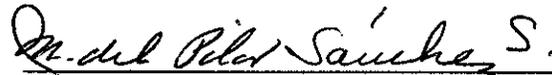


TESIS DEFENDIDA POR  
**Flor Guadalupe Sánchez Alejandro**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
*Director del Comité*



Dra. Ernestina Castro Longoria  
*Miembro del Comité*



Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez  
*Miembro del Comité*

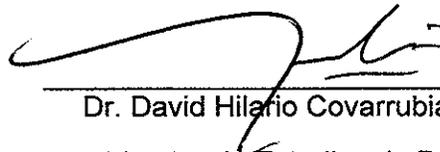


Dr. Edgar Alonso Reynoso Soto  
*Miembro del Comité*



Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del programa de posgrado  
en Ciencias de la Vida con Orientación  
en Microbiología*



Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de Estudios de Posgrado*

3 de octubre de 2011.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA  
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

---

**OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE FRÚSTULAS CON TITANIO PARA  
APLICACIONES EN OPTOELECTRÓNICA**

**TESIS**

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

**FLOR GUADALUPE SÁNCHEZ ALEJANDRO**

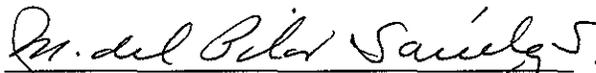
Ensenada, Baja California, México, octubre de 2011.

---

**RESUMEN** de la tesis de **Flor Guadalupe Sánchez Alejandro**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en MICROBIOLOGÍA. Ensenada, Baja California. **Octubre de 2011.**

## **OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE FRÚSTULAS CON TITANIO PARA APLICACIONES EN OPTOELECTRÓNICA**

Resumen aprobado por:

  
Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Director de Tesis

Diversas microestructuras de silicatos son formadas por microorganismos autótrofos conocidos como diatomeas, los cuales requieren algunos metales para su crecimiento. Las microestructuras formadas presentan diversas ornamentaciones que van de 10 a 1000 nm. Estas características son de interés para el diseño de materiales a nano y micro escala para diversas aplicaciones como: en la degradación de contaminantes, la obtención de estructuras que requieren menor costo energético de elaboración y mantenimiento, el desarrollo de materiales que absorban y propaguen algún tipo de radiación electromagnética. En esta investigación se generó conocimiento sobre el metabolismo de los metales en las diatomeas mediante la evaluación de su fisiología, capacidad de crecimiento y deposición de titanio en las frústulas, o pared celular de silicatos. Las diatomeas fueron cultivadas en condiciones controladas con altas concentraciones de titanio: 46  $\mu\text{M}$ . En dichos tratamientos las diatomeas crecieron de forma saludable, sus frústulas no tuvieron deformaciones estructurales y se comprobó la presencia de  $\text{TiO}_2$  en ellas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía Raman. El grado de acumulación de titanio en las frústulas fue medido en  $\text{gTi}/100\text{g SiO}_2$  resultando en 11.8 para la especie *Nitzschia laevis* y 10.0 para *Navicula incerta*. Esta composición química no modificó de forma significativa las secciones transversales ópticas medidas en luz de 400 a 880 nm para las fases amorfas y cristalinas. Se estableció un nuevo método de obtención de  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  fácil, rápido y que no requiere de gran control para que las diatomeas puedan crecer al ser adicionado al medio de cultivo. La evidencia indica que con el cultivo de ambas especies en las condiciones ensayadas y con la transformación térmica de frústulas pueden ser obtenidos materiales mesoestructurados a base de silicatos y  $\text{TiO}_2$  de morfologías especie-específicas. Estos materiales tienen los requerimientos básicos y de potencial uso en optoelectrónica. Su aplicación específica en distintos productos y procesos requerirá una caracterización mayor de sus propiedades eléctricas y químicas.

**Palabras clave:** Diatomeas, dióxido de titanio, silicatos, crecimiento, propiedades ópticas.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Flor Guadalupe Sánchez Alejandro**, in partial fulfillment of the requirements of MASTER OF SCIENCE DEGREE in LIFE SCIENCES with orientation in MICROBIOLOGY. Ensenada, Baja California. **October of 2011.**

## **OBTENTION AND EVALUATION OF FRUSTULUMS WITH TITANIUM FOR OPTOELECTRONIC APPLICATIONS**

Silicate microstructures are formed by autotrophic microorganisms known as diatoms, which require metals for their growth. The silica microstructures formed have ornamentations that range in size from 10-1000 nm. These diatoms structural characteristics are of interest for the design of several nano and microscale applications such as pollutant degradation, building of structures that require less energy in their construction and maintenance, and the development of materials that can absorb or propagate certain type of electromagnetic radiation. In this research we study the diatoms metal metabolism through evaluation of their physiological status, growth rate and titanium deposition in frustule or silica cell walls. Diatoms were cultured in high concentrations of titanium (46  $\mu\text{M}$ ) in controlled conditions, and in all treatments diatoms grew healthy without frustule deformations, and the presence of  $\text{TiO}_2$  in all structures was corroborated by electronic transmission microscope (TEM) and Raman spectroscopy. The degree of titanium accumulation in frustule measured as g Ti/100 g of  $\text{SiO}_2$  was 11.8 for *Nitzschia laevis* and 10.0 for *Navicula incerta*. This new chemical composite did not affect significantly the optic transversal sections measured in wavelength range from 400 – 880 nm for amorphous and crystalline phases. A new easy and fast protocol to obtain  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  as an additive of the culture media was developed and did not compromise the diatom growth. Results indicated that mesostructured species-specific morphological materials that contain silicates and  $\text{TiO}_2$  were obtained by thermic transformation of the resulting frustules in the mentioned culture conditions. These new materials fulfill the basic requirements and potential use for optoelectronics. For their specific application in several products and processes is necessary to characterize their electric and chemical properties to be applied on.

**Key words:** Diatoms, titanium dioxide, silicates, growth, optoelectronic properties.

*Por la bendición de su existencia y por el tiempo que no estuve con ellos pero que siempre  
los tuve en mi mente, dedico este trabajo a mis padres:*

*José Reyes Sánchez Ortega y María del Socorro Alejandro Rubio;*

*a mis hermanos y a mi cuñada:*

*Adán, Juan, Reyes, Oscar, Diego y Olga;*

*y a mis nanos:*

*Nan, Pepe, Mimina y Arturito.*

*Soy un soñador práctico; mis sueños no son bagatelas en el aire. Lo que yo quiero es  
convertir mis sueños en realidad.*

*Gandhi*

---

Agradezco a Dios haberme dado vida, salud y las experiencias que vinieron junto con ello en este periodo.

A mi familia por su amor incondicional.

A la M.C. Lupita Martínez por ser siempre un gran ejemplo y porque la quiero mucho y siempre estuvo muy pendiente de que todo estuviera bien aquí.

A Daniel García Briones por su compañía estos años.

A mis amigos, *todos*, por su constante motivación, alegrías y pseudotristezas compartidas. A los que estuvimos cerca y que a veces parecía que estábamos lejos, sobre todo a los que de verdad estamos. *No olvido todos sus detalles.*

A mi comité de tesis:

Dra. Pilar Sánchez por su gran apoyo como maestra, amiga y directora de este trabajo,

Dra. Ernestina Castro por su apoyo como maestra y sinodal,

Dr. Eugenio Méndez por su paciencia y apoyo como maestro y sinodal,

Dr. Edgar Reynoso por su apoyo como amigo y sinodal.

A todos los alumnos, doctores, técnicos, secretarías y personal de apoyo del Departamento de Acuicultura, donde pasé la mayor parte del tiempo y quienes con su presencia y apoyo hicieron de mi estancia algo muy bonito.

Al Dr. Méndez y al Dr. Emiliano Terán del Laboratorio de Óptica Estadística de la División de Física Aplicada de CICESE donde se realizaron las mediciones de las secciones transversales.

Al Dr. Gabriel Alonso por facilitarme los análisis de microscopía Raman y el uso del horno tubular. Al Dr. Reynoso y Al Dr. Noé Díaz de León por su amistad y diálogos para entender muchas cosas nuevas para mí y esenciales para este trabajo. Los tres investigadores del Laboratorio de Desulfuración de Hidrocarburos en el CNyN-UNAM, Ensenada.

A la Srita. Brisa Andrea Ramírez por ayudarme con algunos conteos celulares.

Al Dr. Thomas Kretzschmar por facilitar los análisis de espectroscopía de emisión atómica acoplada con plasma y al Técnico Titular Mario Vega por su alegre disponibilidad y apoyo durante la realización de dichos análisis en el Laboratorio de Hidrogeoquímica de la División de Ciencias de la Tierra del CICESE.

Al Sr. Francisco Ruiz por su atenta ayuda en la toma de imágenes de microscopía electrónica de transmisión en el CNyN-UNAM, Ensenada.

A la G. Eloísa Aparicio por su amable asesoría y ayuda con la toma de espectros de difracción de Rayos X en el laboratorio de mismo nombre en el CNyN-UNAM, Ensenada.

Al Dr. Felipe Castrillón por su amplia disponibilidad y ayuda con la toma de los espectros de infrarojo y UV-Vis en el Laboratorio de Nanocatálisis del CNyN-UNAM, Ensenada.

A la Dra. Lucila Lares de la División de Oceanología del CICESE y al Dr. Hugo Tiznado del CNyN-UNAM Ensenada, por prestarme material para que no me atrasara en algunos procesos experimentales.

Al Dr. Manuel Segovia del Departamento de Acuicultura por su apoyo como maestro y por la edición del resumen en inglés de este trabajo.

Al Dr. David Covarrubias por su apoyo a través de la Dirección de Estudios de posgrado por la beca parcial para la asistencia al curso de Técnicas en Biología Molecular impartido en la Universidad Autónoma de Baja California.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de estudios y manutención brindada y a CICESE por la oportunidad de estudiar aquí.

Al apoyo económico para la realización de esta tesis a través de los proyectos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT 130074) y de la Red de Fuentes de Energía (RED-FE 125079).

## CONTENIDO

	Página
<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Capítulo II. Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
II.1. Biología de las Bacillariophyceae .....	3
II.1.1. Biomineralización .....	3
II.1.2. Metabolismo de silicio .....	4
II.2. Utilización de micro y nanoestructuras de silicio y titanio .....	7
II.3. Propagación de luz en medios inhomogéneos y secciones transversales de las partículas en ellos.....	9
<b>Capítulo III. Justificación</b> .....	<b>11</b>
<b>Capítulo IV. Hipótesis</b> .....	<b>12</b>
<b>Capítulo V. Objetivos</b> .....	<b>13</b>
V.1. Objetivo general.....	13
V.2. Objetivos específicos .....	13
<b>Capítulo VI. Materiales y métodos</b> .....	<b>14</b>
VI.1. Características de las diatomeas .....	14
VI.1.1. Respaldos celulares e inóculos.....	14
VI.2. Tolerancia a las condiciones experimentales.....	15
VI.2.1. Variables poblacionales .....	17
VI.2.2. Fotosíntesis.....	17
VI.3. Biomineralización .....	18
VI.4. Morfología y propiedades ópticas. ....	20
VI.5. Tratamiento estadístico de los resultados .....	21
<b>Capítulo VII. Resultados</b> .....	<b>22</b>
VII.1. Tolerancia .....	22
VII.1. 1. Caracterización de precursores de hidróxidos de titanio.....	22
VII.1.2. Tolerancia a etanol anhidro.....	26
VII.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones de hidróxidos de titanio sintetizados por dos protocolos distintos .....	27

VII.1.4. Cultivo de las diatomeas con concentraciones mayores de hidróxido de titanio.....	32
VII.2. Biomineralización.....	33
VII.2.1. Utilización de Si y Ti.....	33
VII.2.2. Utilización de silicatos y titanio en las primeras 24 horas.....	37
VII.2.3. Hidróxido de titanio en la solución sin esterilizar como fuente de titanio en el medio de cultivo.....	40
<b>Capítulo VIII. Discusión.....</b>	<b>55</b>
VIII.1. Observaciones a la sección de materiales y métodos.....	55
VIII.2. Físicoquímica y óptica de las estructuras formadas.....	58
VIII.3. Fisiología de las diatomeas en los tratamientos con y sin titanio.....	61
<b>Capítulo IX. Conclusión.....</b>	<b>64</b>
<b>Capítulo X. Recomendaciones.....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo XI. Literatura citada.....</b>	<b>67</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Espectro de absorbancia en infrarrojo de los precursores de las primeras soluciones madre de titanio. A: espectro del precipitado sintetizado por el protocolo de Kotsokechagia et al. (2008), obtenido mediante $TiCl_4$ y etanol-benzil alcohol. B: espectro del precipitado según Jeffryes et al. (2008) a partir de titanio (IV) oxisulfato e hidróxido de sodio.	23
2	Espectro de absorbancia en luz ultravioleta y visible de la muestra sintetizada por el protocolo de Kotsokechagia et al. (2008) [A] y de Jeffryes et al. (2008) [B].	24
3	Difractogramas de rayos x del precipitado de anatasa obtenido con el protocolo de tetracloruro de titanio y alcoholes según Kotsokechagia et al (2008) y con el protocolo de precipitación de titanio (IV) oxisulfato en hidróxido de sodio según Jeffryes et al. (2008).	25
4	Células por mililitro (cél $mL^{-1}$ ) de <i>Nitzschia laevis</i>  y <i>Navicula incerta</i>  en el noveno día de cultivo con etanol anhidro de 0 a 10% en medio F, (a>b>c>d, 1>2>3>4).	26
5	Células por mililitro (cél $mL^{-1}$ ) de <i>Nitzschia laevis</i>  y <i>Navicula incerta</i>  en el noveno día de cultivo con etanol anhidro de 0 a 10% en medio F, (a>b>c, 1>2>3>4).	27
6	Número de células por mililitro de <i>Nitzschia laevis</i> durante siete días de cultivo en medio F con distinta concentración micromolar de titanio obtenido por dos protocolos. Para el protocolo de Jeffryes et al. (2008) [A] fueron probadas las concentraciones 0.8 [.....], 2.3 [— —], 4 [— . .] y 6.4 [— — —] $\mu M$ de Ti. En tanto, para el protocolo de Kotsokechagia et al. (2008) [B] se utilizaron concentraciones de 0.003 [.....], 0.008 [— —], 0.013 [— . .] y 0.021 [— — —] $\mu M$ de Ti. Tanto en A como en B [— — —] representa el tratamiento control.	28
7	Número de células por mililitro de <i>Navicula incerta</i> durante siete días de cultivo en medio F con distinta concentración micromolar de titanio obtenido por dos protocolos. Para el protocolo de Jeffryes et al. (2008) [A] fueron probadas las concentraciones 0.8 [.....], 2.3 [— —], 4 [— . .] y 6.4 [— — —] $\mu M$ de Ti. En tanto, para el protocolo de Kotsokechagia et al. (2008) [B] se utilizaron concentraciones de 0.003 [.....], 0.008 [— —], 0.013 [— . .] y 0.021 [— — —] $\mu M$ de Ti. Tanto en A como en B [— — —] representa el tratamiento control.	29
8	Microgramos por litro de clorofila a evaluados al séptimo día de cultivo de <i>Nitzschia laevis</i>  y <i>Navicula incerta</i>  en medio F con distintas concentraciones de titanio disuelto obtenido por el protocolo de Jeffryes et al. (2008) y de Kotsokechagia et al. (2008).	30

- 9 Microgramos por litro de carotenos totales evaluados al séptimo día de cultivo de *Nitzschia laevis* [■] y *Navicula incerta* [▨] en medio F con distintas concentraciones de titanio disuelto obtenido por el protocolo de Jeffryes et al. (2008) y de Kotscokechiaga et al. (2008). 31
- 10 Número de células por mililitro de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* en el cuarto día de cultivo en medio F con distintas concentraciones de la solución madre de titanio esterilizada obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotscokechagia et al. (2008). Las barras representan a *N. incerta* [▨] y a *Nitzschia laevis* [■]. 32
- 11 Número de células por mililitro de *Nitzschia laevis* (A) y *Navicula incerta* (B) cultivadas en 0 y 40 micromolar de titanio obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotscokechagia et al. (2008) [solución K' esterilizada]. Tratamientos control [—] y de titanio para *Nitzschia laevis* [.....] y *N. incerta* [— —]. 33
- 12 Concentración en ppm de silicio (A y B) y de titanio (C y D) disueltos en el medio extracelular de *Nitzschia laevis* [(.....) A y C] y *Navicula incerta* [(— —) B y D] durante 5 días de cultivo. Los tratamientos control de ambas especies [—] corresponden a cultivos en medio F sin adición de titanio. 34
- 13 Gramos de materia de diatomeas por mililitro de medio de cultivo. Peso seco total [■], peso seco de cenizas [▨] y peso seco orgánico [▩] de *Nitzschia laevis* en el tratamiento control (LC) y en el tratamiento 40  $\mu\text{M}$  de Ti (LTi), así como de *Navicula incerta* en el tratamiento control (IC) y en 40  $\mu\text{M}$  de Ti (ITi). El titanio disuelto en el medio de cultivo F fue obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotscokechagia et al. (2008). 35
- 14 Microgramos por litro de clorofila a (A) y carotenos totales (B) de *Nitzschia laevis* [■] y *Navicula incerta* [▨] cultivadas en medio F más 40  $\mu\text{M}$  de titanio obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotscokechagia et al. (2008). 36
- 15 Acumulación de titanio por cada 100 gramos de óxido de silicio de las frústulas de *Navicula incerta* (IRT) y *Nitzschia laevis* (LRT), así como en sus tratamientos control, IR0 y LR0 respectivamente. 37
- 16 Células por mililitro producidas durante 24 horas de cultivo en 0 [—] y 40  $\mu\text{M}$  de Ti para *Nitzschia laevis* (A) [.....] y para *Navicula incerta* (B) [— —]. 38
- 17 Concentración en ppm de silicio (A y B) y de titanio (C y D) disuelto en el medio extracelular de *Nitzschia laevis* (A y C) y *Navicula incerta* (B y D) durante 24 horas de cultivo. Los tratamientos control [—] corresponden a cultivos en medio F sin adición de titanio. Los tratamientos para *Nitzschia laevis* [.....] y *Navicula incerta* [— —]. 39

- fueron preparados de forma similar a los controles pero con adición de titanio.
- 18 Células por mililitro producidas durante 24 horas de cultivo en 0 [—] y 46  $\mu\text{M}$  de Ti para *Nitzschia laevis* (A) [.....] y para *Navicula incerta* (B) [— — —]. 40
- 19 Concentración en ppm de silicio (A y B) y de titanio (C y D) disuelto en el medio extracelular de *Nitzschia laevis* (A y C) y *Navicula incerta* (B y D) durante 240 horas de cultivo. Los tratamientos control [—] corresponden a cultivos en medio F sin adición de titanio. Los tratamientos para *Nitzschia laevis* [.....] y *Navicula incerta* [— — —] fueron preparados de forma similar a los controles pero con adición de titanio. 41
- 20 Gramos de materia de diatomeas por mililitro de medio de cultivo. Peso seco total [▣], peso seco de cenizas [▤] y peso seco orgánico [▥] de *Nitzschia laevis* en el tratamiento control (LC) y en el tratamiento 46  $\mu\text{M}$  de Ti (LTi), así como de *Navicula incerta* en el tratamiento control (IC) y en 46  $\mu\text{M}$  de Ti (ITi). El titanio disuelto en el medio de cultivo F fue obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado y sin esterilizar, según Kotsokechagia et al. (2008). 42
- 21 Microgramos por litro de clorofila a (A) y carotenos totales (B) de *Nitzschia laevis* [▣] y *Navicula incerta* [▤] cultivadas durante 10 días en medio F más titanio obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado y sin esterilizar, según Kotsokechagia et al. (2008). 43
- 22 Liberación de oxígeno como respuesta a diferentes irradiancias de luz blanca. Las células pertenecen a los cultivos control (—) en medio F sin adición de titanio así como, de *Nitzschia laevis* (.....) [A] y *Navicula incerta* (— — —) [B] preparados de forma similar a los controles pero con adición de titanio. 44
- 23 Grado de acumulación de titanio por cada 100 gramos de óxido de silicio en frústulas de *Navicula incerta* (IT) y *Nitzschia laevis* (LT). I0 y L0 representan sus respectivos tratamientos control. 45
- 24 Frústulas de *Navicula incerta*. A y B son ejemplos de especímenes en los tratamientos control. C y D son de los tratamientos con adición de titanio. Las tecas continúan unidas debido al traslape de las bandas pleurales (1). Las valvas muestran alineaciones de areolas (2) formando estrías (3). Las areolas presentan un foramen de ornamentación periódica constante y mineralizado (4) que está ausente en la abertura de la costilla longitudinal o rafe (5). 46
- 25 Frústulas de *Navicula incerta* en los tratamientos con titanio. En A se muestran areolas (1) con foramen de poros de tamaño constante y está mineralizado (2). En B se observan estrías (3) o alineaciones de areolas, en este caso en desarrollo. Las características principales de una diatomea penada rafida son la presencia de nódulos centrales (4) 47

- C), para este caso son dos, los cuales interrumpen a las costillas longitudinales abiertas y sin foramen (5 C y D).
- 26 Frústulas de *Nitzschia laevis*. En A y B se puede observar las alineaciones de las areolas (1) formando estrías (2) en la valva. En A se muestra una sola teca obtenida en los tratamientos control y que conserva sus regiones pleurales (3). C y D muestran ejemplares de los tratamientos con adición de titanio. En C ambas tecas continúan próximas. En D se muestran detalles del foramen mineralizado (4) el cual está dañado en B debido a la manipulación de la muestra. *Nitzschia laevis* presenta una costilla (5) en un extremo de la valva, con ornamentaciones (6) que se extienden de ella hacia la región pleural. El nódulo central (7) divide a la costilla. 48
- 27 Frústulas de *Nitzschia laevis* de los tratamientos con titanio. Se puede observar la costilla (1) en un extremo de la valva y con ornamentaciones que se extienden hacia la región pleural (2). B muestra detalles de las areolas (3) las cuales están en alineaciones formando estrías (4). La costilla está dividida por un nódulo central (5). En D se pueden observar la epiteca (6) e hipoteca (7) traslapadas en sus regiones pleurales (8). 49
- 28 Espectros Raman de las frústulas formadas antes (A, B) y después (C, D) de tratarlas 5 horas a 550°C con rampa de 10 grados por minuto. A y C son los tratamientos control; B y D los tratamientos con titanio; *Nitzschia laevis* [.....] y *Navicula incerta* [— — ■]. La formación de anatasa está presente solo en los tratamientos con titanio después del tratamiento térmico siendo visible entre los 100 y 200  $\text{cm}^{-1}$  (D). 50
- 29 Secciones transversales de extinción,  $C_e$ , para frústulas obtenidas en los tratamientos. *Navicula incerta* antes, A, y después, B, de la cristalización térmica de sus componentes; ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio. *Nitzschia laevis* antes, C, y después, D, de la cristalización. ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio. 51
- 30 Secciones transversales de absorción,  $C_a$ , para frústulas obtenidas en los tratamientos. *Navicula incerta* antes, A, y después, B, de la cristalización térmica de sus componentes; ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio. *Nitzschia laevis* antes, C, y después, D, de la cristalización. ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio. 52
- 31 Secciones transversales de esparcimiento,  $C_s$ , para frústulas obtenidas en los tratamientos. En A están las frústulas de las dos especies antes de cristalización y en B las mismas ya cristalizadas. *Navicula incerta* ■ Tratamiento control y ◆ Tratamiento con titanio. *Nitzschia laevis* ■ control y ◆ Tratamiento con titanio. 53
- 32 Difractogramas de rayos x de ejemplares de las frústulas con titanio de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis*. 54

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Valores promedio de los parámetros que describen la respuesta fotosintética de las células de diatomeas en los tratamientos con y sin titanio. $I_k$ es el índice de saturación lumínica; $F_{max}$ es la máxima tasa de liberación de oxígeno; $\alpha$ es la pendiente inicial de la curva que describe la liberación de oxígeno en respuesta a la irradiancia ( $a>b$ ).	45

## Capítulo I

---

### Introducción

---

Existen tres grupos de microalgas que pueden formar estructuras de silicatos: Bacillariophyceae, Chrysophyceae y Xanthophyceae, siendo las del primero, las diatomeas, las que lo presentan como componente primordial de sus paredes celulares llamadas frústulas, además poseen la mayor cantidad de ornamentaciones (Platt, 1981). Las diatomeas son microorganismos unicelulares, de 1 – 500  $\mu\text{m}$  con poros o hendiduras de 10 a 1000 nm (Kind, 2009). Dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo, las diatomeas pueden desarrollar un amplio rango de morfologías, de modo que es posible diseñar y producir arreglos específicos que tienen aplicaciones potenciales en nanotecnología debido a la exactitud de sus ornamentaciones y periodicidad a nano-escala (Parkinson y Gordon, 1999).

