2010. SANDRA: a portable XRF system for the study of Mexican cultural heritage. *X-Ray Spectrom.*, 39: 338-345.
- Tsutsumimoto, K. & K. Tsuji. 2007. Time-resolved X-Ray fluorescence for monitoring the intake of mineral nutrients in living plants. *X-Ray Spectrom.*, 36: 324-327.
- Vekemans, B.K., L. Janssens, L. Vincze, F. Adams & P. Van Espen. 1994. Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): new developments. *X-Ray Spectrom.*, 23: 278-285.

Received: 7 October 2013; Accepted: 30 June 2014