La nanociencia de las diatomeas ha generado dos vertientes, una en la que los investigadores tratan de aislar e imitar los componentes del mecanismo por el cual estos organismos forman sus frústulas (Sanchez et al., 2005; Brutchey y Morse, 2008; Kind, 2009) y otra que busca la aplicación directa de las estructuras ya formadas y su interacción con materiales inorgánicos y bioactivos.

Respecto a la segunda vertiente, la biología de las diatomeas hace posible la producción y almacenamiento de grandes cantidades de materia prima a bajos costos económicos. Utilizando las frústulas de las diatomeas han sido desarrollados soportes para pruebas moleculares, elementos transductores para sensores ópticos y micro-cápsulas para liberación de medicamentos (De Stefano et al., 2008). Así como, un amplio rango de agentes de filtración, por ejemplo la tierra de diatomeas o los filtros moleculares para cromatografía en gel, agentes abrasivos, desodorantes, agentes decolorantes, inmuno-aisladores, insecticidas,

fabricación de nano-estructuras o como nano-templados, chips para dispositivos electrónicos (Parkinson y Gordon, 1999), sensores ópticos de  $\text{NO}_x$  u otros gases (Bao et al., 2007), entre las múltiples aplicaciones como la imaginación y la ciencia lo permiten.

En cuanto al diseño de catalizadores la mayoría de los trabajos han sido dirigidos al estudio de la variación de la composición química de las frústulas de diatomeas, con poco énfasis en la ecofisiología, sistemas y condiciones de cultivo. Teniendo en cuenta el potencial de las diatomeas como fotocatalizadores, hasta donde se conoce no hay estudios que exploren la interacción de la luz con este tipo de partículas. Por ello puede pensarse que las frústulas de las Bacillariophyceae, con sus múltiples geometrías, alta tasa de crecimiento y adaptabilidad metabólica e índices refractivos modificables de acuerdo a las condiciones de cultivo, es un grupo prometedor para la producción de partículas con diversa aplicación en optoelectrónica, disciplina en la cual se estudian los efectos de la mecánica cuántica de la luz sobre materiales semiconductores.

A pesar de que es poco conocido el metabolismo de los metales en las diatomeas en esta tesis se estudió la formación de estructuras de silicatos-titanio, el tiempo de incorporación y la capacidad de retención de titanio en las frústulas de las diatomeas cultivadas en medios enriquecidos. Se evaluó su fisiología con énfasis en el crecimiento poblacional, producción de biomasa y respuesta fotosintética y fueron medidas algunas propiedades ópticas de las partículas cuando los semimetales estaban en su forma amorfa y después de su cristalización térmica a  $\text{SiO}_2$  y  $\text{TiO}_2$ .

## Capítulo II

---

### Antecedentes

---

#### II.1. Biología de las Bacillariophyceae.

Las diatomeas o Bacillariophyceae son una familia de organismos unicelulares o coloniales, que pueden ser planctónicos es decir, que viven flotando en la columna de agua, bentónicos cuando están adheridos al sustrato en el que crecen o epífitos cuando se encuentran sobre otros organismos. La mayoría son de simetría bilateral, radiales o penadas, con el aparato de Golgi perinuclear y pirenoides en distintas posiciones, generalmente anclados en las membranas tilacoidales. Poseen fucoxantina como pigmento accesorio característico. Reproducción principal por fisión binaria en la que cada frústula superior, epiteca, da lugar a una frústula inferior denominada hipoteca. También tienen reproducción sexual anisogama o isogama. Auxoesporas no simétricas y de expansión polar, las espermatias retienen los cloroplastos. Principalmente fotoautótrofos (ALGAE BASE, 2010).

Las diatomeas intervienen en gran medida en el ciclaje global de sílice y carbono en la biosfera ya que se estima contribuyen al 40% de la producción primaria total (Sahai, 2003). A nivel global, la captación de sílice por diatomeas es  $280 \times 10^{12}$  moles de Si por año (Nelson et al., 1995).

##### II.1.1. Biomineralización.

Cada proceso biológico de mineralización o acumulación elemental implica su propia bioquímica. La calcificación, la silicificación y la precipitación de óxidos metálicos de transición tienen muchos aspectos en común: 1) membranas semipermeables aislantes, 2) cationes divalentes son generalmente bombeados (directa o indirectamente) hacia el interior del medio mineralizante a expensas de adenosín trifosfato (ATP) e intercambio electroneutral de cationes, 3) el transporte

pasivo y electroneutral de aniones y en última instancia dirigido por gradientes de pH creados durante el transporte de cationes (McConnaughey, 1989).

Los aminoácidos, de forma libre o presentes en proteínas, más dados a formar complejos con iones metálicos son histidina, cisteína y ácido glutámico, se cree que en las hidrofobinas, sus grupos  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$  y  $-\text{NH}_2$  son afines a la formación del complejo titanio (IV)-hidroxo (Santhiya et al., 2010).

Las diatomeas tienden a incorporar los metales en forma de óxidos e hidróxidos. Es sabido que las diatomeas bio-acumulan niveles traza de titanio (Riley y Roth, 1971). El límite de solubilidad del  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  en 100 mM de NaCl a 22 °C está en el intervalo de 3 a 8  $\mu\text{M}$ , siendo ésta la especie dominante a  $\text{pH}>6$  (Baes y Mesmer, 1976; Sugimoto et al., 2002).

### **II.1.2. Metabolismo de silicio.**

No es bien comprendida la forma química en la que el sílice es empleado por los organismos, se cree que en algunos la absorción y transporte es mediante la formación de complejos ácidos sílice-polialcoholes y sílice-azúcar, sin embargo estudios en diatomeas no mostraron evidencia positiva. El paso del ácido sílico a través de la membrana celular de diversas diatomeas se da en pH cercano a 8.5. La concentración de sílice intracelular en las diatomeas es 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que el posible por la solubilidad del sílice (Sahai, 2003). Para que el proceso de biosilificación tenga lugar en las diatomeas, estas tienen que extraer partes por millón de ácido sílico  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$  del agua y concentrarlo para crear reservorios de 0.3-0.5 M de sílice soluble (Lain, 2005).

El modelo general de incorporación de sílice aceptado según Martin-Jezequel et al. (2002), es que la célula primero tiene que tomar el sílice inorgánico extracelular en forma de ácido sílico. Diferentes tipos de genes transportadores de ácido sílico han sido identificados y codifican para diferentes tipos de transportadores,

probablemente variando el carácter de unión y localización dentro de la célula (Sahai 2003). Una vez incorporado el sílice se inicia intracelularmente el transporte hacia los reservorios donde será mantenido hasta que se requiera su polimerización, seguido del transporte hacia la vesícula de deposición y finalmente la precipitación.

La familia de transportadores de  $\text{Si(OH)}_4$  ocasionan transporte activo por un co-transportador de  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, esta forma de sílice representa solo una pequeña fracción citosólica y los canales de  $\text{Si(OH)}_4$  pueden ser los facilitadores a través de las membranas intracelulares. Los transportadores son mediados por Na en las especies marinas y por Na y K en las de agua dulce. La permeabilidad intrínseca de las bicapas lipídicas al  $\text{Si(OH)}_4$  es probablemente baja. Han sido propuestas las acuaporinas para facilitar el paso de  $\text{Si(OH)}_4$  (Raven y Waite, 2004). También ha sido propuesto que las diatomeas usan el sílice como amortiguador de pH para la conversión enzimática de  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$  (Milligan y Morel, 2002).

La precipitación mesoporica de  $\text{SiO}_2$  se da mediante polimerización de unidades simples de ácido sílico ya que las enzimas silafinas y las cadenas poliaminicas de las diatomeas polimerizan el ácido sílico a pH de neutros a ácidos. El pH de la vesícula de deposición de sílice es de 5-6 (Sahai 2003). Debido a que la formación de ornamentaciones es un proceso altamente controlado, el sílice es mantenido en complejos orgánicos en las vesículas de deposición hasta que sea precipitado. Esto retrasa el tiempo de deposición porque el complejo orgánico debe ser primero hidrolizado antes de la polimerización, dando el tiempo necesario para la formación de estructuras mesoporicas. Mientras que puedan existir complejos intracelulares de sílice tetra-coordinados en las diatomeas, cálculos de energía de reacción hacen pensar que el organismo no tiene ventaja termodinámica en tomar complejos extracelulares órgano-silicatos o exudar ligandos orgánicos extracelulares, en vez de tomar ácido sílico directamente del medio (Sahai, 2003).

Según Kröger et al. (2002), las silafinas son péptidos modificados implicados en la biogénesis del sílice en diatomeas y tienen modificaciones post-transduccionales en sus poliaminas y en su gran porcentaje de hidroxil-aminoácidos. Cada residuo de serina es fosforilado, lo cual es esencial para su actividad biológica. Esta proteína nativa tiene estructura de ion dipolar y permite la formación de ensamblados supramoleculares, por ejemplo la natSil-1A (grupos poliaminas y fosfatos) causan un proceso de autoensamblado vía interacciones electrostáticas. Estos ensamblados son pre-requisito como templado para la polimerización de ácido sílico para la formación de biosílice. Tiene fase plástica silafina-sílice, la cual puede representar el material de construcción. La trimetil-hidroxil-lisina fosforilada es común en muchas especies de diatomeas. Los numerosos grupos fosfatos sirven como fuente intrínseca de aniones requeridos para la formación de sílice por las diatomeas. Combinaciones de diferentes tipos de silafinas resultan en un proceso morfológico mayormente controlado, unas dirigen la formación de estructuras continuas y en combinación con otras forman bloques porosos.

Si bien, la luz es la fuerza que rige a la fotosíntesis, la cantidad, composición espectral y fluctuaciones de ella controlan la producción de biomasa del fitoplancton (Dubinzy et al., 1994). La energía celular para la silicificación y transporte proviene de la respiración aeróbica sin energía directamente proveniente de la fotosíntesis (Raven y Waite, 2004). Esta es la diferencia con el metabolismo de cualquier otro nutriente.

Sánchez-Saavedra y Voltolina (1994) al cultivar a *Chaetoceros* sp., diatomea planctónica, determinaron que las células lograban mayor tamaño y se fotoinhibían a  $565 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en los cultivos con luz azul y en los de luz blanca la densidad poblacional era mayor pero el tamaño celular menor y se fotoinhibían a  $565 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Sin embargo la composición espectral no es significativa en las especies bentónicas estudiadas por Correa-Reyes et al. (2001) al cultivarlas con luz blanca y luz azul a  $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , alta irradiancia para un ambiente bentónico. Lograron

mayor biomasa en ambos tratamientos que la obtenida en reportes previos y como la irradiancia proporcionada no fue limitante hipotetizan que puede ser aumentada para conseguir mayor biomasa. Sin embargo, un factor determinante en la producción de biomasa fue el tamaño de las células y el fenómeno de autosombreado, lo que resulta del efecto de la absorción y esparcimiento de la luz dentro del sistema de cultivo. La concentración de sílice y nutrientes disponible en el medio de cultivo en experimentos fue la misma.

La señal para entrar a  $G_0$ , o etapa de latencia en el ciclo celular, observada para *Chaetoceros pseudocurvisetus* es la depleción de nitrógeno disponible y requiere de gran disponibilidad de ácido sílico, al grado que una espora formada en la fase  $G_0$  tiene 8 veces más sílice que una célula vegetativa, las reservas de ácido grasos y carbono aumentan 4 y 5 respectivamente en las formas de resistencia (Kuwata et al. 1993). Un decremento de fósforo o nitrógeno durante la fase  $G_2$  del ciclo celular, incrementa la silicificación. Las células carentes de sílice dejan el estado latente más rápido que las carentes de nitrógeno (Raven y Waite, 2004).

## **II.2. Utilización de micro y nanoestructuras de silicio y titanio.**

*Optoelectrónica.* Algunas de las aplicaciones más prominentes de los materiales mesoestructurados de silicio y titanio debido a sus características según Vogel et al. (2003) son catálisis, electrónica, optoelectrónica, dispositivos fotovoltaicos, sensores químicos, sensores biológicos y materiales funcionales en general. En una revisión literaria hecha por los mismos autores señalan que películas del óxido de titanio mesoestructurado tiene amplio potencial de aplicación debido a su gran área superficial y morfologías controladas a nanoescala. Además señalan que poseen a altos índices refractivos (1.5 a 1.6) en comparación con los óxidos mesoestructurados a base de silicio (1.43). Debido a que el dióxido de titanio es un semiconductor de amplia banda prohibida (3.2 eV), proponen doparlos con componentes activos como tintas para propiciar la absorción o la no linealidad óptica ya que, por ejemplo, los compositos sílica/titania actúan como huéspedes

para la tinta laser amplificando las emisiones espontáneas, un proceso en el que los fotones de emisión espontánea son amplificados por emisiones estimuladas a medida que viajan en un medio de ganancia. Entre las ventajas que puntualizan para el dióxido de titanio como medio de ganancia óptica, en contraste con aquellos de silicio están las siguientes: el poseer un mayor índice refractivo de 1.5, lo que evitaría el uso de capas de revestimiento de bajo índice para fabricar guías de onda en vidrio y abren la posibilidad de usar microestructuras cerradas para utilizar la reflexión interna total como un mecanismo de retroalimentación en cavidad para un microláser.

*Celdas solares y fotocatalisis solar.* En las celdas solares basadas en materiales nanocristalinos y polímeros conductores, es importante incrementar la trayectoria óptica promedio de la luz en partículas semiconductoras de modo que sea mayor que el grosor óptico del sustrato si la luz es esparcida en la capa foto-activa o si es reflejada en la parte posterior de esta (Rothenberger et al., 1999). Mihi et al. (2007), probaron que con una capa delgada de nanocristales de titanio acoplados a un ópalo inverso incrementa la eficiencia de colecta de luz para convertirla en corriente eléctrica debido al efecto de espejo del cristal fotónico en las frecuencias de la zona de agotamiento o banda prohibida.

Por otra parte, antecedentes de la modificación de las características de las frústulas de diatomeas con la incorporación de metales abren paso al diseño de materiales para estos fines, además han brindado grandes avances en el desarrollo de catalizadores pues la incorporación del titanio propicia el esparcimiento de la luz y el fenómeno fotoeléctrico, entre otras características interesantes de gran utilidad en procesos de depuración y purificación de aguas residuales y en celdas solares. Sandhage et al. (2002), estudiaron la sustitución del sílice por otros metales, magnesio y titanio, mediante reacción por fase de vapor a 900 °C para modificar el índice refractivo. Umemura et al. (2010), incorporaron titanio a las frústulas de *Coscinodiscus wailesii* para fabricar

fotocatalizadores mediante deposición en fase líquida a temperatura ambiente después de recuperada la biomasa. El tiempo crítico para propiciar la precipitación del titanio sobre las frústulas sin que cambiara la morfología fue de 12 h y con ello conseguían la mejor actividad fotocatalítica. Sin embargo, el metal no cubrió totalmente la superficie.

Estos trabajos enfocan su interés en procesos meramente químicos post obtención de las partículas, es decir, el uso de las frústulas como templados de silicatos amorfos. Excepto el trabajo de Jeffryes et al. (2008), en el cual cultivaron de forma suspendida a *Pinularia* sp., una diatomea bentónica, incluyendo titanio como un nutriente del medio de cultivo y lograron incorporar el metal a la frústula.

Se ha hecho muy poco énfasis en el uso de las características fisiológicas de producción de biomasa de las diatomeas para obtención de partículas para el diseño de materiales optoelectrónicos, que son dispositivos de transducción de energía eléctrica a óptica o viceversa para los diversos usos mencionados en este apartado.

### **II.3. Propagación de luz en medios inhomogéneos y secciones transversales de las partículas en ellos.**

El campo electromagnético que resulta de la interacción de la luz con un medio inhomogéneo puede descomponerse en una parte promedio y una parte fluctuante  $E = [E] + \delta E$ . El primer término se conoce como la componente coherente o directa y el segundo como la componente incoherente o difusa.

La solución rigurosa del transporte de energía se logra resolviendo la ecuación de transporte radiativo (ETR), cuya solución requiere mucho tiempo de cómputo para su solución, por lo cual son útiles aproximaciones como en las simulaciones Monte Carlo, donde la luz es tratada como flujo de fotones, las cuales se propagan en un plano de tres dimensiones. La técnica no es rigurosa y permite hacer aproximaciones flexibles para el tratamiento de los problemas del transporte de luz

en medios inhomogéneos y es ampliamente utilizada para simular el transporte de la luz en tejidos biológicos (Terán et al., 2010). El programa del método Monte Carlo requiere de características de las partículas para hacer las simulaciones, como las secciones transversales de absorción, extinción y esparcimiento. Una sección transversal expresa el área que percibe la luz al interactuar con una partícula y la forma en que lo hace, es decir se extingue, se absorbe o se esparce. Estas pueden ser medidas con arreglos ópticos en donde las partículas son colocadas en el trayecto que recorre la luz desde una fuente de iluminación hasta el detector o colector de luz. De forma que las secciones transversales se miden con base a potencias detectadas.

Para medir la sección transversal de extinción,  $C_e$ , se utiliza la expresión (1),

$$Pm = P_0 \exp(-\rho C_e) \quad (1)$$

Donde  $Pm$  es la potencia detectada,  $P_0$  la potencia inicial y  $\rho$  la densidad de partículas en suspensión. De forma similar, para la sección transversal de absorción,  $C_a$ , se utiliza la expresión (2),

$$Pm = P_0 \exp(-\rho C_a) \quad (2)$$

La diferencia radica en el tipo de arreglo utilizado y la potencia medida, para la primera expresión se detecta la luz que llega sin interactuar con las partículas, es decir la componente coherente [E]. Para la segunda se infiere de la componente que interactúa y que es esparcida y colectada, es decir, la componente difusa  $\delta E$ . La sección transversal de esparcimiento,  $C_s$ , se puede despejar de la ecuación (3),

$$C_e = C_a + C_s \quad (3)$$

## Capítulo III

---

### Justificación

---

Debido a que las diatomeas forman estructuras de silicatos que en los últimos 10 años han sido inspiración para el diseño e incluso el desarrollo de micro-nano estructuras para diversas aplicaciones en optoelectrónica, ciencias ambientales y de la salud; y a que son escasos los trabajos enfocados en la fisiología celular durante su formación, esta investigación describe la respuesta fisiológica de dos especies de diatomeas bentónicas, comunes en Baja California, al ser expuestas a hidróxido de titanio durante su cultivo y evalúa algunas características físico-químicas y ópticas de la pared celular formada. Con lo cual se contribuye al conocimiento de la biología de metales en las diatomeas y se estudia su potencial uso para algunas aplicaciones tecnológicas.

## Capítulo IV

---

### Hipótesis

---

Mediante cultivos con hidróxido de titanio se obtendrán frústulas de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* con distinta composición química y propiedades ópticas, y sin deformaciones morfológicas las cuales pueden tener distintas aplicaciones en optoelectrónica.

## Capítulo V

---

### Objetivos

---

#### V.1. Objetivo general.

Evaluar la capacidad de incorporación de titanio en las frústulas de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* así como, algunas de sus propiedades morfológicas, ópticas y químicas de interés en optoelectrónica.

#### V.2. Objetivos específicos.

Evaluar la tolerancia de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* al hidróxido de titanio.

Evaluar la capacidad de utilización de silicatos y titanio de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta*.

Obtener la relación de titanio incorporado respecto a la composición de óxido de silicio de la frústula de la especie tolerante.

Caracterizar la morfología de las frústulas resultantes de los tratamientos.

Medir las secciones transversales de absorción, extinción y esparcimiento de las frústulas con y sin titanio así como, antes y después de inducir la cristalización de sus componentes mediante tratamiento térmico.

---

## Capítulo VI

---

### Materiales y métodos

---

Para abordar los objetivos específicos fue necesario diseñar distintos ensayos, realizar los análisis biológicos, físicos y químicos. Todos los materiales y métodos pueden ser mencionados en tres grupos: 1) tolerancia a las condiciones experimentales, 2) biomineralización e 3) interacciones de la luz con las frústulas.

A continuación son descritas las características de las especies biológicas en estudio y posteriormente los tres grupos de materiales y métodos mencionados en el párrafo anterior.

#### VI.1. Características de las diatomeas.

Las diatomeas bentónicas, es decir que viven adheridas en la interface suelo-agua, fueron obtenidas de la colección particular del Laboratorio de Biología y Cultivo de Microalgas del Departamento de Acuicultura del CICESE, las cuales fueron aisladas durante el 2001 de biopelículas de regiones pesqueras procedentes del Ejido Eréndira, Baja California, México. La especie *Nitzschia laevis* (B) mide 7.5 x 6  $\mu\text{m}$  y *Navicula incerta* (E) 14.5 x 5  $\mu\text{m}$ , Correa-Reyes et al. (2001).

##### VI.1.1. Respaldos celulares e inóculos.

Los respaldos celulares de las diatomeas fueron mantenidos en cultivos semanales en matraces Erlenmeyer de 200 mL con 100 mL de medio de cultivo F de Guillard y Ryther (1962). Para el medio de cultivo se utilizó agua de mar filtrada obtenida del sistema de agua marina que abastece al CICESE, previamente esterilizados durante 15 minutos a 1.5 Kg m<sup>-2</sup> y 121°C (Sterilizer SE300 Yamato). El medio F es una dilución acuosa de sales y entre sus componentes contiene los macronutrientes, vitaminas y metales traza esenciales para el metabolismo algal.

Los cultivos se mantuvieron monoespecíficos, no axénicos y como inóculo se utilizó 5 mL de un cultivo anterior y se realizó una resiembra periódica semanal.

Los inóculos para todos los experimentos realizados en esta tesis fueron mantenidos en condiciones constantes de temperatura a 20 °C e irradiancia de luz blanca continua de 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (General Electric F40D.EX, 4  $\pi$  Biospherical Instruments<sup>®</sup>, QSL-100) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento.

## **VI.2. Tolerancia a las condiciones experimentales.**

Para evaluar la tolerancia de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* fue primeramente necesario sintetizar la especie química de titanio más compatible según se mencionó en los antecedentes. Para obtener el hidróxido de titanio utilizado fueron empleados dos protocolos de síntesis: Jeffryes et al. (2008) y Kotscokechiaga et al. (2008). De cada protocolo se obtuvo un precipitado que fue caracterizado por espectroscopía de infrarrojo (Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer), espectroscopía UV-Vis (AvaLight-DH-S-BAL Balanced Deuterium-Halogen Light Source, AvaSpec-2048 Standard Fiber Optic Spectrometer) y difracción de rayos X (Philips X'Pert PW3020) en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, CNyN-UNAM.

En el protocolo Jeffryes et al. (2008), el hidróxido de titanio es obtenido por una reacción de precipitación ácido-base fuertes a partir de titanio (IV) oxisulfato en solución de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio 4.0 M. En el protocolo de Kotscokechiaga et al. (2008), el hidróxido de titanio resulta de la reacción de hidroxilación del tetracloruro de titanio mediante etanol anhidro y alcohol bencílico.

Con ambos productos se obtuvieron soluciones madre, cuya concentración en titanio fue corroborada por espectroscopía de emisión atómica inductivamente acoplada con plasma, ICP-AES por sus siglas en inglés "Inductively Coupled with Plasma Atomic Emission Spectroscopy", (ICP-AES Varian Liberty) en el Laboratorio de Hidrogeoquímica del Departamento de Ciencias de la Tierra del CICESE.

El protocolo de Kotsokechagia et al. (2008) fue modificado para conseguir la obtención directa de titanoles, sin necesidad de disolver un precipitado: primero se obtuvo una solución primaria al hidroxilar 1 mL de  $\text{TiCl}_4$  en 5 mL de  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ; después, se tomó 1 mL y se aforó en 30 mL de agua desionizada. Esta última solución fue caracterizada por ICP y fue la que se utilizó en todos los ensayos en que se menciona el protocolo de Kotsokechagia et al. (2008).

Para evaluar la tolerancia de las especies de diatomeas a las soluciones madre que serían añadidas al cultivo como fuente de titanio, se realizaron varios ensayos previos. Esencialmente monocultivos en lote, por triplicado, usando como base de nutrientes el medio F, los cultivos contenían  $211 \mu\text{M Si}$ , con salinidad de  $35 \text{ ‰}$  e irradiados con  $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en las siguientes condiciones:

- A) Crecimiento en etanol anhidro al 0, 2, 4, 6, 8 y 10 %. Con muestreo al 0 y noveno día. Ensayo que tuvo que ser repetido. La densidad celular inicial fue de  $2\,276\,250 \text{ cél mL}^{-1}$  para *Nitzschia laevis* y de  $1\,273\,750 \text{ cél mL}^{-1}$  para *Navicula incerta*. En la segunda ocasión, al 0, 0.3, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 % de etanol anhidro. La densidad celular inicial fue de  $1\,975\,000 \text{ cél mL}^{-1}$  para *Nitzschia laevis* y de  $1\,337\,500 \text{ cél mL}^{-1}$  para *Navicula incerta*.
- B) Diluciones de la solución madre de Jeffryes et al. (2008) y Kotsokechagia et al. (2008), las cuales fueron esterilizadas 15 minutos a  $1.5 \text{ Kg m}^{-2}$  y  $121^\circ\text{C}$ . En concentraciones 0, 0.8, 2.3, 4 y  $6.4 \mu\text{M}$  de Ti y para el primero y 0, 0.00257, 0.00772, 0.01286,  $0.02058 \mu\text{M}$  de Ti para el segundo.
- C) Diluciones de la solución madre de Kotsokechagia et al. (2008) para obtener fueron 0, 8.1, 16.2 y  $39.6 \mu\text{M}$  de Ti. El inóculo inicial de *Navicula incerta* fue de  $58\,000 \text{ cél mL}^{-1}$  y de  $9.6000 \text{ cél mL}^{-1}$  para *Nitzschia laevis*.

El pH inicial fue medido en todos los casos con un potenciómetro HANNA Checker 3 y fue de  $\sim 8$ .

### VI.2.1. Variables poblacionales.

Para la estimación del crecimiento poblacional se colectaron muestras de 1 mL de cada situación experimental y fueron fijadas con 1 gota de lugol. Durante el experimento las muestras fueron colectadas siempre en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. Para los conteos de células se utilizó el método descrito por Paniagua et al. (1989), con una cámara Neubauer 0.1 mm de profundidad con dos subcuadrículas para conteo. Previo al conteo al microscopio (Olympus CX-31), una a una, las muestras fueron disgregadas con ultrasonido durante 3 minutos (L&R® Solid State/Ultrasonic T9-B).

Como indicador de crecimiento fue calculada la Tasa de Crecimiento Específica ( $\mu$ ) utilizando la ecuación (4) descrita por Fogg y Thake (1987):

$$\mu = \frac{\text{Log}_2(N_2) - \text{Log}_2(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

Donde:

$\mu$  = Tasa de crecimiento específico

$N_2$  = Número de células en el tiempo  $t_2$

$N_1$  = Número de células al tiempo  $t_1$

### VI.2.2. Fotosíntesis.

Durante el último muestreo del ensayo de tolerancia a las soluciones madre de titanio a partir de dos protocolos distintos [ensayo B) de la sección VI.2], fueron tomadas alícuotas de cultivo de diatomeas para evaluar su contenido de pigmentos y su capacidad de fotosíntesis. Para analizar el contenido de clorofila a y carotenos totales fueron colectados 10 mL de cada condición experimental y se les concentró en filtros de fibra de vidrio de 4.7 mm de diámetro con 1  $\mu$  de abertura de poro (Osmics GF/C) y siguiendo la metodología descrita por Parsons et al. (1984).

La capacidad fotosintética fue medida en picogramos de oxígeno por célula por hora, utilizando para ello muestras de 7.5 mL de cultivo puestas en oscuridad durante 5 min para que estuvieran ávidas de luz. Para la determinación de la evolución del oxígeno se utilizó una lámpara de halógeno (Xenophot HLX, Osram, Munich, Germany) como fuente de iluminación para la fotosíntesis y 6 filtros de malla plástica para obtener un gradiente de luz desde los 0 a los  $5066.4 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La cantidad de oxígeno producido fue determinada con un electrodo de oxígeno (YSI 5331, Yellow Spring Instruments Co., OH, USA).

Para construir las curvas fotosintéticas fue relacionada la cantidad de oxígeno producidas en un intervalo de tiempo, en función de la cantidad de células expuestas a la fuente de iluminación. Los parámetros que describen la curva:  $P_{\text{max}}$  o fotosíntesis máxima,  $\alpha$  o eficiencia fotosintética e  $I_k$  o índice de saturación lumínica, fueron determinados según los criterios de Platt (1981) y Figueroa et al. (1997).

### **VI.3. Biomineralización.**

El estudio de la biomineralización estuvo basado en la cuantificación de la utilización atómica de sílice y titanio para expresarlo como gramos de titanio por cada 100 gramos de óxido de silicio de peso inorgánico de la célula. En otras palabras, expresar la relación titanio-sílice en la frústula formada despreciando el contenido intracelular de las diatomeas. Éstas fueron mantenidas en mono-cultivos por lote en medio F, con  $211 \mu\text{M}$  Si y  $40 \mu\text{M}$  de Ti. Se consideró que en este sistema de cultivo los silicatos y el titanio podían estar en 3 fracciones: medio de cultivo, contenido intracelular y frústula. Fue de especial interés evaluar las cantidades en el medio de cultivo y en la frústula. La diferencia entre estos valores se atribuyó al contenido intracelular que aún no es incorporado a la frústula en el tiempo de muestreo y por ello poco relevante para los objetivos de este trabajo.

El crecimiento celular y fotosíntesis de los ensayos de este apartado fueron evaluados con las metodologías de los incisos VI.2.1 y VI.2.2. La concentración de titanio inicial fue la máxima tolerable por las células según los ensayos de tolerancia [VI.2 inciso C)]. Las condiciones de esterilización, temperatura, salinidad e irradiancia lumínica para los tratamientos fueron las mismas que las descritas en el inciso VI.2. La producción de biomasa celular en el sistema de cultivo fue evaluada como peso seco con alícuotas de 30 mL de cultivo filtradas utilizando filtros de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro de la marca PALL(A/E)® con 1 µm de abertura de poro y se les hizo pasar formiato de amonio 5M para eliminar las sales. Fue utilizada la metodología de pesos secos constantes descrita por Sorokin (1973). Con ella fueron estimados el peso seco total o peso de la biomasa y después las fracciones de ella: peso inorgánico y peso seco orgánico. Se utilizó una balanza electrónica Metter Toledo XS105 Dual Range®, una mufla Thermolyne 1400® y una estufa VWR Brand®.

El primer ensayo de biomineralización [ensayo D)] consistió en añadir titanio en el medio, el cual provenía de la solución madre del protocolo (K) y se monitoreo su evolución en el medio de cultivo. También fue evaluada la evolución de la concentración de silicio. Fue necesario plantear un segundo experimento para medir estos parámetros pero durante las primeras horas de cultivo [ensayo E)]. Para estos dos ensayos la solución (K),  $Ti(OH)_4$  a partir de  $TiCl_4$  y etanol, fue esterilizada como todos los componentes del medio de cultivo (Sección VI.1.1).

En el primer ensayo de biomineralización fueron tomadas muestras de 25 mL de cultivo a los 0, 2, 4, 6 y 8 días, las cuales fueron pasadas por filtros de fibra de vidrio (Pall A/E)® con 1 µm de abertura de poro para evitar el paso de las células y su interferencia con el monitoreo de la concentración de sílice y titanio en medio líquido. Estos elementos fueron analizados por ICP-AES. También se analizó la capacidad fotosintética de las células de diatomeas mantenidas en los ensayos utilizando las metodologías del inciso VI.2.2.

Se realizó un tercer ensayo [ensayo F)], similar al primero[ensayo D)], pero utilizando la solución madre (K), de  $\text{Ti(OH)}_4$  a partir de  $\text{TiCl}_4$  y etanol, sin esterilizar. Los muestreos para el monitoreo del crecimiento poblacional celular y la evolución del silicio y el titanio en el medio se realizaron a las 0, 6, 12, 24 horas y a los 2, 4, 6, 8 y 10 días de cultivo.

En el último día del primer y tercer ensayo de biomineralización la biomasa total de cada especie fue recuperada por centrifugación a 4 °C y 4000 rpm en ciclos de 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5810R. Para obtener las frústulas libres de cualquier otro componente celular se utilizó el método descrito por Jeffryes et al. (2008). En éste método la fracción orgánica es digerida utilizando dodecilsulfato sódico, SDS, y ácido etilendiaminotetracético, EDTA. Después de realizar los ciclos de lavado propuestos, las muestras fueron secadas a 50 °C. De ellas se tomó una submuestra para hacer una digestión con ácido fluorhídrico concentrado de alta pureza. La determinación de la cantidad de titanio y sílice en las frústulas de cada especie de diatomeas se realizó mediante análisis por ICP-AES y fue expresado como g Ti / 100g Si. Mediante microscopía Raman se comprobó que solo en los tratamientos con titanio se presentara la inducción térmica del  $\text{Ti(OH)}_4$  a  $\text{TiO}_2$ . Estos análisis fueron realizados en un horno tubular durante 5 horas a 500 °C con rampa de 10 °C cada minuto (Lindberg/Blue M\*-Thermo Scientific) y con un microscopio Raman (Xplora de Horiba scientific) con tres laser 532 nm, 638 nm 785 nm, en el CNyN-UNAM.

#### **VI.4. Morfología y propiedades ópticas.**

Mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión, TEM, por sus siglas en inglés (Transmission Electronic Microscopy), fueron evaluados cualitativamente posibles cambios morfológicos de las paredes celulares después de estar en las condiciones de cultivo del último ensayo de biomineralización [ensayo F)]. Previo a la observación TEM, las muestras fueron mantenidas con tratamiento térmico para inducir la cristalización de los titanoles. Los montajes de

las muestras se hicieron en rejillas de cobre de 300 divisiones (Lacey Fomvar/Carbón). Se hizo un barrido para ver posibles deformaciones en las frústulas en el Microscopio Electrónico de Transmisión en del CNyN de la UNAM.

Antes y después del tratamiento térmico (sección VI.3) se realizaron suspensiones de las partículas en agua destilada, a las cuales se les midió la propiedad de absorción y de extinción de luz visible para evaluar las secciones transversal de esparcimiento, extinción y absorción de estas partículas (ver sección II.3). Estas mediciones fueron realizadas en el Laboratorio de Óptica estadística del Departamento de Óptica de la División de Física Aplicada del CICESE y utilizando el método descrito por Terán et al. (2010) en donde las secciones transversales de absorción,  $C_{(a)}$ , y extinción,  $C_{(e)}$ , están dadas por la ecuación (5),

$$C = (1/\rho d)(\ln T_e) \quad (5)$$

donde,  $\rho$  es la densidad de partículas,  $d$  es la distancia de la celda, en este caso 1 cm, y  $T_e =$  potencia detectada / potencia de referencia. La potencia de referencia es la detectada en agua destilada sin partículas.

#### **VI.5. Tratamiento estadístico de los resultados.**

Cuando fue necesaria la comprobación estadística de los resultados, las pruebas fueron elegidas considerando las hipótesis estadísticas que las fundamentan y que corresponden a: linealidad, homogeneidad de varianzas, normalidad e independencia (Sokal y Rohlf, 1979). Los datos que resultaron paramétricos fueron procesados con análisis de covarianza de una, dos o tres vías (ANCOVA), de lo contrario fueron empleadas pruebas de varianza en rangos. También se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis, Holms-Sidak, pruebas t y regresiones lineales, utilizando los programas Statistica versión 6.0 t Sigma Stat 3.0, considerando en ambos un valor de  $\alpha = 0.005$ .

## Capítulo VII

---

### Resultados

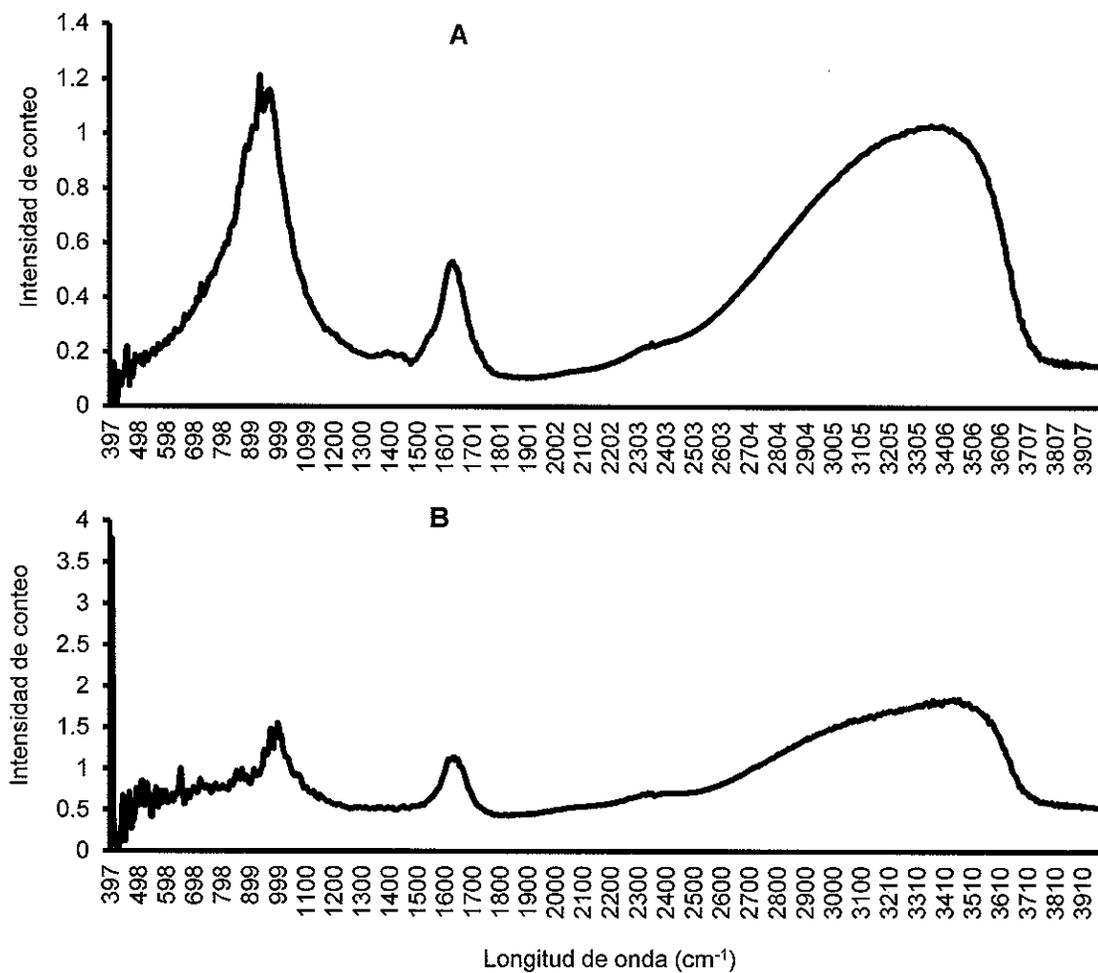
---

#### VII.1. Tolerancia.

En esta sección se presentan los resultados de los experimentos de la sección VI.3, en la cual fueron planteados los procedimientos para la estandarización de las condiciones en las que se realizaron los cultivos de las diatomeas.

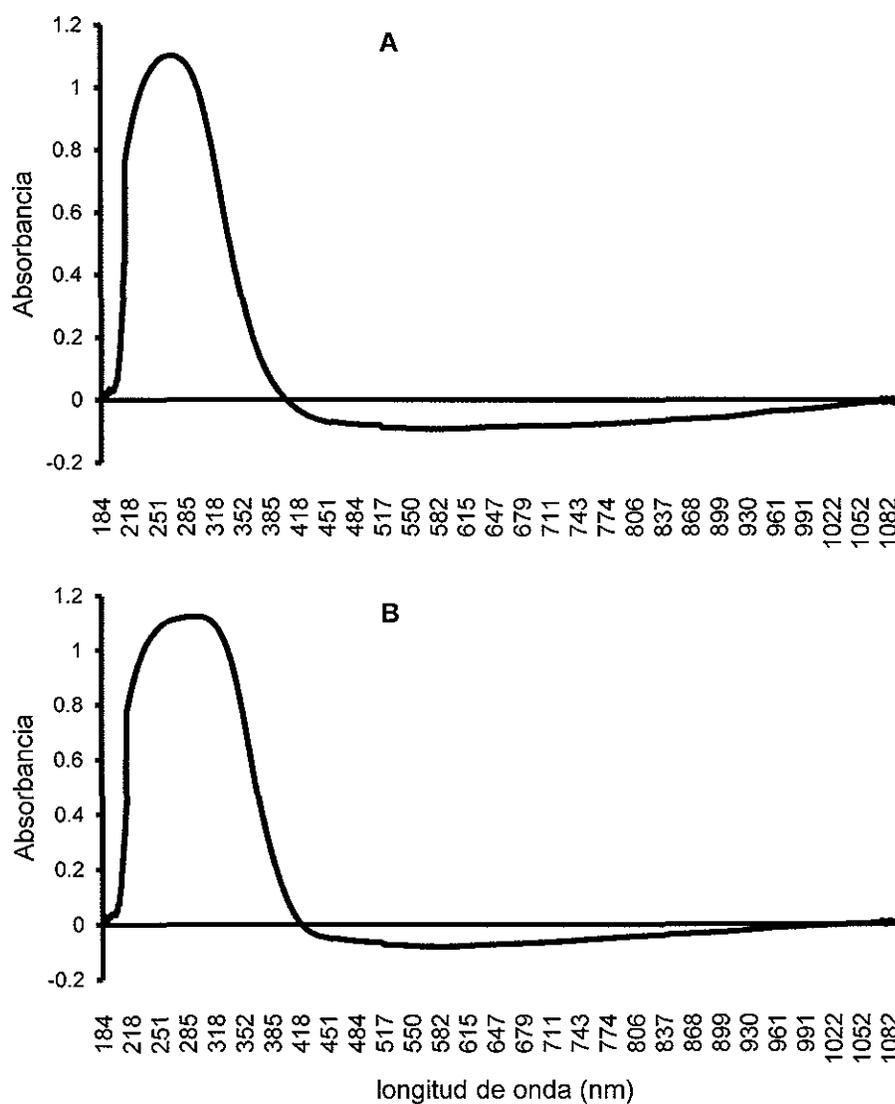
##### VII.1.1. Caracterización de precursores de hidróxidos de titanio.

Los espectros de absorbancia de infrarrojo en la región de 3000 a 3700  $\text{cm}^{-1}$  mostrados en la figura 1A y 1B son atribuibles a la presencia de grupos  $-\text{OH}$  en los precipitados obtenidos con los dos métodos de obtención de precursores para las primeras soluciones madre de titanio, las cuales fueron utilizadas en los experimentos de la sección VII.1.4. Así mismo, puede observarse en la región cercana a 1600  $\text{cm}^{-1}$  las tendencias de absorción atribuibles a la presencia de grupos  $\text{Ti-OH}$ .



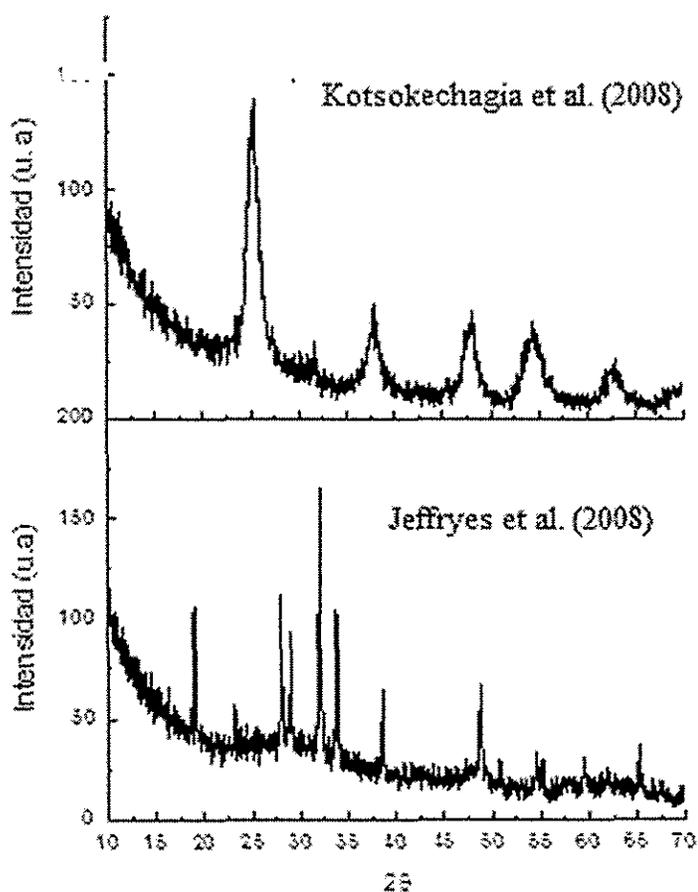
**Figura 1.** Espectro de absorción en infrarrojo de los precursores de las primeras soluciones madre de titanio. A: espectro del precipitado sintetizado por el protocolo de Kotsokhechia et al. (2008), obtenido mediante  $\text{TiCl}_4$  y etanol-benzil alcohol. B: espectro del precipitado según Jeffryes et al. (2008) a partir de titanio (IV) oxisulfato e hidróxido de sodio.

En la figura 2 se muestran los espectros de absorción de luz ultravioleta y visible para ambos precursores de titanio. Mientras que el producto obtenido por el protocolo de Kotsokchagia et al. (2008) absorbe luz en las longitudes de onda de 218 a 352, el de obtenido según Jeffryes et al. (2008) absorbe de 218 a 385 nm. La banda de absorción es ligeramente mayor para el producto de Jeffryes et al. (2008) (Figura 2B).



**Figura 2.** Espectro de absorción en luz ultravioleta y visible de la muestra sintetizada por el protocolo de Kotsokchagia et al. (2008) [A] y de Jeffryes et al. (2008) [B].

En la figura 3 se puede observar los patrones de dispersión de rayos x de las muestras mencionadas en la figura 1 y 2. Para el precipitado de Kotsokechagia et al. (2008) el espectro resulto igual al reportado por los autores del método, con la principal intensidad de difracción en la posición 25, 2 $\theta$ . Fue identificado como anatasa cristalina con la tarjeta 00-021-1272 "International Center for Diffraction Data". Para el protocolo de Jeffryes, el producto fue identificado como principalmente NaSO<sub>4</sub> por la tendencia general y similitud con la tarjeta cristalográfica 00-005-0631 2011 de la bases de datos antes mencionada.

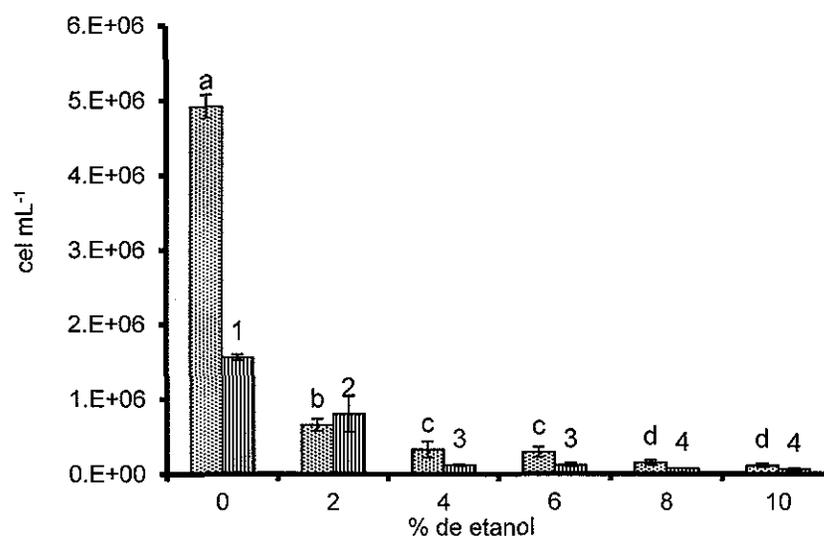


**Figura 3.** Difractogramas de rayos x del precipitado de anatasa obtenido con el protocolo de tetracloruro de titanio y alcoholes según Kotsokechagia et al (2008) y con el protocolo de precipitación de titanio (IV) oxisulfato en hidróxido de sodio según Jeffryes et al. (2008).

### VII.1.2. Tolerancia a etanol anhidro.

La figura 4 representa el número de frústulas por mililitro al ser cultivadas en medio F con concentraciones crecientes de etanol anhidro. La figura 5 muestra los resultados del ensayo confirmatorio del cual resultó la figura 4.

En la figura 4 se puede observar que el número de células encontradas en el tratamiento control, ó 0% etanol, fue mayor que en las diferentes concentraciones de etanol y se evaluaron diferencias entre especies ( $P < 0.001$ ). Así mismo, excepto en el control, el número de células contadas fue menor que el inóculo [sección VI.2, A)] y decreció conforme aumentó la concentración de etanol.



**Figura 4.** Células por mililitro (cél mL<sup>-1</sup>) de *Nitzschia laevis* (▨) y *Navicula incerta* (▩) en el noveno día de cultivo con etanol anhidro de 0 a 10% en medio F, ( $a > b > c > d$ ,  $1 > 2 > 3 > 4$ ).

En la figura 5 se puede observar que la misma tendencia observada en la figura anterior. Se encontró que el número de células de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* es distinto en las diferentes concentraciones de etanol anhidro ( $P < 0.001$ ) y se encontró una relación inversa del número de células respecto a la concentración de etanol.

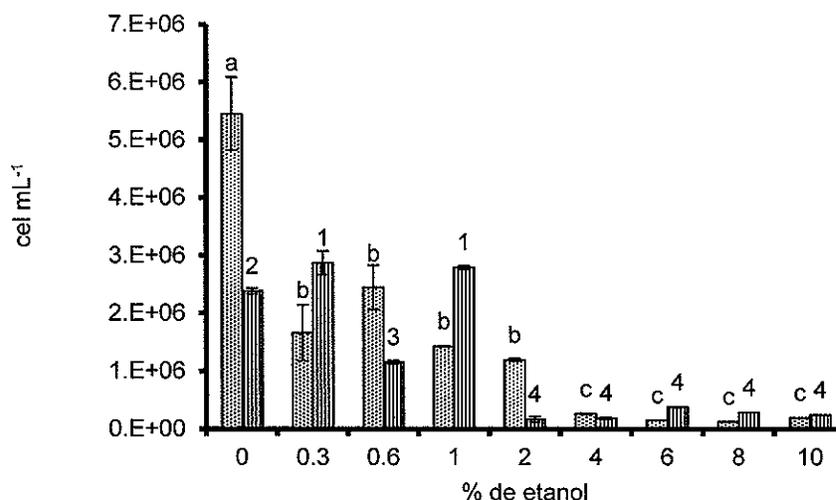
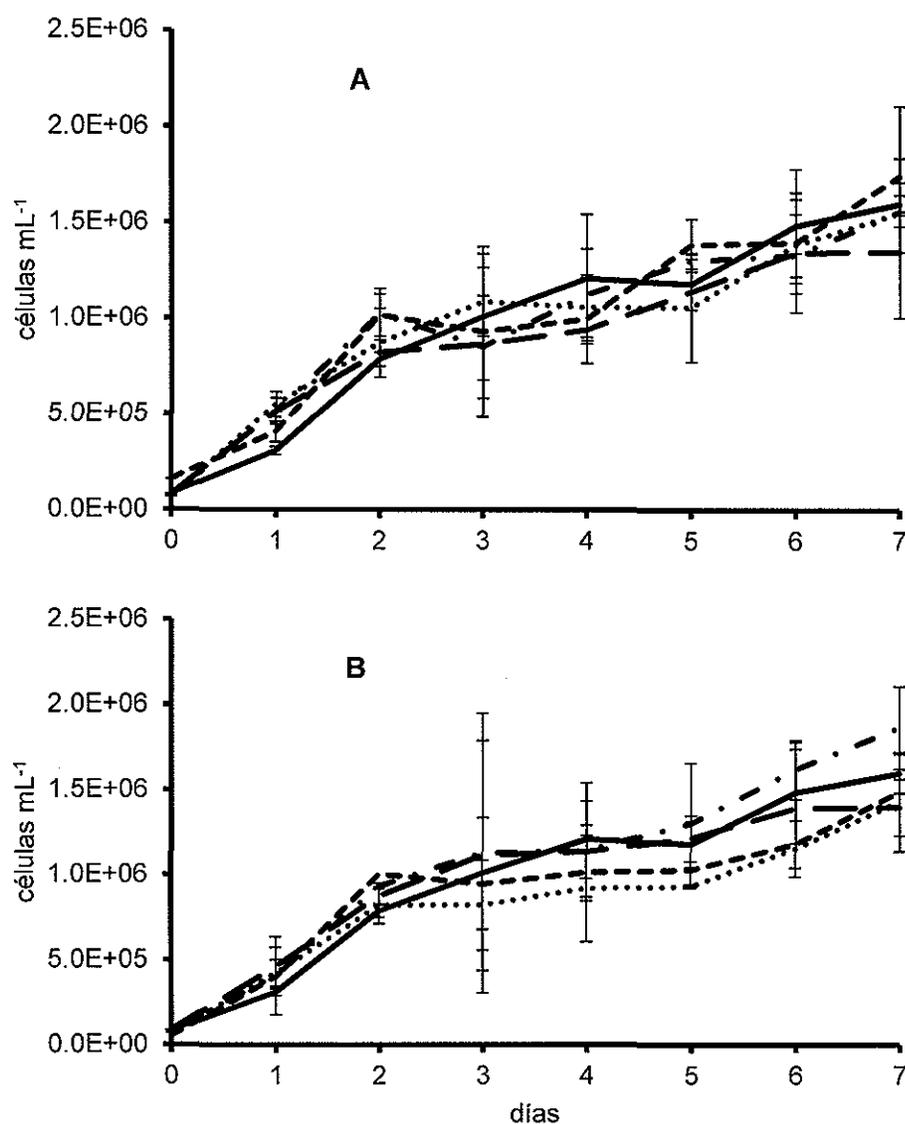


Figura 5. Células por mililitro (cél mL<sup>-1</sup>) de *Nitzschia laevis* (▨) y *Navicula incerta* (▧) en el noveno día de cultivo con etanol anhidro de 0 a 10% en medio F, ( $a > b > c$ ,  $1 > 2 > 3 > 4$ ).

### VII.1.3. Tolerancia a diferentes concentraciones de hidróxidos de titanio sintetizados por dos protocolos distintos.

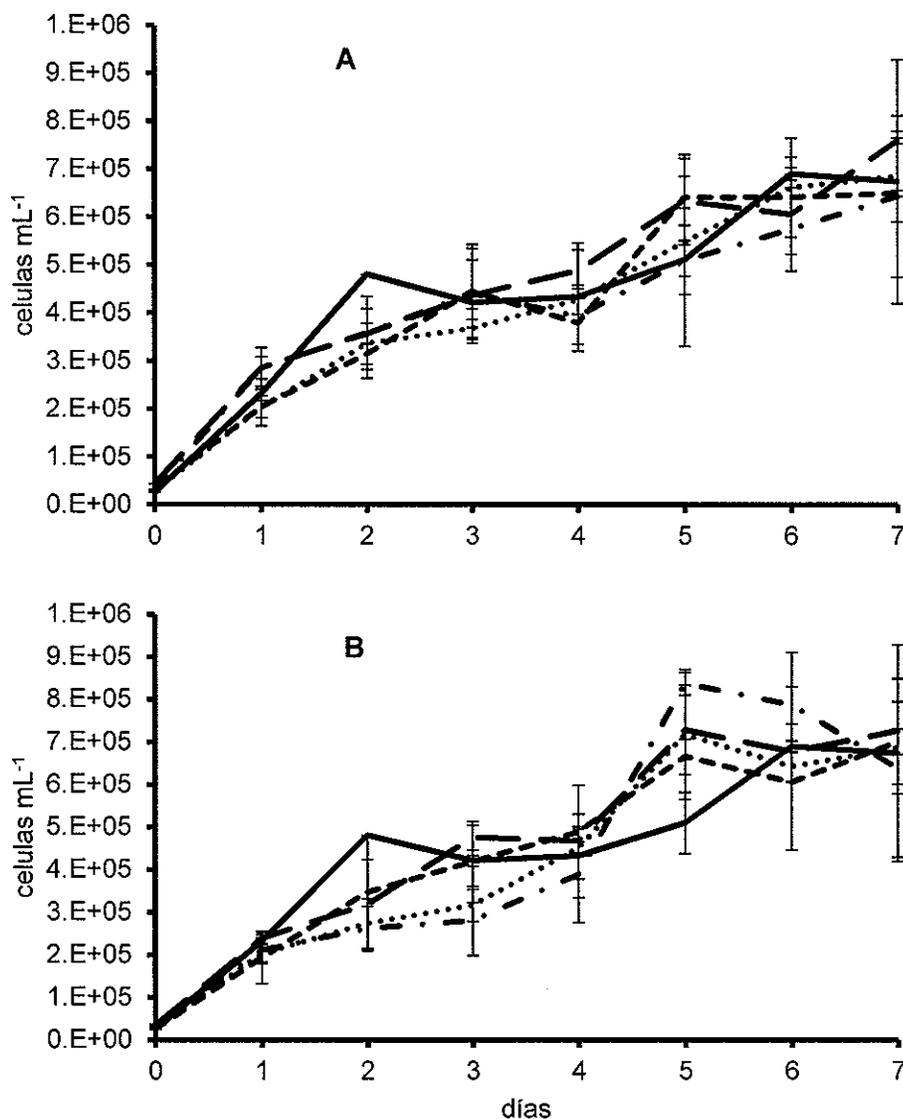
En la figura 6 y 7 se muestran los resultados del crecimiento celular de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* cultivadas en medio F y distintas concentraciones de las soluciones madre de titanio, cuya preparación fue descrita en la sección VI.2. Ambas especies mostraron crecimiento positivo respecto a los días de cultivo sin que sus datos mostraran una distribución normal ( $P < 0.050$ ). El crecimiento de *Nitzschia laevis* durante los días no mostró variaciones homogéneas ( $P < 0.050$ ), mientras que el de *Navicula incerta* sí lo fue ( $P = 0.401$ ).

En la figura 6 se muestran los datos del crecimiento de *Nitzschia laevis*, hubo diferencias en el número de células respecto a los días ( $P < 0.001$ ) pero, no respecto a los tratamientos ( $P = 0.443$ ) ni debido a sus concentraciones ( $P = 0.109$ ).



**Figura 6.** Número de células por mililitro de *Nitzschia laevis* durante siete días de cultivo en medio F con distinta concentración micromolar de titanio obtenido por dos protocolos. Para el protocolo de Jeffryes et al. (2008) [A] fueron probadas las concentraciones 0.8 [.....], 2.3 [— —], 4 [— . .] y 6.4 [— — —]  $\mu\text{M}$  de Ti. En tanto, para el protocolo de Kotsokechagia et al. (2008) [B] se utilizaron concentraciones de 0.003 [.....], 0.008 [— —], 0.013 [— . .] y 0.021 [— — —]  $\mu\text{M}$  de Ti. Tanto en A como en B [—] representa el tratamiento control.

En la figura 7 se muestran los datos del crecimiento de *Navicula incerta*. El crecimiento no fue diferente respecto a las concentraciones ( $P=0.185$ ) pero si entre protocolos ( $P=0.034$ ).

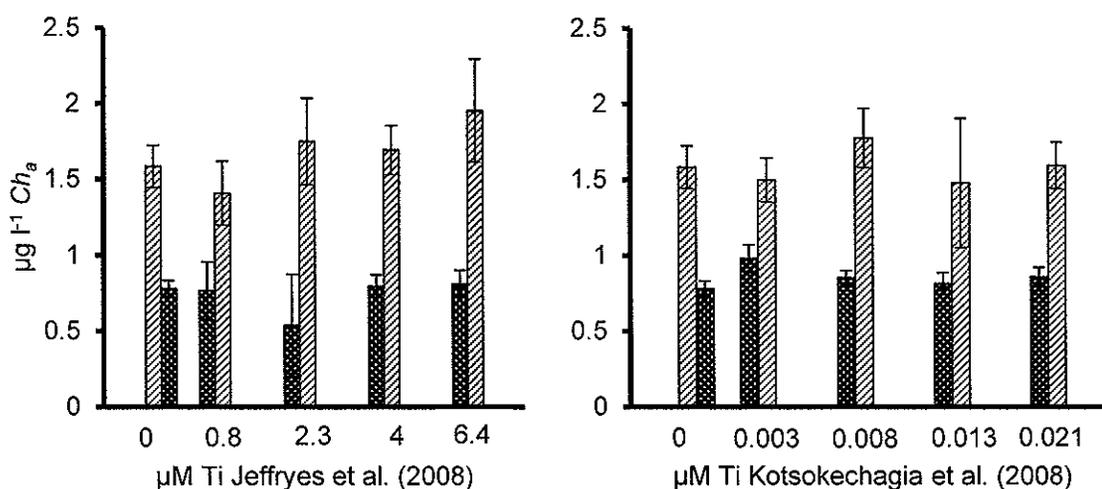


**Figura 7.** Número de células por mililitro de *Navicula incerta* durante siete días de cultivo en medio F con distinta concentración micromolar de titanio obtenido por dos protocolos. Para el protocolo de Jeffreyes et al. (2008) [A] fueron probadas las concentraciones 0.8 [.....], 2.3 [— — —], 4 [— . .] y 6.4 [— — — —] μM de Ti. En tanto, para el protocolo de Kotsokechagia et al. (2008) [B] se utilizaron concentraciones de 0.003 [.....], 0.008 [— — —], 0.013 [— . .] y 0.021 [— — — —] μM de Ti. Tanto en A como en B [—] representa el tratamiento control.

En la figura 8 se muestra la producción de clorofila a en microgramos por litro de cultivo de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* al ser cultivadas en medio F con distintas concentraciones de titanio obtenido mediante dos protocolos de síntesis. Para *Nitzschia laevis* resultó no normal ( $P < 0.050$ ) y de varianzas homogéneas ( $P = 0.695$ ). Mientras que para *Navicula incerta* resultó normal ( $P = 0.554$ ) y también con varianzas homogéneas ( $P = 0.687$ ).

Para *Nitzschia laevis* hubo diferencias en la producción de clorofila debido al protocolo utilizado ( $P = 0.027$ ), pero no debido a la concentración utilizada de los mismos ( $P = 0.261$ ).

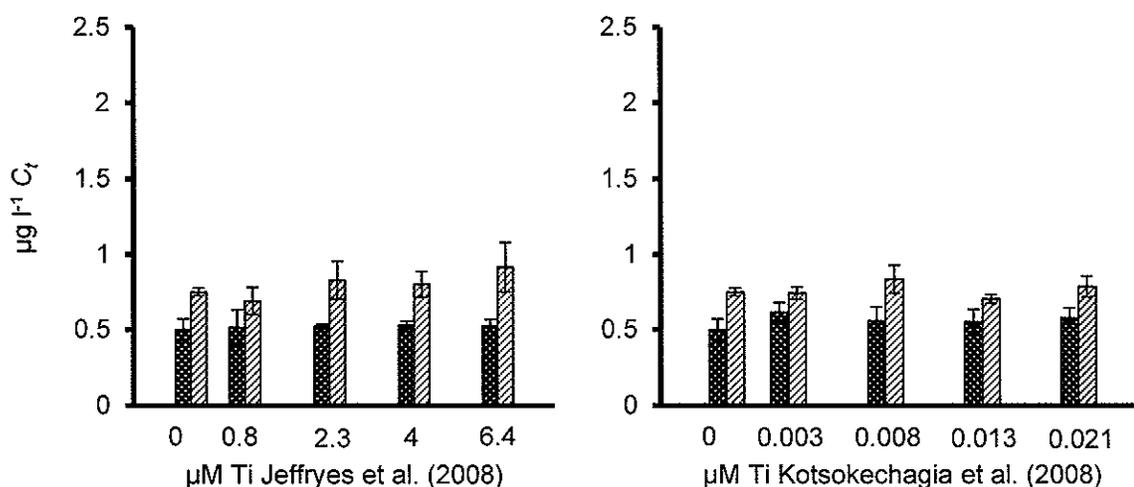
Para *Navicula incerta* no se registraron diferencias en la producción de clorofila debido al protocolo utilizado ( $P = 0.265$ ) ni tampoco debido a la concentración utilizada de los mismos ( $P = 0.086$ ).



**Figura 8.** Microgramos por litro de clorofila a evaluados al séptimo día de cultivo de *Nitzschia laevis* (■) y *Navicula incerta* (▨) en medio F con distintas concentraciones de titanio disuelto obtenido por el protocolo de Jeffryes et al. (2008) y de Kotsokechiaga et al. (2008).

La figura 9 representa la producción de carotenos totales de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta*. La distribución de los datos de ambas especies resultó normal ( $P=0.06$ ) y de varianzas homogéneas,  $P=0.634$  para *Nitzschia laevis* y  $P=0.635$  para *Navicula incerta*.

Así mismo, no se evaluaron diferencias en la producción de carotenos totales debido al protocolo utilizado como fuente de titanio ( $P=0.056$  y  $P=0.380$ ) ni debido a la concentración utilizada ( $P=0.638$ ,  $P=0.130$ ) para *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta*, respectivamente.



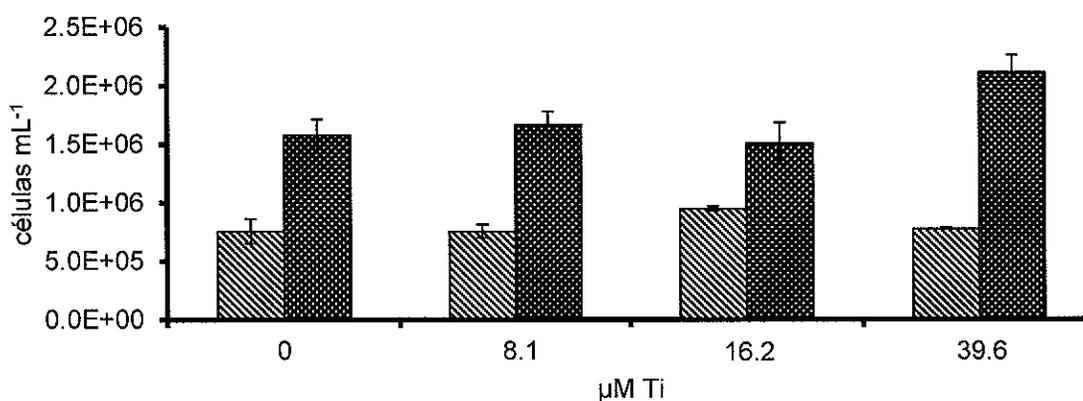
**Figura 9.** Microgramos por litro de carotenos totales evaluados al séptimo día de cultivo de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* en medio F con distintas concentraciones de titanio disuelto obtenido por el protocolo de Jeffryes et al. (2008) y de Kotsokechiaga et al. (2008).

#### VII.1.4. Cultivo de las diatomeas con concentraciones mayores de hidróxido de titanio.

En la figura 10 se muestra el crecimiento de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* medido en células por mililitro al ser cultivadas en medio F distintas concentraciones de la solución madre de titanio esterilizada obtenido con la modificación al protocolo de Kotsokechagia et al. (2008).

El número de células de *Navicula incerta* no mostró relación con la concentración de titanio (N=11, R=0.468) y su crecimiento resultó normal (P=0.727) y de varianzas homogéneas (P=0.653). El crecimiento fue distinto en las diferentes concentraciones de titanio (P=0.032) con la principal diferencia en las concentración 16.2  $\mu\text{M}$  Ti (P<0.05).

En la misma figura, los valores de *Nitzschia laevis* tuvieron relación positiva con la concentración de titanio (N=10, R=0.899) y su crecimiento fue normal (P=0.751) y de varianzas homogéneas (P=0.468). El crecimiento resultó distinto respecto a las concentraciones de titanio (P<0.001) excepto en la concentración 39.6  $\mu\text{M}$  Ti (P<0.05).



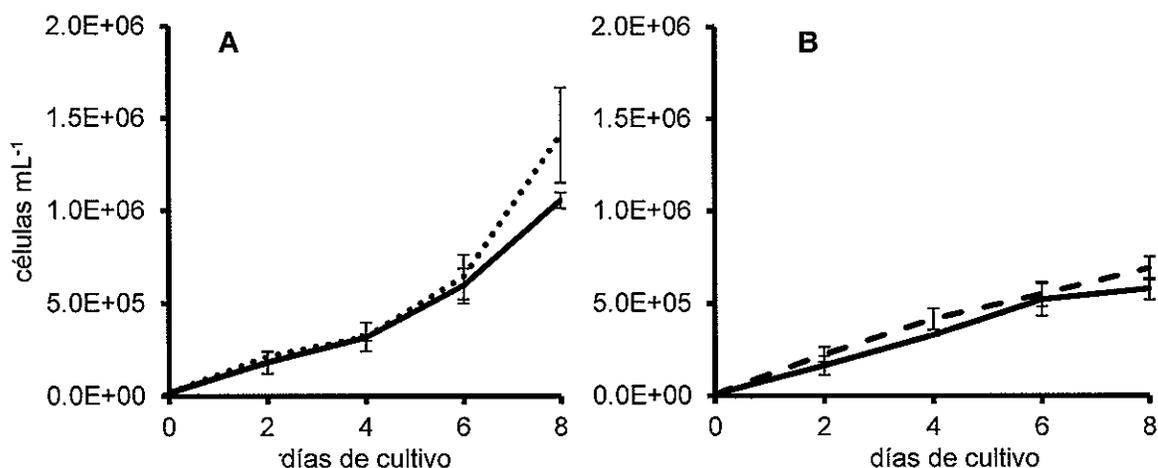
**Figura 10.** Número de células por mililitro de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* en el cuarto día de cultivo en medio F con distintas concentraciones de la solución madre de titanio esterilizada obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotsokechagia et al. (2008). Las barras representan a *Navicula incerta* (hatched) y a *Nitzschia laevis* (solid black).

## VII.2. Biomineralización.

En esta sección se presentan los resultados de los procedimientos planteados en la sección VI.4, de mismo nombre y en la cual se realizaron los experimentos para determinar la utilización de titanio y silicatos de las especies de diatomeas estudiadas, así como la caracterización de las frústulas obtenidas.

### VII.2.1. Utilización de Si y Ti.

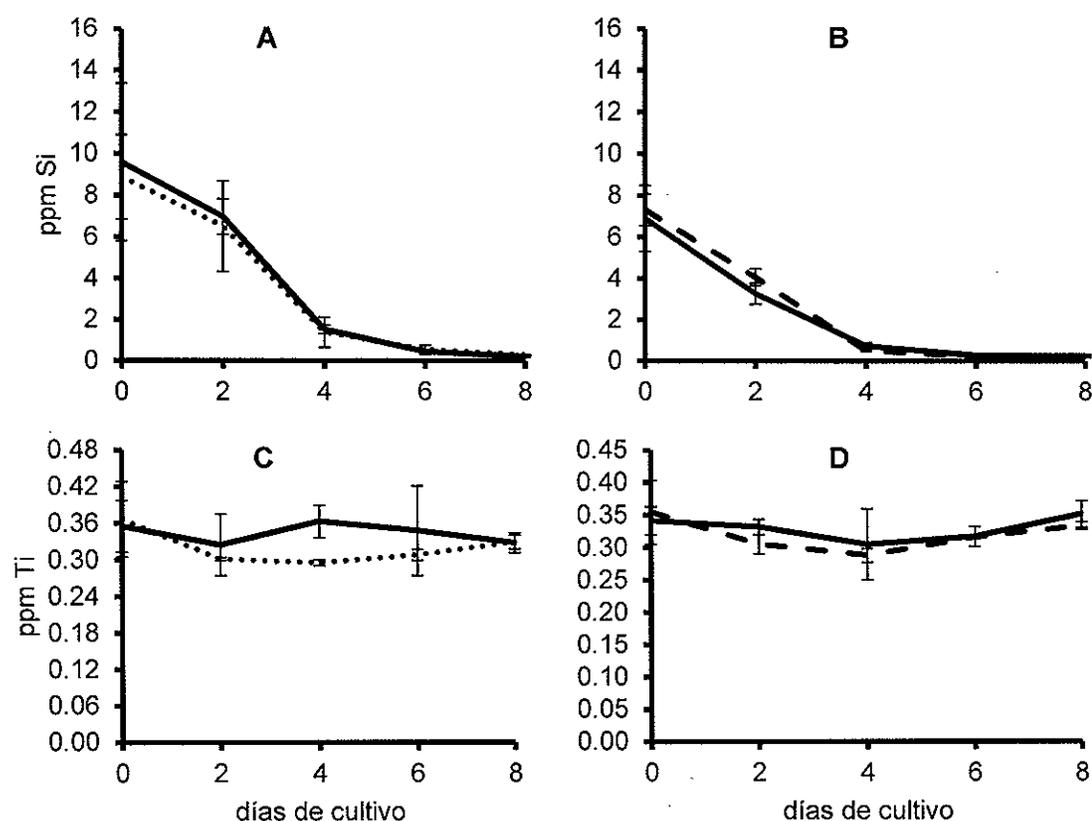
En la figura 11 se muestra el crecimiento de *Nitzschia laevis*, A, y *Navicula incerta*, B, al ser cultivadas durante ocho días en medio F y 40  $\mu\text{M}$  de Ti con la solución madre obtenida con la modificación del protocolo de Kotsokhechia et al. (2008). Mientras que para *Nitzschia laevis* los datos resultaron no normales ( $P < 0.05$ ), para *Navicula incerta* si lo fueron ( $P = 0.084$ ). Para ambas especies las varianzas fueron homogéneas,  $P = 0.111$  y  $P = 0.472$  respectivamente. Así mismo, para ambas especies el número de células fue distinto y se incrementó respecto a los días de cultivo ( $P \leq 0.001$ ). Tanto *Nitzschia laevis* ( $P = 0.045$ ) como *Navicula incerta* ( $P = 0.023$ ) fueron diferentes y significativamente mayores respecto a su control.



**Figura 11.** Número de células por mililitro de *Nitzschia laevis* (A) y *Navicula incerta* (B) cultivadas en 0 y 40 micromolar de titanio obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotsokhechia et al. (2008) [solución K' esterilizada]. Tratamientos control [—] y de titanio para *Nitzschia laevis* [.....] y *Navicula incerta* [---].

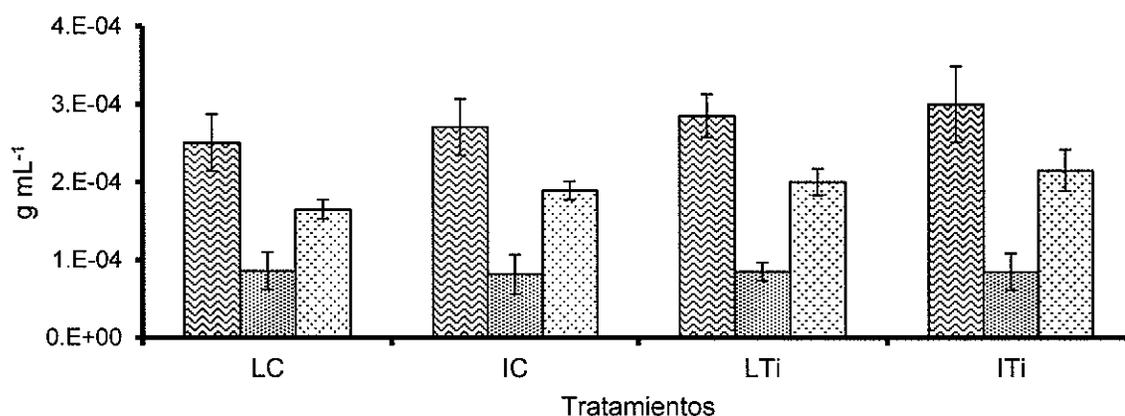
El monitoreo de la evolución del silicio y titanio en los cultivos celulares del primer ensayo de utilización de estos elementos, mostró que los silicatos puestos en el medio son utilizados para la generación de nuevas células de *Nitzschia laevis* y de *Navicula incerta* (figura 12 A y B). La depleción de la concentración del silicio en el medio es muy marcada en el día 4; en relación con el crecimiento celular (figura 11) es representativo de la fase exponencial de crecimiento.

Por otro lado, no pudo ser observada alguna tendencia clara de evolución para la concentración de titanio en el medio (figura 12 C y D) e incluso las ppm registradas por el ICP estuvieron muy por debajo de las 1.93 ppm de Ti esperadas.



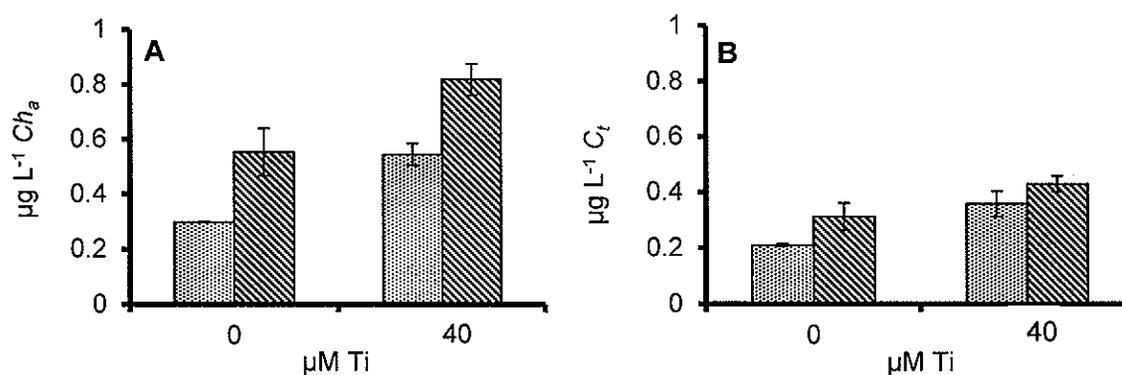
**Figura 12.** Concentración en ppm de silicio (A y B) y de titanio (C y D) disueltos en el medio extracelular de *Nitzschia laevis* [(.....) A y C] y *Navicula incerta* [(---) B y D] durante 5 días de cultivo. Los tratamientos control de ambas especies [—] corresponden a cultivos en medio F sin adición de titanio.

El peso seco total, peso seco orgánico y peso seco de cenizas de la biomasa producida en los cultivos de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* con 40  $\mu\text{M}$  de titanio durante 8 días fueron comparados con sus tratamientos control y entre ellos para cada especie (figura 13). Los datos de *Nitzschia laevis* resultaron ser normales ( $P=0.772$ ) y de varianzas homogéneas ( $P=0.174$ ). El tratamiento con titanio no resultó diferente al tratamiento control ( $P=0.080$ ). Los pesos total, de cenizas y orgánico resultaron diferentes entre sí ( $P<0.001$ , Tukey  $P<0.050$ ). Para *Navicula incerta* los datos resultaron ser normales ( $P=0.027$ ) con varianzas homogéneas ( $P=0.562$ ). El tratamiento con titanio no resultó diferente al tratamiento control ( $P=0.208$ ). Los pesos total, de cenizas y orgánico fueron diferentes entre sí ( $P<=0.001$ , Tukey  $P<0.005$ ).



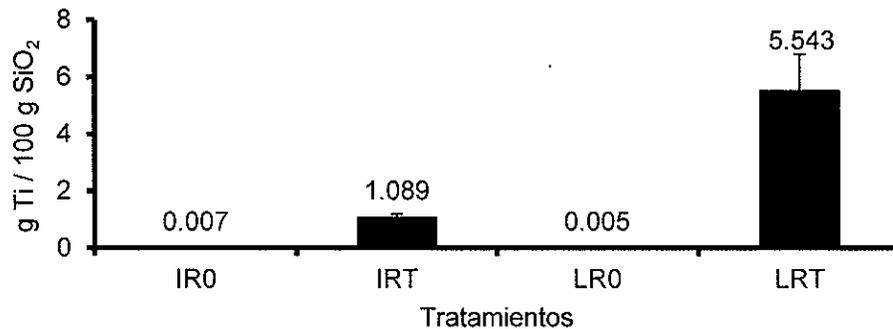
**Figura 13.** Gramos de materia de diatomeas por mililitro de medio de cultivo. Peso seco total , peso seco de cenizas  y peso seco orgánico  de *Nitzschia laevis* en el tratamiento control (LC) y en el tratamiento 40  $\mu\text{M}$  de Ti (LTi), así como de *Navicula incerta* en el tratamiento control (IC) y en 40  $\mu\text{M}$  de Ti (ITi). El titanio disuelto en el medio de cultivo F fue obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotskechagia et al. (2008).

La producción de clorofila a y carotenos totales (figura 14) de *Nitzschia laevis* resultó ser no normales ( $P < 0.050$ ) y con varianzas homogéneas ( $P = 0.181$ ). El contenido de pigmentos dependió de los tratamientos ( $P = 0.023$ ). El contenido de clorofila es diferente al contenido de carotenos en el control y en el tratamiento ( $P < 0.050$ ) y entre el control y el tratamiento ( $P < 0.050$ ). Para *Navicula incerta* los datos resultaron ser normales ( $P = 0.625$ ) y con varianzas homogéneas ( $P = 0.282$ ). La producción de clorofila a y carotenos fue diferente entre tratamientos ( $P \leq 0.001$ ).



**Figura 14.** Microgramos por litro de clorofila a (A) y carotenos totales (B) de *Nitzschia laevis* [dotted] y *Navicula incerta* [hatched] cultivadas en medio F más 40 μM de titanio obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado, según Kotsokechagia et al. (2008).

El grado de acumulación de titanio en las frústulas de ambas especies de diatomeas fue medido después de eliminárseles la fracción orgánica y se muestra en la figura 15. Fue evidente que existió una mayor acumulación de titanio en las frústulas de los tratamientos a los que se le adicionó dicho componente. Así mismo, fue evidente la diferencia entre especies, siendo mayor para la especie *Nitzschia laevis*.



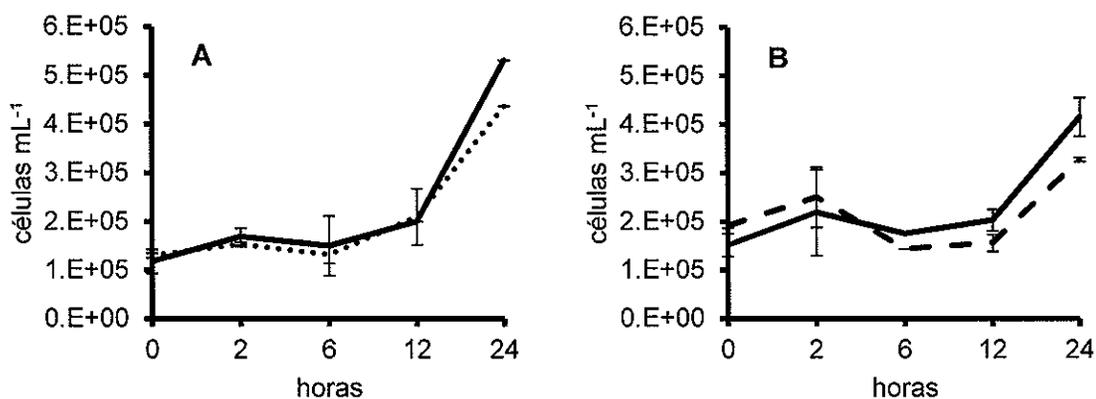
**Figura 15.** Acumulación de titanio por cada 100 gramos de óxido de silicio de las frústulas de *Navicula incerta* (IRT) y *Nitzschia laevis* (LRT), así como en sus tratamientos control, IR0 y LR0 respectivamente.

### VII.2.2. Utilización de silicatos y titanio en las primeras 24 horas.

El crecimiento celular de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* fue monitoreado durante las primeras 24 horas de cultivo (figura 16). Ambas especies mostraron diferencias en el número de células respecto al tiempo de cultivo ( $P \leq 0.001$ ) con una fase de aclimatación las primeras 12 horas de cultivo, para después incrementar a la hora 24, siendo esta la principal diferencia para ambas especies respecto al tiempo de cultivo ( $P < 0.001$ ).

El número de células *Nitzschia laevis* (figura 16 A) resultó normal ( $P = 0.107$ ) y de varianzas no homogéneas ( $P < 0.050$ ). No hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $P = 0.230$ ).

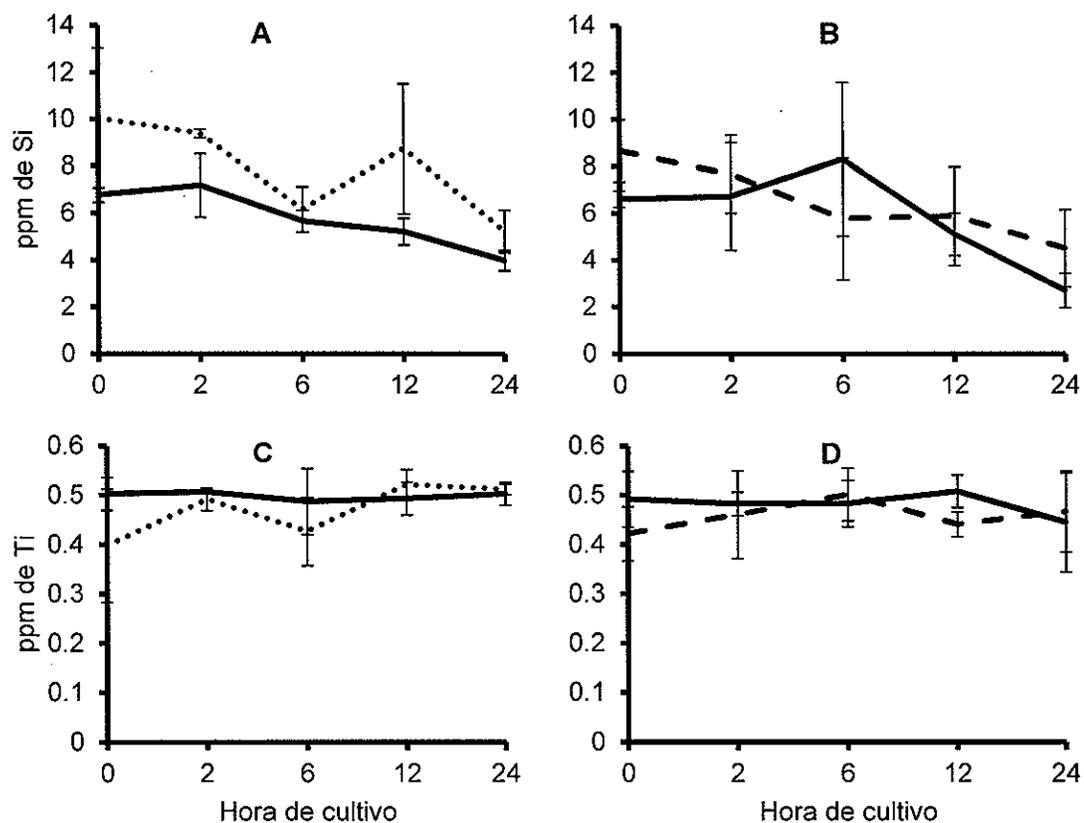
Para *Navicula incerta* (figura 16 B) el análisis mostró que sus datos son normales ( $P=0.102$ ) y de varianzas no homogéneas ( $P<0.050$ ). Tampoco mostró diferencias entre tratamientos ( $P=0.393$ ).



**Figura 16.** Células por mililitro producidas durante 24 horas de cultivo en 0 [—] y 40 μM de Ti para *Nitzschia laevis* (A) [.....] y para *Navicula incerta* (B) [---].

En la figura 17 A y B, puede observarse que para ambas especies de diatomeas tanto en los tratamientos con titanio así como, en los tratamientos control la disminución de la concentración de silicio libre en el medio es más evidente a las 24 horas de cultivo. Incluso en esta hora, las desviaciones estándar se traslapan entre tratamientos y antes de las 24 horas es difícil dictaminar con alguna tendencia.

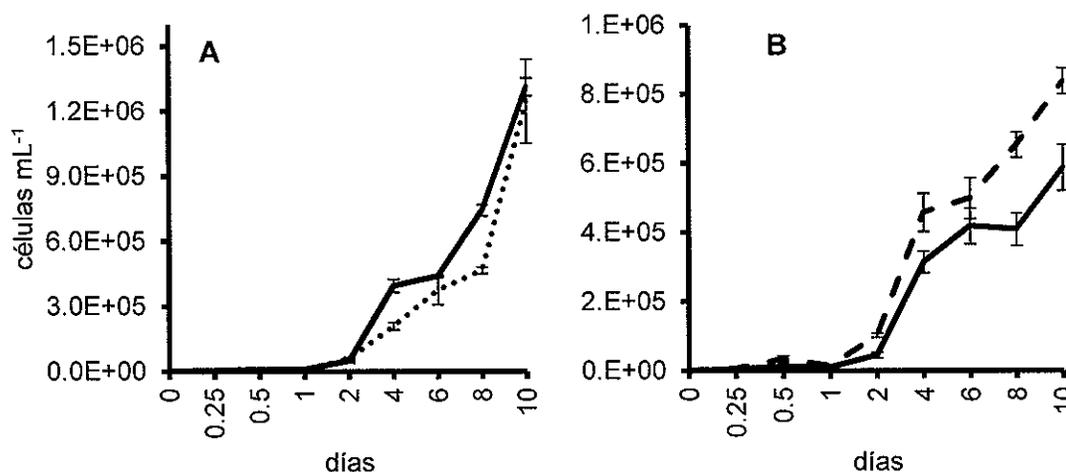
En esta ocasión y al igual que en el primer ensayo de esta sección no pudieron ser definidas con seguridad algún tipo de tendencia para el titanio, figura 17 C y D.



**Figura 17.** Concentración en ppm de silicio (A y B) y de titanio (C y D) disuelto en el medio extracelular de *Nitzschia laevis* (A y C) y *Navicula incerta* (B y D) durante 24 horas de cultivo. Los tratamientos control [—] corresponden a cultivos en medio F sin adición de titanio. Los tratamientos para *Nitzschia laevis* [.....] y *Navicula incerta* [— — —] fueron preparados de forma similar a los controles pero con adición de titanio.

### VII.2.3. Hidróxido de titanio en la solución sin esterilizar como fuente de titanio en el medio de cultivo.

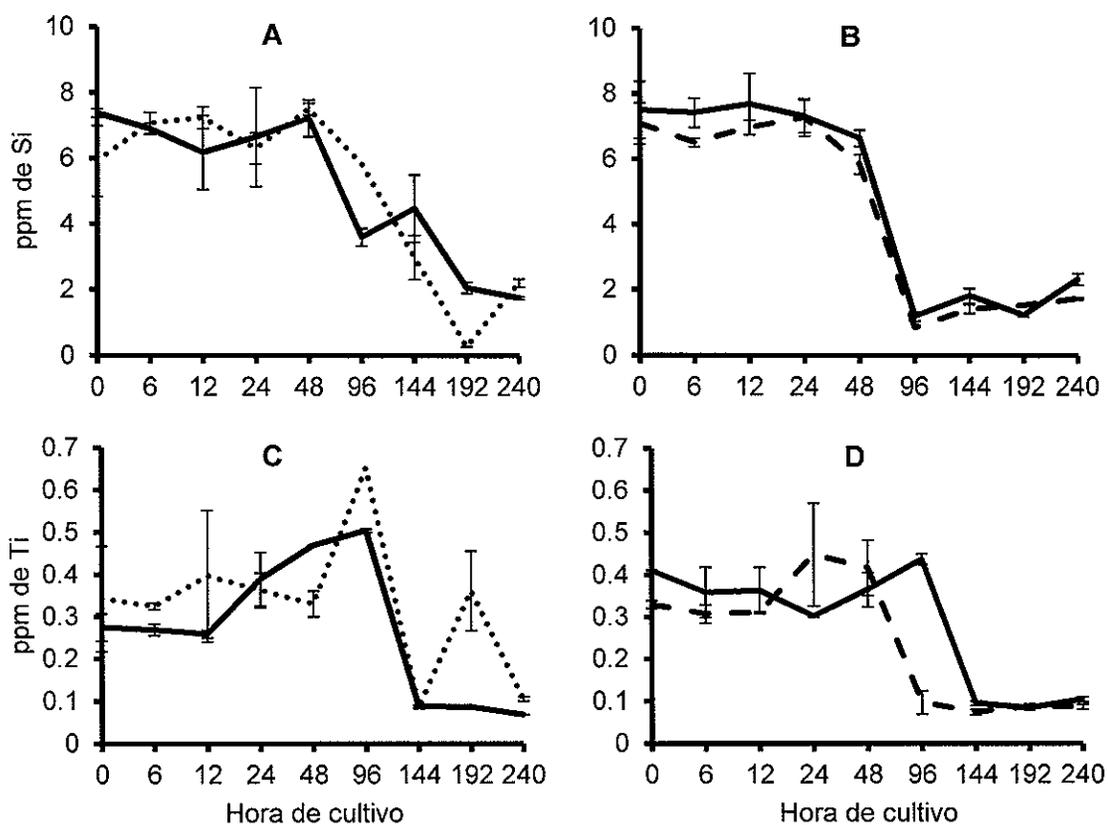
En los cultivos de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* en medio F con 211  $\mu\text{M}$  de Si al ser utilizada la solución madre de titanio obtenida con la modificación del protocolo de Kotsokochagia et al. (2008) y sin esterilizar, estos cultivos resultaron con mayor concentración inicial de titanio, 46  $\mu\text{M}$  de Ti, es decir 6  $\mu\text{M}$  más que en los ensayos anteriores. En dichas condiciones *Nitzschia laevis* presentó una tasa de crecimiento específica diaria ( $\mu$ ) de  $1.13 \pm 0.004$  en el tratamiento control y  $1.3 \pm 0.02$  en el tratamiento con titanio, en tanto que el valor para *Navicula incerta* fue de  $0.96 \pm 0.01$  y de  $1.01 \pm 0.06$ , respectivamente. En la figura 18 A se puede observar que para ambas especies se presentó la fase de aclimatación del inicio al primer día para en el cuarto día estar en plena fase exponencial. No se registró fase estacionaria en las horas de cultivo muestreadas. La distribución de los datos de número de células de *Nitzschia laevis* resultó ser no normal ni de varianzas homogéneas ( $P < 0.050$ ). El cambio en el número de células por día dependió del tratamiento ( $P \leq 0.001$ ) siendo mayor para el tratamiento control. Para *Navicula incerta* tampoco fueron normales ( $P < 0.050$ ) pero sí de varianzas homogéneas ( $P = 0.312$ ). El cambio del número de células en los días también dependió del tratamiento y fue significativamente mayor en el cultivo con titanio ( $P \leq 0.001$ ).



**Figura 18.** Células por mililitro producidas durante 24 horas de cultivo en 0 [—] y 46  $\mu\text{M}$  de Ti para *Nitzschia laevis* (A) [.....] y para *Navicula incerta* (B) [- - -].

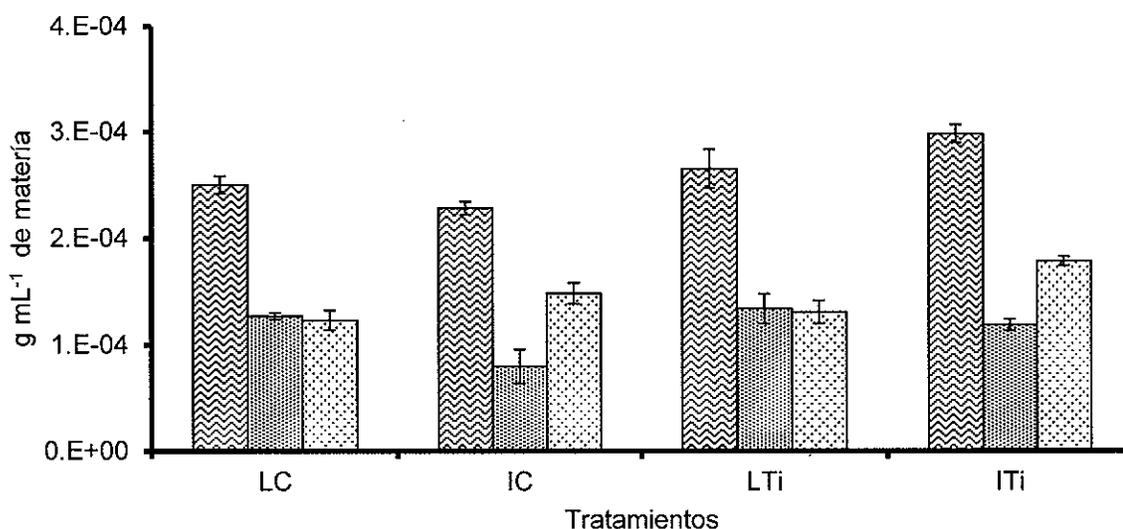
En el tercer ensayo de monitoreo de silicatos y titanio disueltos en el medio (figura 19), se observó la misma tendencia de depleción del silicio relacionado con la fase exponencial de crecimiento de ambas especies de diatomeas (figura 19 A y B).

Aunque para el titanio en esta ocasión se esperaba una concentración máxima inicial de 2.2 ppm, solo se registraron máximas de 0.4 ppm. Aunque se registró una tendencia distinta a los ensayos anteriores no se tuvo seguridad instrumental para afirmar algo sobre ello (figura 19 C y D).



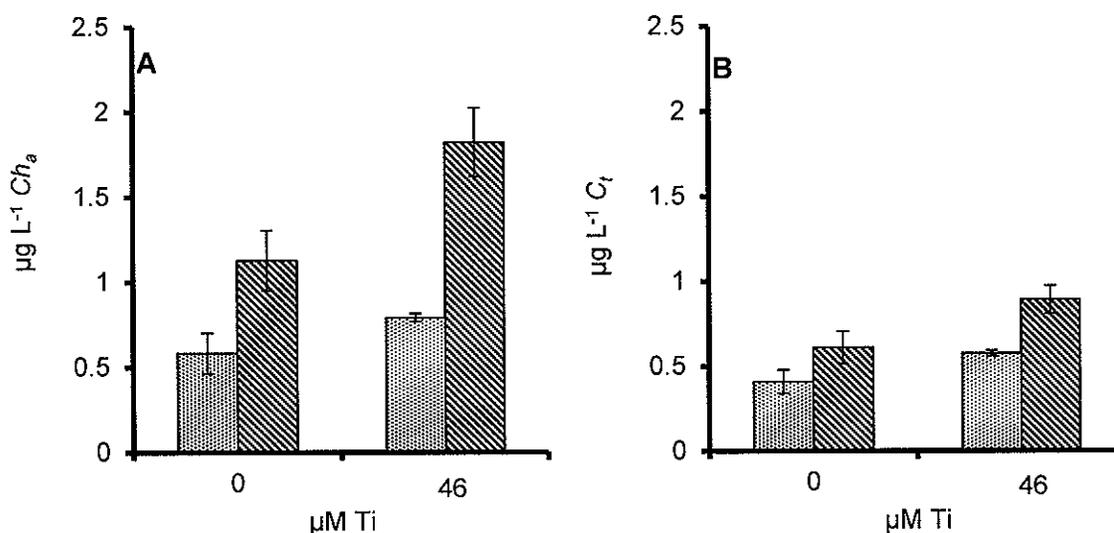
**Figura 19.** Concentración en ppm de silicio (A y B) y de titanio (C y D) disuelto en el medio extracelular de *Nitzschia laevis* (A y C) y *Navicula incerta* (B y D) durante 240 horas de cultivo. Los tratamientos control [—] corresponden a cultivos en medio F sin adición de titanio. Los tratamientos para *Nitzschia laevis* [.....] y *Navicula incerta* [---] fueron preparados de forma similar a los controles pero con adición de titanio.

La biomasa producida en los cultivos de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* ahora con 46  $\mu\text{M}$  de titanio y durante 10 días, fueron analizados como peso seco total, peso seco orgánico y peso seco de cenizas y fueron comparados con sus tratamientos control y entre ellos para cada especie (figura 20). La distribución de los datos de gramos de materia por mililitro de *Nitzschia laevis* resultó ser normal ( $P=0.674$ ) y de varianzas homogéneas ( $P=0.458$ ). No se encontraron diferencias entre sus tratamientos ( $P=0.085$ ) y los datos fueron distintos entre cada tipo de materia analizada ( $P<0.001$ ). Para *Navicula incerta* también resultaron normales ( $P=0.466$ ) y con varianzas homogéneas ( $P=0.669$ ). El efecto del tipo de materia analizado dependió de los tratamientos ( $P=0.007$ ) y es diferente entre tratamientos y entre tipo de materia analizado ( $P<0.050$ ).



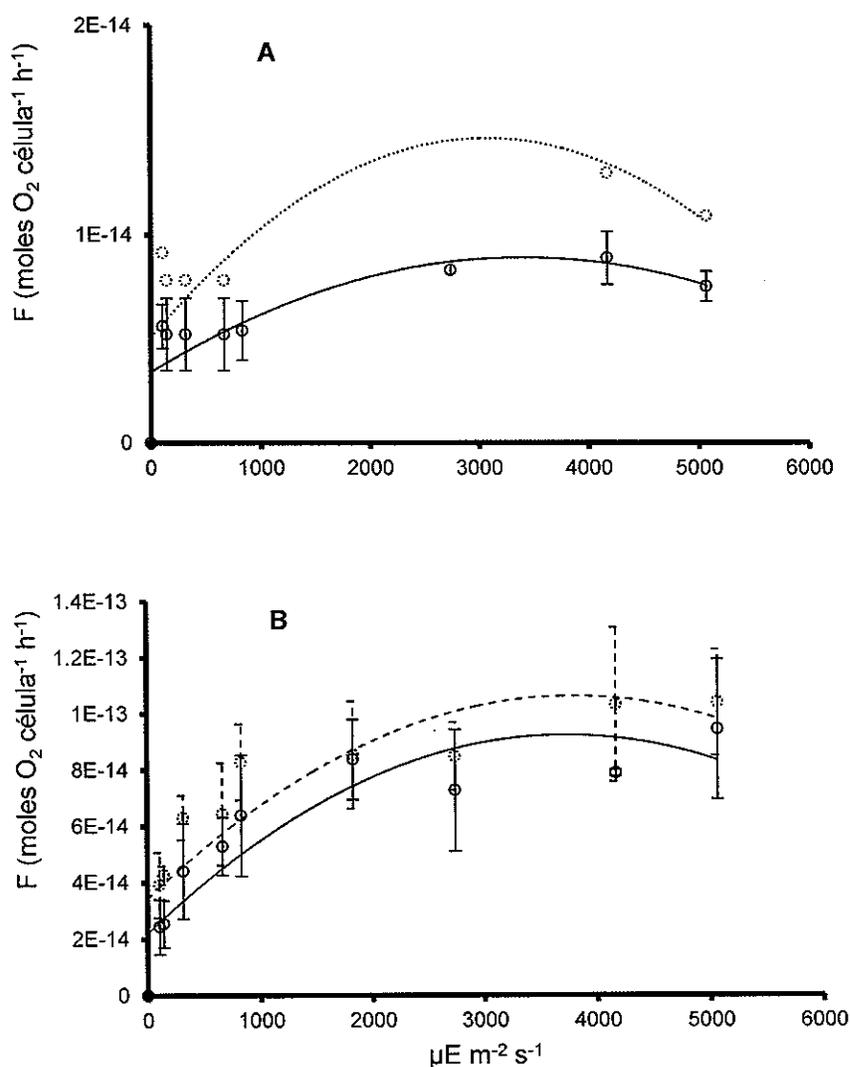
**Figura 20.** Gramos de materia de diatomeas por mililitro de medio de cultivo. Peso seco total , peso seco de cenizas  y peso seco orgánico  de *Nitzschia laevis* en el tratamiento control (LC) y en el tratamiento 46  $\mu\text{M}$  de Ti (LTi), así como de *Navicula incerta* en el tratamiento control (IC) y en 46  $\mu\text{M}$  de Ti (ITi). El titanio disuelto en el medio de cultivo F fue obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado y sin esterilizar, según Kotsokochagia et al. (2008).

Para cada especie se comparó el contenido de pigmentos entre el tratamiento control y con titanio y entre clorofila a y carotenos totales (Figura 21). Para *Nitzschia laevis* los datos resultaron ser normales ( $P=0.160$ ) y con varianzas homogéneas ( $P=0.432$ ). El contenido de clorofila fue diferente al contenido de carotenos ( $P=0.001$ ) y también entre los tratamientos ( $P=0.002$ ), siendo mayor en el tratamiento con titanio, sin embargo por efecto de las desviaciones no hay diferencia. Para *Navicula incerta* los datos resultaron ser normales ( $P=0.099$ ) y con varianzas homogéneas ( $P=0.632$ ). La producción de clorofila y carotenos dependió del tratamiento ( $P=0.043$ ). La producción de clorofila a y carotenos fue diferente y también entre tratamientos ( $P<0.001$ ), con valores mayores para el tratamiento con titanio.



**Figura 21.** Microgramos por litro de clorofila a (A) y carotenos totales (B) de *Nitzschia laevis* (▨) y *Navicula incerta* (▩) cultivadas durante 10 días en medio F más titanio obtenido por hidroxilación directa del tetracloruro de titanio con etanol anhidro, sin obtención de precipitado y sin esterilizar, según Kotsokhechia et al. (2008).

En la figura 22 B se representa la cantidad de moles de oxígeno liberados por célula de *Navicula incerta*. Fue comparada entre muestras del cultivo de 46  $\mu\text{M}$  de Ti de diez días de edad y entre sus tratamiento control, así como entre las distintas irradiancias de luz. Los datos resultaron ser normales ( $P=0.575$ ) y de varianzas homogéneas ( $P=0.652$ ), siendo la liberación de oxígeno distinta entre los tratamientos ( $P=0.005$ ) y en las distintas irradiancias ( $P<0.001$ ).



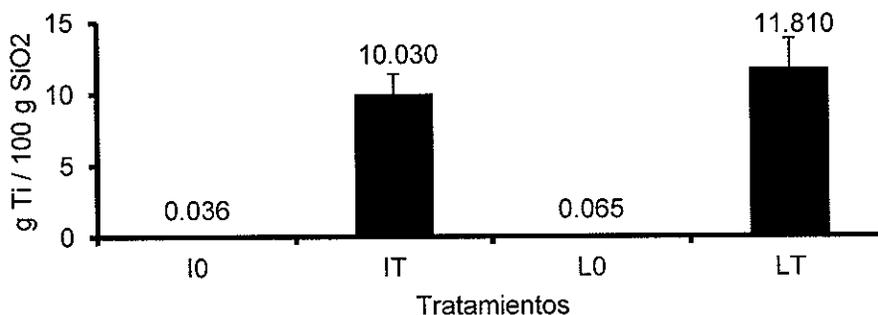
**Figura 22.** Liberación de oxígeno como respuesta a diferentes irradiancias de luz blanca. Las células pertenecen a los cultivos control (—) en medio F sin adición de titanio así como, de *Nitzschia laevis* (.....) [A] y *Navicula incerta* (— —) [B] preparados de forma similar a los controles pero con adición de titanio.

Los parámetros  $I_k$ ,  $F_{max}$  y  $\alpha$  de *Navicula incerta* (figura 22, B) fueron comparados entre el control y del tratamiento. Los valores de  $I_k$  resultaron diferentes ( $P=0.090$ ), los valores de  $F_{max}$  y  $\alpha$  no mostraron diferencia significativa ( $P=0.845$  y  $P=1.0$ ).

**Tabla I.** Valores promedio de los parámetros que describen la respuesta fotosintética de las células de diatomeas en los tratamientos con y sin titanio.  $I_k$  es el índice de saturación lumínica;  $F_{max}$  es la máxima tasa de liberación de oxígeno;  $\alpha$  es la pendiente inicial de la curva que describe la liberación de oxígeno en respuesta a la irradiancia ( $a>b$ ).

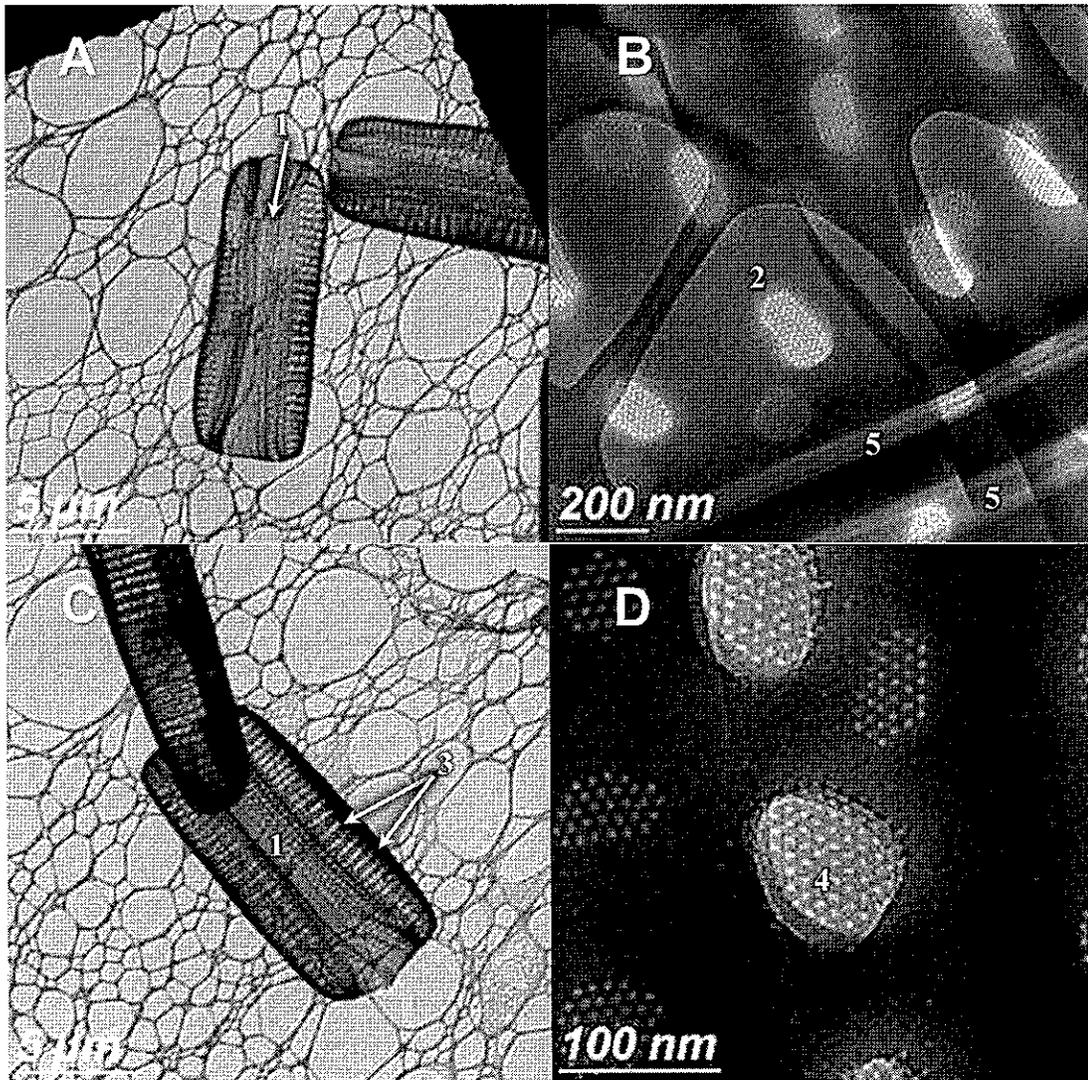
	$I_k$	$F_{max}$	$\alpha$
Control <i>Nitzschia laevis</i>	1.56E+4 (4.9E+2)	8.9E-15 (1.3E-15)	9.00E-19 (1.7E-19)
Titanio <i>Nitzschia laevis</i>	19914.8	1.29 E-14	1E-18
Control <i>Navicula incerta</i>	1965.3 b (147.911)	1E-13 a (3E-14)	6.00E-17 a (1.73E-17)
Titanio <i>Navicula incerta</i>	3683.7 a (808.34)	1.11E-13 a (2.5E-14)	4.33E-17 a (1.5E-17)

La figura 23 representa el grado de acumulación de titanio en las frústulas de ambas especies de diatomeas, el cual fue medido después de eliminárseles la fracción orgánica y de someterles a tratamiento térmico. La acumulación de titanio fue mayor en las frústulas de los cultivos con 46  $\mu$ M de titanio. Fue evidente la diferencia entre especies, siendo mayor para la especie *Nitzschia laevis* (LT).

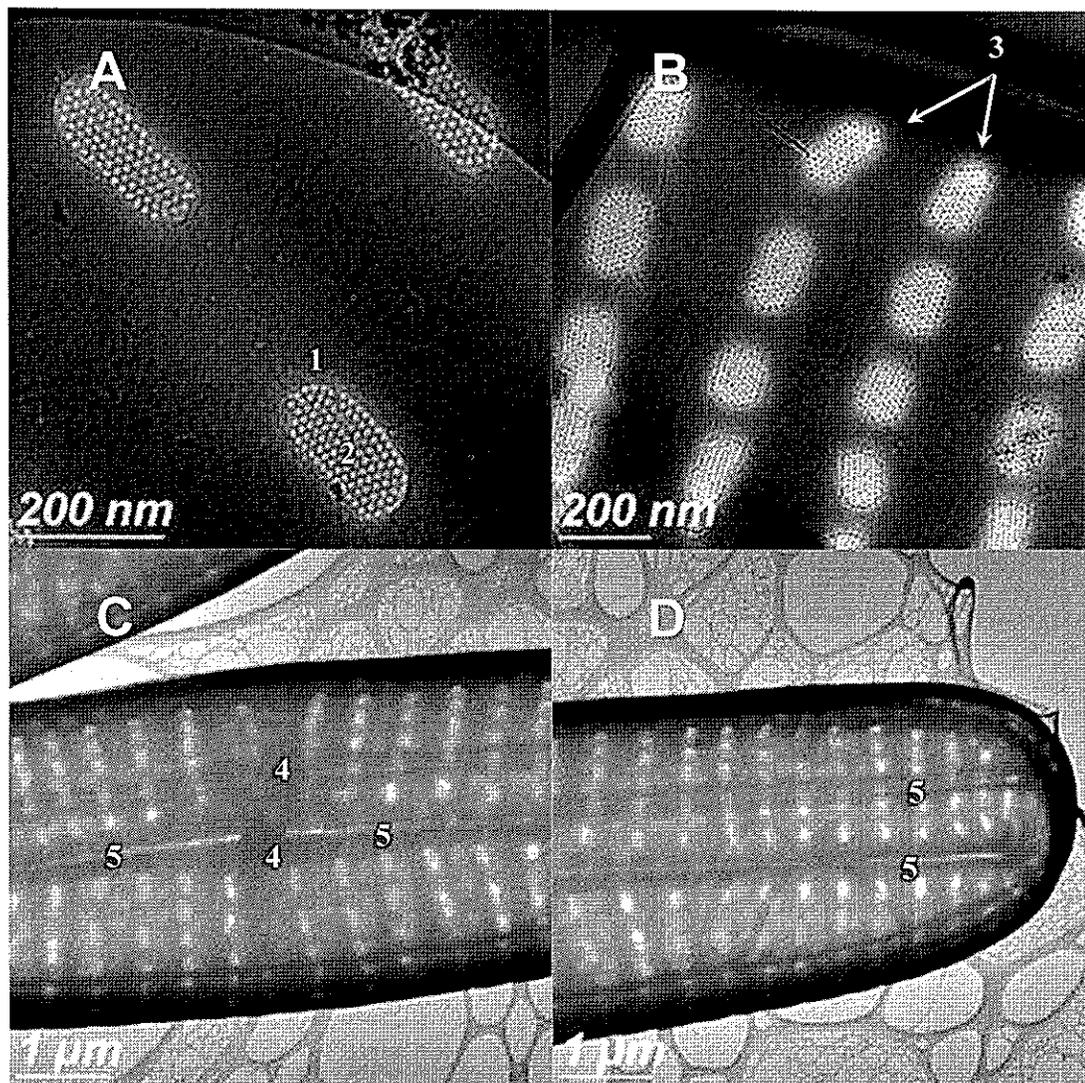


**Figura 23.** Grado de acumulación de titanio por cada 100 gramos de óxido de silicio en frústulas de *Navicula incerta* (IT) y *Nitzschia laevis* (LT). I0 y L0 representan sus respectivos tratamientos control.

En la figura 24 se muestran ejemplares de frústulas obtenidas en los cultivos de *Navicula incerta*. En el pie de cada figura se indican las características propias de una diatomea penada rafida. Se pudo observar que los detalles de estas características no cambiaron entre el tratamiento control y con titanio. La figura 25 muestra más detalles de los especímenes en los tratamientos con titanio.

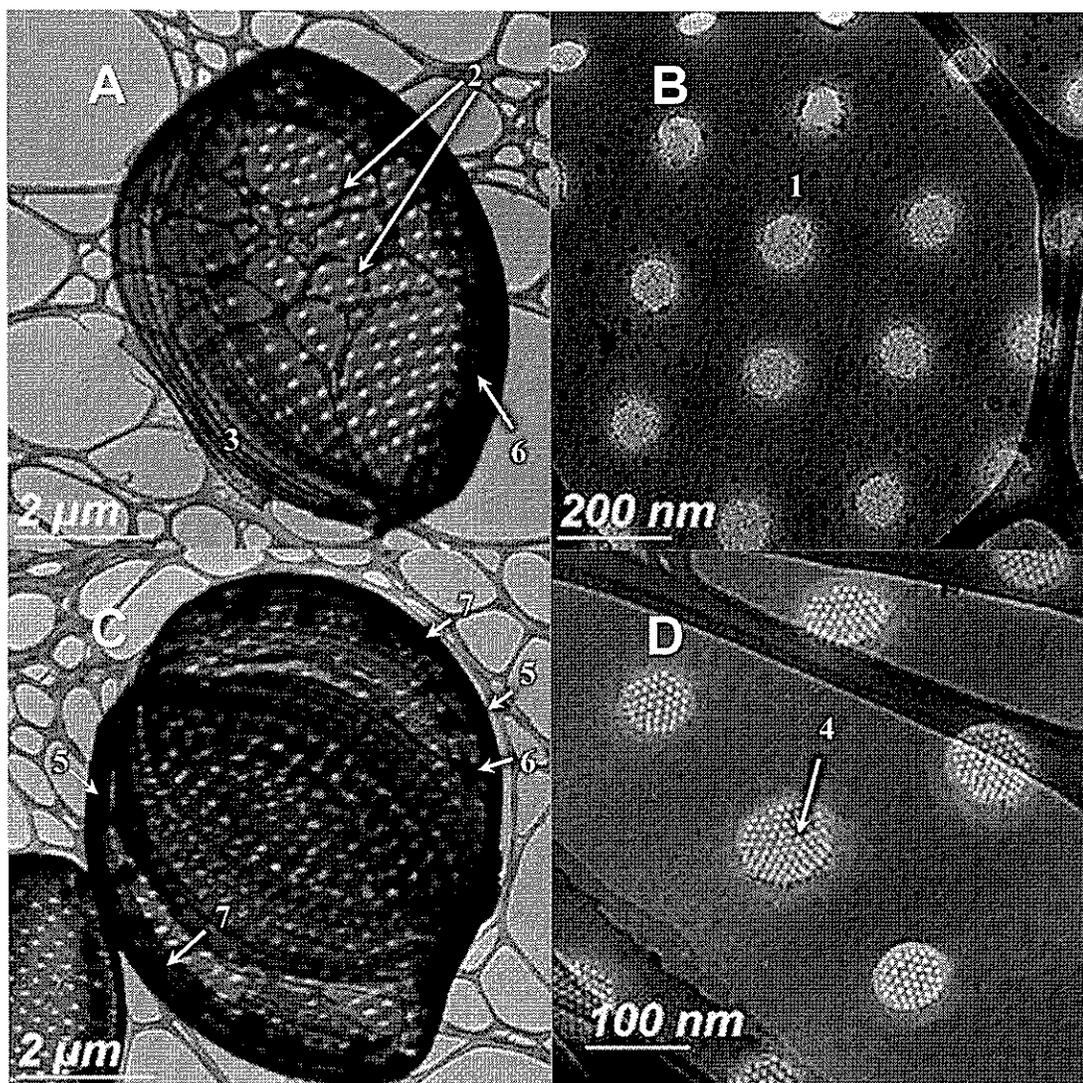


**Figura 24.** Frústulas de *Navicula incerta*. A y B son ejemplos de especímenes en los tratamientos control. C y D son de los tratamientos con adición de titanio. Las tecas continúan unidas debido al traslape de las bandas pleurales (1). Las valvas muestran alineaciones de areolas (2) formando estrías (3). Las areolas presentan un foramen de ornamentación periódica constante y mineralizado (4) que está ausente en la abertura de la costilla longitudinal o rafe (5).

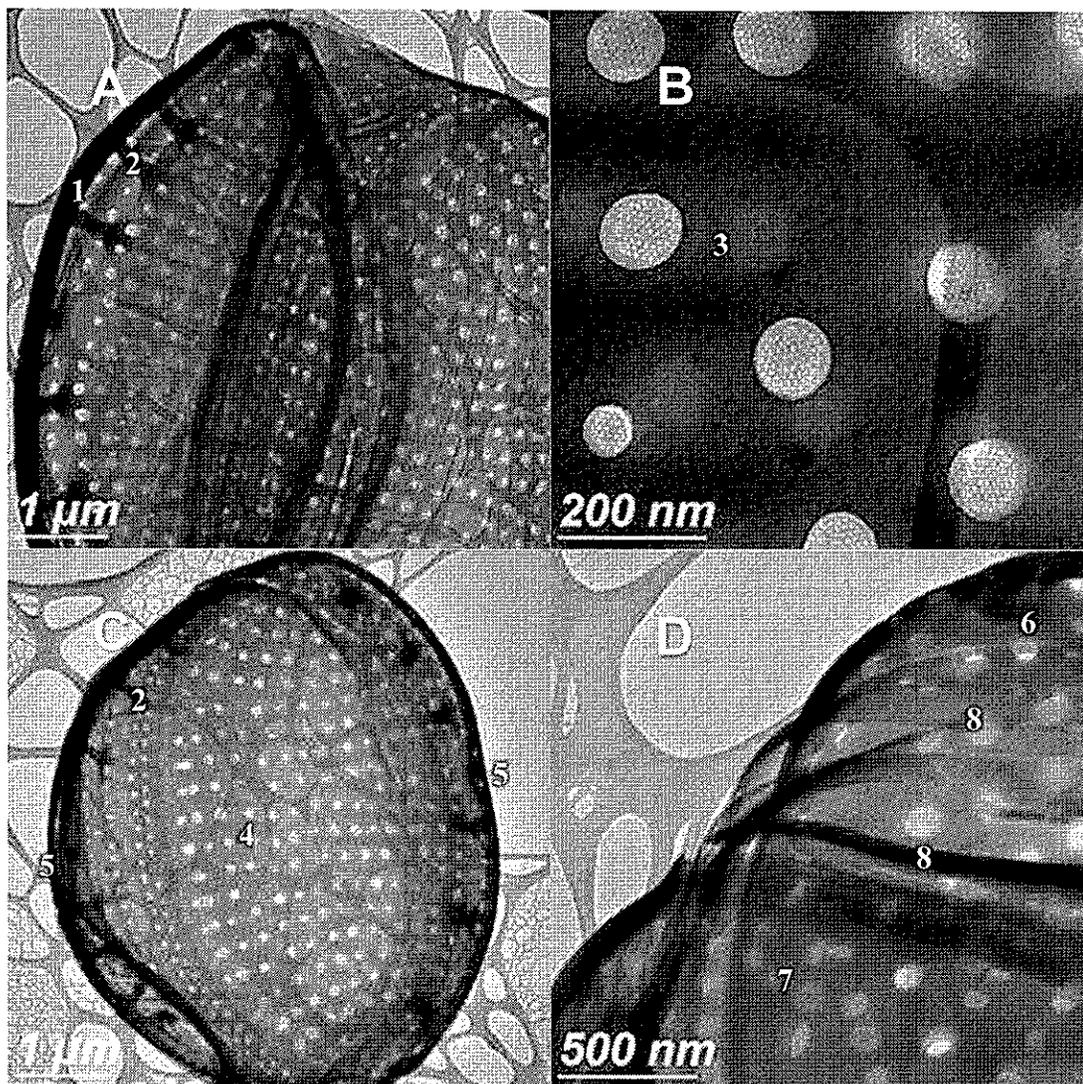


**Figura 25.** Frústulas de *Navicula incerta* en los tratamientos con titanio. En A se muestran areolas (1) con foramen de poros de tamaño constante y está mineralizado (2). En B se observan estrías (3) o alineaciones de areolas, en este caso en desarrollo. Las característica principales de una diatomea penada rafida son la presencia de nódulos centrales (C 4), para esta especie son dos, los cuales interrumpen a las costillas longitudinales abiertas y sin foramen (C 5 y D 5).

En la figura 26 se muestran frústulas obtenidas en los cultivos de *Nitzschia laevis*. En cada figura se indican las características de una diatomea penada arafida lanceolada. Al igual que para *Navicula incerta*, se pudo observar que estas características no cambiaron entre el tratamiento control y con titanio.

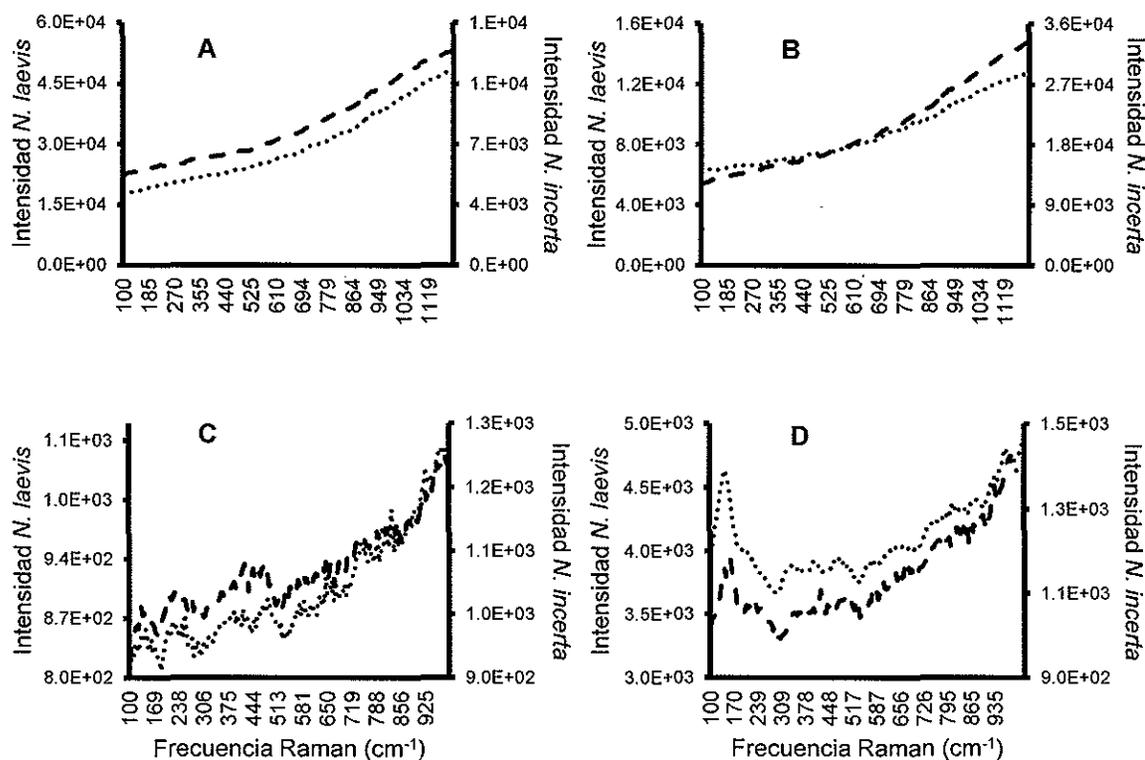


**Figura 26.** Frústulas de *Nitzschia laevis*. En A y B se puede observar las alineaciones de las areolas (1) formando estrías (2) en la valva. En A se muestra una sola teca obtenida en los tratamientos control y que conserva sus regiones pleurales (3). C y D muestran ejemplares de los tratamientos con adición de titanio. En C ambas tecas continúan próximas. En D se muestran detalles del foramen mineralizado (4) el cual está dañado en B debido a la manipulación de la muestra. *Nitzschia laevis* presenta una costilla (5) en un extremo de la valva, con ornamentaciones (6) que se extienden de ella hacia la región pleural. El nódulo central (7) divide a la costilla.



**Figura 27.** Frústulas de *Nitzschia laevis* de los tratamientos con titanio. Se puede observar la costilla (1) en un extremo de la valva y con ornamentaciones que se extienden hacia la región pleural (2). B muestra detalles de las areolas (3) las cuales están en alineaciones formando estrías (4). La costilla está dividida por un nódulo central (5). En D se pueden observar la epiteca (6) e hipoteca (7) traslapadas en sus regiones pleurales (8).

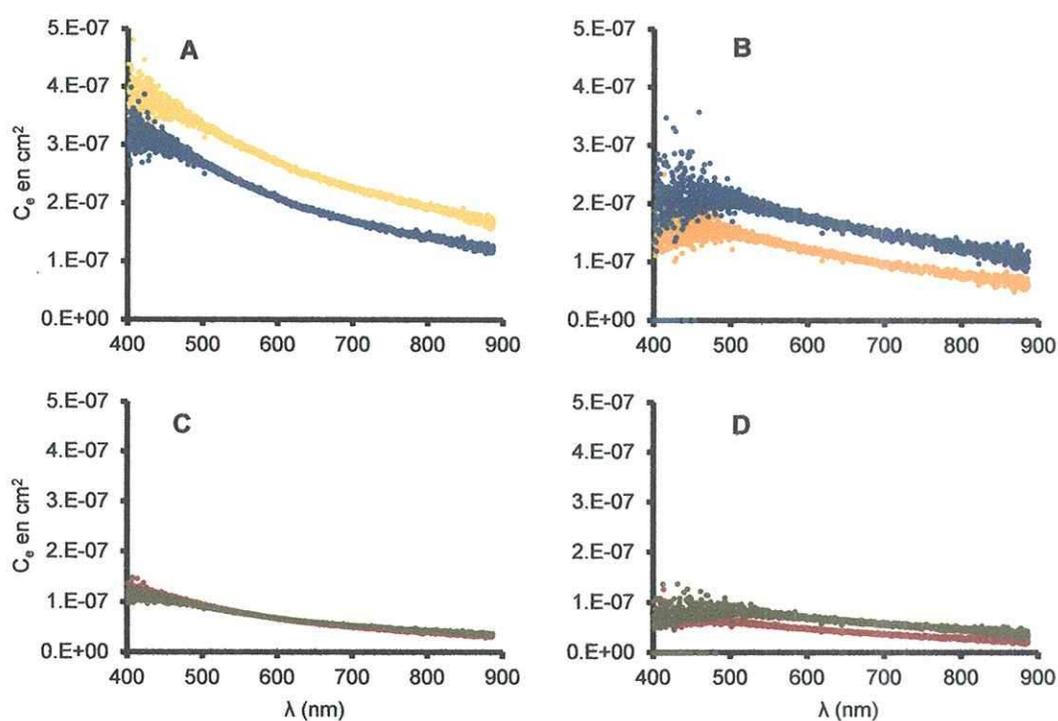
La figura 28 representa los espectros Raman tomados con muestras de frústulas de *Nitzschia laevis* (A) y *Navicula incerta* obtenidas en sus tratamientos control y con titanio (B). Los cuales volvieron a ser registrados después de someterles a tratamiento térmico (C y D). Con ello se pudo observar que solamente se presentó formación de anatasa en las frústulas tratadas térmicamente de ambas especies de diatomeas y que su huella de emisión estuvo entre los 100 y 170  $\text{cm}^{-1}$  (figura 28 D).



**Figura 28.** Espectros Raman de las frústulas formadas antes (A, B) y después (C, D) de tratarlas 5 horas a  $550^{\circ}\text{C}$  con rampa de 10 grados por minuto. A y C son los tratamientos control; B y D los tratamientos con titanio; *Nitzschia laevis* [.....] y *Navicula incerta* [— — —]. La formación de anatasa está presente solo en los tratamientos con titanio después del tratamiento térmico siendo visible entre los 100 y 200  $\text{cm}^{-1}$  (D).

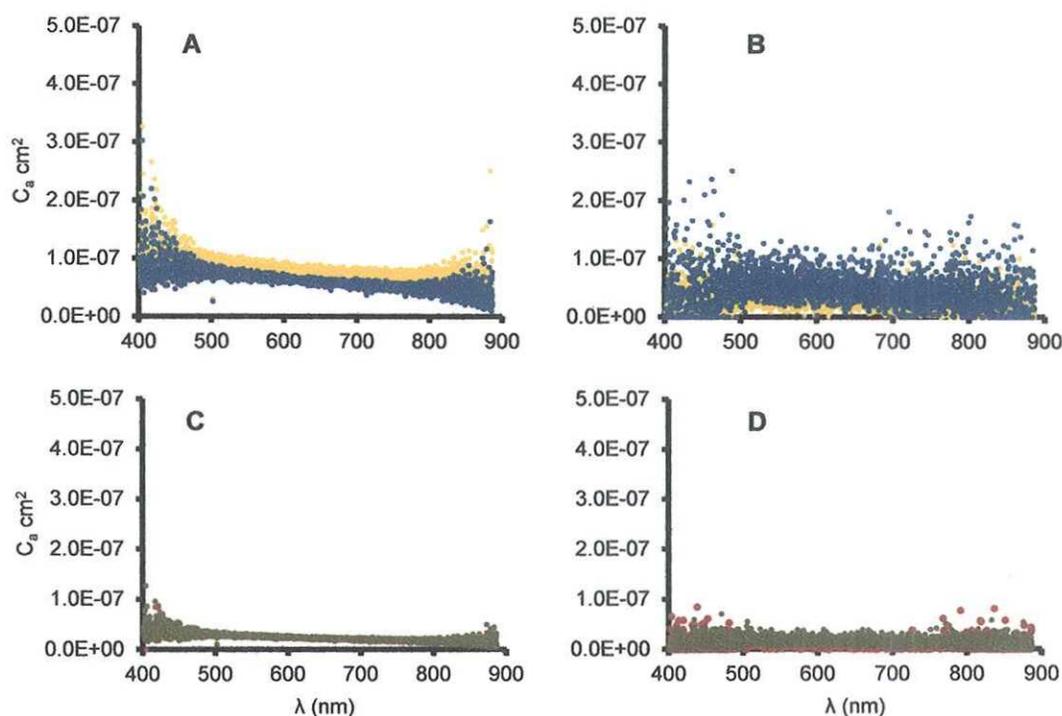
En las figuras 29, 30 y 31 se observan los valores de las secciones transversales ópticas medidas para las frústulas de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* en sus tratamientos control y con titanio, así como antes y después de someterles a tratamiento térmico.

En la figura 29 se observa que la magnitud y tendencia de la sección transversal de extinción,  $C_e$ , de las frústulas sin titanio (amarillo) de *Navicula incerta* antes del tratamiento térmico (A) fue mayor que en aquellas que sí tienen (azul). Después del tratamiento térmico (B) la tendencia de la  $C_e$  fue mayor para las frústulas con titanio que para las frústulas sin titanio, es decir la magnitud de la tendencia se invirtió después del tratamiento térmico. La  $C_e$  de las frústulas de *Nitzschia laevis* con y sin titanio (verde y rojo respectivamente) fue muy similar antes del tratamiento térmico (C), después de éste la tendencia se invirtió y fue mayor para las frústulas con titanio (D).



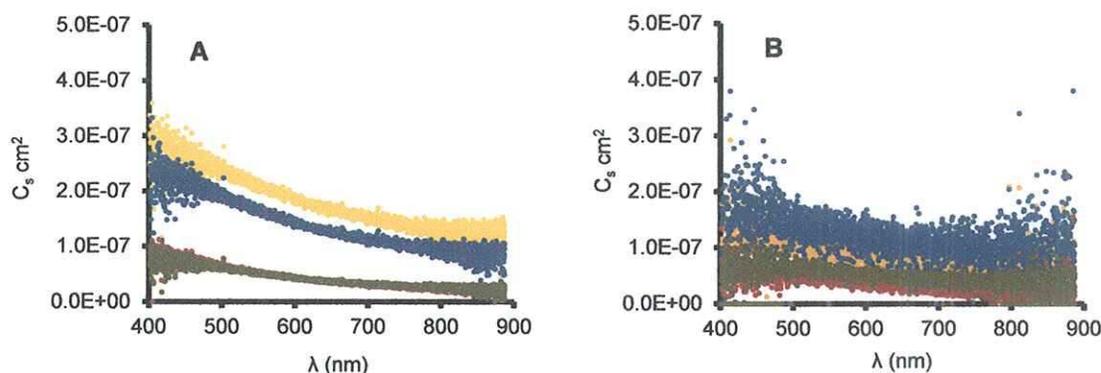
**Figura 29.** Secciones transversales de extinción,  $C_e$ , para frústulas obtenidas en los tratamientos. *Navicula incerta* antes, A, y después, B, de la cristalización térmica de sus componentes; ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio. *Nitzschia laevis* antes, C, y después, D, de la cristalización. ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio.

En la figura 30 se observan las magnitudes y tendencias de la sección transversal de absorción para las frústulas de ambas especies de diatomeas. Antes del tratamiento térmico las frústulas de *Navicula incerta* sin titanio (amarillo) absorbieron más luz que las que tienen titanio (azul). Después del tratamiento térmico (B), las tendencias se traslaparon. Por otra parte, la tendencia y magnitud de absorción en las frústulas de *Nitzschia laevis* sin titanio (rojo) y con titanio (verde) están traslapadas antes del tratamiento térmico (C) y así continúan después del mismo (D). Para todas las frústulas de las dos especies de diatomeas antes del tratamiento térmico fue observada una menor absorción cerca de los 500 nm (A y C).



**Figura 30.** Secciones transversales de absorción,  $C_a$ , para frústulas obtenidas en los tratamientos. *Navicula incerta* antes, A, y después, B, de la cristalización térmica de sus componentes; ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio. *Nitzschia laevis* antes, C, y después, D, de la cristalización. ■: Tratamiento control, sin adición de titanio; ◆: Tratamiento con titanio.

En la figura 31 se muestran las magnitudes y tendencias de las secciones transversales de esparcimiento,  $C_s$ , de las frústulas medidas antes (A) y después (B) del tratamiento térmico. Las frústulas *Navicula incerta* con titanio (azul) tienen una menor  $C_s$  respecto a las que no tienen titanio (amarillo), pero después del tratamiento térmico los valores se traslaparon y fueron ligeramente mayores para las que tenían titanio sin que esta diferencia lograra separar las tendencias. Las frústulas de *Nitzschia laevis* con titanio (verde) y sin titanio (rojo) esparcieron igual la luz antes del tratamiento térmico; después del cual la  $C_s$  resultó ligeramente mayor para las frústulas que contiene titanio, sin que esta diferencia fuera tan grande como para separar las líneas de tendencia. Antes del tratamiento térmico, todas las frústulas esparcen un poco más cerca de los 500 nm.



**Figura 31.** Secciones transversales de esparcimiento,  $C_s$ , para frústulas obtenidas en los tratamientos. En A están las frústulas de las dos especies antes de cristalización y en B las mismas ya cristalizadas. *Navicula incerta* ■ Tratamiento control y ◆ Tratamiento con titanio. *Nitzschia laevis* ■ control y ◆ Tratamiento con titanio.

En la figura 32 se observan los patrones de difracción de rayos x de ejemplares de las frústulas de las diatomeas obtenidas en los cultivos con titanio y después del tratamiento térmico. Ambas especies no mostraron picos de difracción bien definidos, sin embargo pueden observarse algunas tendencias. Para ambas especies hay un ligero pico de difracción en la posición  $25^{\circ}$  la cual está asociada con la presencia de anatasa y es mayor en *Navicula incerta* que *Nitzschia laevis*. Indicios de otros picos de difracción parecieron observarse en la posición 37, 38 48, 54, 55 y  $62^{\circ}$  para *Navicula incerta* y son casi inapreciables para *Nitzschia laevis*.

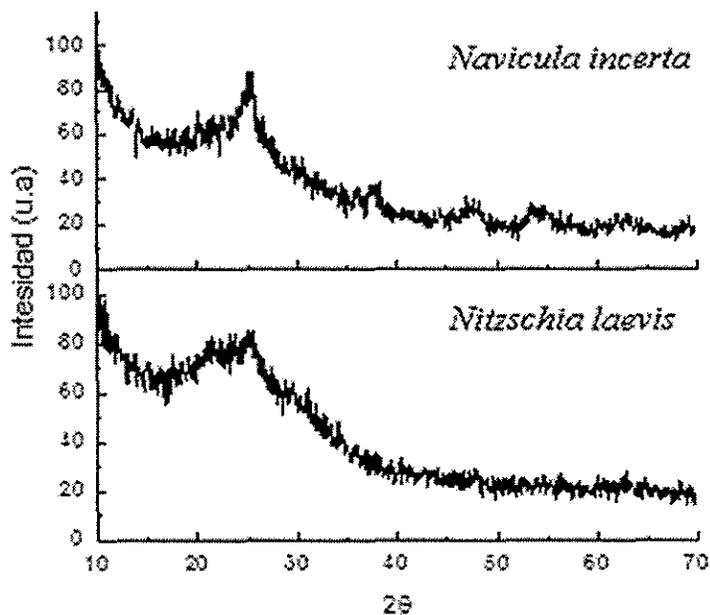


Figura 32. Difractogramas de rayos x de ejemplares de las frústulas con titanio de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis*.

## Capítulo VIII

---

### Discusión

---

#### VIII.1. Observaciones a la sección de materiales y métodos.

***Productos de los protocolos para la síntesis de  $Ti(OH)_4$  y soluciones madre para los tratamientos.*** El producto obtenido por el protocolo Jeffryes et al. (2008) resultó con contenido de sulfato de sodio, propio del proceso de precipitar el titanio (IV) oxisulfato con hidróxido de sodio. Definir un protocolo para separar el  $Ti(OH)_4$  del  $Na_2SO_4$  superaba el trabajo contemplado para esta tesis. Como era esperado, no se detectaron cristales de anatasa en el producto, debido a que la inducción térmica del  $Ti(OH)_4$  a  $TiO_2$  sería la última fase de esta tesis. Los únicos cristales que fueron detectados como componentes principales fueron los de  $Na_2SO_4$  (figura 3). La presencia del hidróxido de titanio en el de ambos protocolos puede verse en la figura 1, según lo reportado por Kotsokechagia et al. (2008).

Ante la incertidumbre del efecto que pudiera tener el  $Na_2SO_4$  en las diatomeas fue propuesto el protocolo Kotsokechagia et al (2008) del cual fue obtenido otro precipitado que fue caracterizado igual que el producto del protocolo anterior (figuras 1, 2 y 3). Con estos precipitados se realizaron soluciones ácidas en agua grado HPLC, se caracterizaron por ICP y se hizo el cálculo de molaridad para las mismas. La solución de Jeffryes et al. (2008) resultó con 325 ppm de Ti y la solución de Kotsokechagia et al. (2008) con 189 ppm de Ti, las cuales eran menores a lo esperado. Así mismo, cada una contenían 235 y 251 ppm de Na, respectivamente, el efecto biológico de estas composiciones no se tenía considerado y su incorporación al medio de cultivo implicaba un control del pH añadiendo hidróxido de sodio. Entonces se decidió modificar al menos un protocolo de obtención de solución madre de hidróxido de titanio y fue el de Kotsokechagia et al. (2008).

Las modificaciones al protocolo de Kotsokechagia que permitieron la obtención directa del  $Ti(OH)_4$  fueron: 1) obtener una solución primaria al hidroxilar 1 mL de  $TiCl_4$  en 5 mL de  $C_2H_6O$  y 2) tomar una cantidad 1 mL aforado a 30 mL de agua desionizada. Esta solución también fue caracterizada por ICP.

**Ensayos de tolerancia a etanol.** Mientras se definían las condiciones de modificación del protocolo de Kotsokechagia et al. (2008), se sabía que se utilizaría el producto de la reacción de  $TiCl_4$  con  $C_2H_6O$ , motivo por el que se consideró evaluar la tolerancia de las células a posibles concentraciones de etanol y que hasta el momento eran desconocidas. Se realizó el ensayo de tolerancia a distintas concentraciones de etanol [ensayo A), sección VI.2]. Se esperaba que si no había crecimiento, se encontrara el mismo número de células por mililitro que al inicio. Al noveno día las muestras eran colectadas y fijadas con yoduro de potasio y almacenada hasta su procesamiento. Como el número de frústulas encontradas decreció respecto a la concentración de etanol utilizada, incluso por debajo de la densidad inicial (figura 4), se pensó era debido a error experimental y se decidió repetir el ensayo. En la figura 5 se puede observar que se obtuvo la misma tendencia. Este suceso se atribuyó a la posible formación de alcóxidos de silicio, en otras palabras, debido al impedimento de la formación de la estructura de sílice o en su caso, la disolución parcial de la misma. Cabe señalar que en el fondo de los tubos de ensayo donde no hubo crecimiento se podía observar una capa delgada de un precipitado gelatinoso. En la figura 4, con excepción del control, en todas las concentraciones de etanol el número de frústulas por mililitro fue menor al inóculo, es decir no hubo crecimiento y es muy probable que se hayan disuelto pues no fueron encontradas al momento de los conteos celulares. En la figura 5, *Nitzschia laevis* es mayor al inóculo en 0.6% de etanol y *Navicula incerta* en 0.3 y 1 %. Ambas especies toleraron esta cantidad de etanol pero no crecieron como los tratamientos control. De cualquier forma la concentración de etanol utilizada en los ensayos en los que se utilizó la solución de Kotsokechagia et al. (2008) modificada fue de 0.00002 % en la concentración más alta.

**Ensayo de tolerancia a titanio.** Al realizar el primer ensayo de tolerancia a titanio [Sección VI.2, inciso B]) hubo una confusión en las especies moleculares consideradas para el cálculo de las molaridades. Las concentraciones que se pretendía evaluar en el primer ensayo de tolerancia a titanio (sección VI.2) eran 0, 1, 3, 5 y 8  $\mu\text{M}$  Ti para ambos protocolos utilizados. Para este mismo ensayo no pudo ser graficada la respuesta fotosintética; se determinó que la densidad celular utilizada no era suficiente para que emitiera señal detectable por el sensor de oxígeno empleado y a que las células solo pueden ser expuestas una vez al gradiente de luz debido al tiempo de reserva de las muestras.

**Ensayo con concentraciones mayores de titanio.** Por la facilidad de obtención de la solución madre del protocolo modificado de Kotsokechagia et al. (2008), se eligió seguir trabajando con ella para los ensayos de biomineralización. Además, como el crecimiento fue positivo en la concentración de 6.4  $\mu\text{M}$  Ti fue realizado el ensayo de crecimiento en concentraciones mayores de titanio [sección VI.2, C]). El crecimiento fue positivo en todas las concentraciones (figura 10), por lo que se decidió utilizar la mayor concentración para los ensayos de biomineralización.

**Biomineralización.** Para el primer ensayo de este apartado [ensayo D), sección VI.3] se utilizó la solución a partir de las modificaciones al protocolo de Kotsokechagia et al. (2008), la cual fue esterilizada al igual que todos los componentes inorgánicos del cultivo. Al analizar por ICP la concentración de titanio en el medio, la tendencia encontrada hizo suponer que era necesario monitorear las ppm de Ti en las primeras horas de cultivo. Por ello se diseñó el ensayo de monitoreo durante las primeras 24 horas de cultivo, sin embargo la tendencia observada fue la misma. Entonces se atribuyó un posible efecto del proceso de esterilizado sobre la solubilidad del titanio en la solución madre (K). Finalmente fue repetido el primer ensayo de biomineralización, en esta última ocasión utilizando una solución madre (K) sin esterilizar e incluyendo las primeras

horas de cultivo para el monitoreo de la concentración de los silicatos y el titanio en el medio, así como la densidad celular.

Otro motivo para repetir el ensayo D) fue que la densidad de células utilizada para graficar la liberación de oxígeno no emitió señal suficiente y por ello solo se muestran los resultados del último ensayo de la sección VI.3 en donde se utilizó un concentrado de 500 mL de cultivo, de cualquier forma los resultados son normalizados a moles de oxígeno producidos por célula.

**Propiedades ópticas.** Aunque se obtuvieron frústulas de ambas especies del primer y tercer ensayo de biomineralización, solo se reportan las secciones transversales del último, puesto que fue la repetición más completa en cuanto a resultados, es decir, con más elementos para discutir todo el proceso fisiológico y propiedades ópticas.

## VIII.2. Fisicoquímica y óptica de las estructuras formadas.

**Solo se detectó la presencia de la fase anatasa.** En la figura 28 se puede observar que, ni en los controles ni en los tratamientos se detectó la presencia de la fase anatasa. Aunque después de la inducción térmica fue posible detectar el  $Ti(OH)_4$  puesto en los cultivos de ambas especies. Para este caso se ha reportado su patrón de esparcimiento Raman entre los 100 y los 200  $cm^{-1}$  [Hyun et al. (2004) e Ivanda et al. (1998)]. No obstante, la posible presencia de  $TiO_2$  en las frústulas de ambas especies proviene del  $Ti(OH)_4$  añadido en sus cultivos. Por lo que se tiene certeza de que existe anatasa en ellas. Sin embargo para el caso de la sílice, solo se puede inferir que está en su fase cristalina (óxido). De donde surgió la duda de si se formó un material de óxidos en fases segregadas o un material de óxidos mixtos. En los espectros Raman de la figura 28 C, se puede apreciar la huella de anatasa. Sin embargo, debido a que la calibración del equipo se realiza con un portaobjetos de vidrio, esto evita la detección de silicatos o algún óxido de silicio en las muestras por esta técnica. En los difractogramas de rayos x (figura

32) sigue sin poderse detectar las difracciones características de estos óxidos, aunque si algunas tendencias, como una elevación de la intensidad de difracción en la posición 25, 37, 48, 54, 55 y 62  $2^\theta$  para *Navicula incerta*. Mismos que son casi inapreciables para el caso de *Nitzschia laevis*. Un patrón de difracción mucho más definido en estas posiciones  $2^\theta$  fue reportado para nanopartículas de anatasa por Kotsokochagia et al. (2008) y también corresponde a la tarjeta cristalografía 00-021-1272 2011 del "International Centre for Diffraction Data". Si los silicatos de las frústulas hubieran sido inducidos a óxidos de silicio cristalinos de gran tamaño, deberían de permitir su detección por difracción de rayos x. Sin embargo, esto no se detectó. Díaz de León-Hernández (2007) tampoco reporto la emisión en rayos x de estos óxidos al sintetizar materiales basados en óxidos de silicio, aluminio, titanio y zirconio, fenómeno que atribuyó a la formación de óxidos mixtos que solo difractaban rayos x cuando fueron hechas mediciones en bajo ángulo. De modo que las tendencias de los espectros de difracción observadas en la figura 32 pueden deberse a tres posibles razones: 1) que en las frústulas hubo formación térmica de óxidos mixtos de  $TiO_2SiO_2$  lo cual según la literatura conduce a un espectro de difracción amorfo, 2) que se presentó formación de fases segregadas  $TiO_2-SiO_2$  pero de tamaños menores al límite de detección de la técnica, 3) que el tratamiento térmico utilizado apenas permitió el inicio del crecimiento de las fases cristalinas del óxido de silicio y óxido de titanio. Cualquiera o varias de estas tres opciones serían la razón de no obtener difracciones en los espectros sin embargo, la detección de la fase anatasa sería posible por espectroscopía Raman, lo que cual si ocurrió.

***La estructura de las frústulas de Navicula incerta y Nitzschia laevis no presentaron deformaciones al ser cultivadas con titanio.*** Cuando las diatomeas se encuentran en ambientes con altas concentraciones de metales pesados tienden a eliminarlos del medio acuático y a acumularlos de forma irregular en sus frústulas. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las frústulas muestran que la incorporación del titanio es regular en la frústula.

Debido al proceso de limpieza y preparación de las frústulas se puede decir que el titanio en ellas no es un fenómeno de adsorción, sino una incorporación en las estructuras (figuras 15 y 23).

**El índice  $g\ Ti / 100g\ SiO_2$  demuestra que el titanio es fijado metabólicamente en la fracción inorgánica celular, sin embargo esta cantidad de titanio no alcanza a modificar en gran medida las secciones transversales de las frústulas.** En el tercer ensayo de biomineralización, al parecer, dado que la incorporación de titanio en las frústulas de *Nitzschia laevis* es mayor que en las frústulas de *Navicula incerta* (11.8 vs. 10.0 gr) era de esperarse que la  $C_s$  en *Nitzschia laevis* fuera mayor que en *Navicula incerta*, pero es lo contrario, hay más esparcimiento en *Navicula incerta*. Conforme a esto y dado que las ornamentaciones de las estructuras formadas por ambas especies es similar, pudiera ser pensado que la forma rectangular y el mayor tamaño de *Navicula incerta* respecto a la forma ovalada y más pequeña de *Nitzschia laevis* tiene mayor efecto que la diferencia en casi 2 g de Ti en cada 100 de óxido de silicio en las frústulas. Es posible que esta cantidad de titanio tenga poca interacción con el rango de luz visible utilizada y por ello las tendencias y magnitudes muy similares de las gráficas de las secciones transversales con y sin titanio. El índice en el que se eligió reportar el grado de acumulación de titanio en las frústulas permite hacer una comparación con los resultados del trabajo realizado por Jeffryes et al. (2008) que es el antecedente principal. Pero en realidad el titanio acumulado por frústula es muy pequeño, siendo 0.0014mg de Ti en 3 mg de muestra en *Navicula incerta* y 0.0016 mg de Ti en 3 mg de muestra de *Nitzschia laevis*.

**Las frústulas de silicatos y silicatos-titanio obtenidas y antes de la cristalización disminuyen su sección transversal de absorción y aumentan la sección transversal de esparcimiento en las longitudes de onda de 500 nm.**

### VIII.3. Fisiología celular de las diatomeas en los tratamientos con y sin titanio.

**Mientras que pudo ser observado que la concentración de silicio soluble decrece conforme la población celular aumenta, solo se pudo confirmar que las células incorporan titanio en sus frústulas sin llegar a especificar el momento crítico de incorporación.** Dado que no se tenía certeza del porqué las tendencias del titanio en todos los ensayos de biomineralización (figuras 12, 17 y 19) y debido a la naturaleza propia de las interacciones químicas del elemento con los componentes biogénicos e inorgánicos del sistema de cultivo y de procesamiento, se determinó que la fracción soluble detectada en las muestras filtradas fue menor a 0.5 ppm, siendo la concentración máxima esperada 2.21 ppm. Este límite de detección fue calculado como apoyo explicativo para evitar atribuir el efecto a una variable equivocada. Fue utilizado el método según Nölte (2003) haciendo mediciones de diluciones seriadas con los estándares y agua desionizada, tomando en cuenta la desviación estándar del equipo de ICP para detectar la energía de desintegración emitida por el titanio.

**Las diatomeas bentónicas crecen en concentraciones de titanio mayores a las reportadas en la literatura.** Este trabajo es el primer antecedente para *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* cultivadas en altas concentraciones de titanio. Estas concentraciones son menores a las máximas reportadas para *Pinnularia* sp. en el trabajo de Jeffryes et al. (2008) [46  $\mu$ M vs. 150  $\mu$ M], que es el principal antecedente de esta investigación. Sin embargo, las condiciones ensayadas permitieron obtener mayor concentración de titanio en las frústulas de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* (10.0 y 11.8 gTi/100g SiO<sub>2</sub>, respectivamente) respecto a los 2.3 gTi/100g SiO<sub>2</sub> evaluados para *Pinnularia* sp.

**La respuesta de liberación de oxígeno de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta* es similar en los cultivos con y sin titanio, demostrando que las células están saludables y no disminuyen su capacidad fotosintética debido a la**

**presencia de hidróxido de titanio en el medio de cultivo.** En la figura 22 B se puede observar que las líneas de tendencia polinómica que representan la liberación de oxígeno por *Navicula incerta* son distintas entre el tratamiento con titanio y el control. Sin embargo, existe traslape de las desviaciones de los datos. Pero si se hace la comparación de puntos equivalentes entre tratamientos la decisión general es no hay diferencia ( $P \geq 0.96$ ). Del análisis de la tabla I, se puede inferir que la incorporación de titanio en el medio no implica una actividad fotosintética mayor dado que tanto la eficiencia fotosintética,  $\alpha$ , es función de las reacciones luminosas, como la tasa máxima fotosintética,  $F_{max}$ , son similares. El hecho de que la cantidad de energía necesaria, medida como índice de saturación lumínica  $I_k$ , para alcanzar la tasa máxima sea mayor en uno de los tratamientos se debe a que esta variable es denso-dependiente. Es decir, todos los parámetros están normalizados por célula, pero la potencia de luz necesaria para que todas las células en la cámara fotosintética lleguen a ese punto es mayor en uno de los tratamientos.

**El origen de la pared celular mineralizada con silicatos podría estar ligada a un sistema más eficiente de utilización del espectro de luz disponible en el ambiente.** Las frústulas de las diatomeas están hechas de silicatos de estructura amorfa, por ejemplo, para *Navicula incerta*, en las condiciones naturales (no cristalizadas, figura 31 A), las frústulas sin titanio esparcen más luz que las del tratamiento con titanio y es lo contrario en el caso de la sección transversal de absorción (figura 30 A). De especial interés es este fenómeno en las longitudes de onda cercanas en las que absorben los principales pigmentos de las diatomeas bentónicas (~500 nm). En otras palabras, debido al mayor esparcimiento ( $C_s$ ) y a la menor absorción ( $C_a$ ) de la luz por las frústulas en la región de los 500 nm pudieron haber propiciado una mayor disponibilidad de luz cosechable por los pigmentos que absorben en esta región (Buchheim 2011). Los pigmentos que absorben en esta región son característicos y distintivos de las diatomeas. Mientras que esta región de luz significa un riesgo de fotoinhibición para las

diatomeas planctónicas (Bailleul et al. 2010), menos silificadas que las bentónicas, las frústulas parecen propiciar la disponibilidad de energía que llega hasta los sistemas pigmentarios y contribuiría a explicar la amplia distribución en distintas profundidades.

Desde el punto de vista evolutivo no se sabe por completo el por qué surgió el exoesqueleto de las diatomeas. Sin embargo, las teorías lo atribuyen a ventajas de cambios de densidad para la flotabilidad, protección y migración como respuesta a cambios en los nutrientes del ambiente y no ha sido planteada la idea desprendida de las secciones transversales ópticas de estas estructuras.

## Capítulo IX

---

### Conclusión

---

Con cultivos con hidróxido de titanio de *Navicula incerta* y *Nitzschia laevis* aisladas de la región de Baja California en concentraciones de 46 $\mu$ M de Ti se lograron obtener materiales que tienen los requerimientos básicos y de potencial uso en optoelectrónica. Para ello se obtuvo un método de obtención de Ti(OH)<sub>4</sub> fácil, rápido y que no requirió de gran control para que las diatomeas puedan crecer al ser adicionado al medio de cultivo. El contenido máximo de titanio medido en gTi/g SiO<sub>2</sub> encontrado fue de 10.0 para *Navicula incerta* y 11.8 *Nitzschia laevis*. Dicho acoplamiento de materiales no causa deformaciones en la estructura general, ni en las ornamentaciones de la frústula. Las especies amorfas de estos semimetales incorporados durante el crecimiento celular fueron inducibles a cristales de TiO<sub>2</sub> mediante tratamiento térmico detectables en la región de 100 a 200 cm<sup>-1</sup> de frecuencia Raman y no emitieron señal de difracción de rayos x. Esta composición química no modificó de forma significativa las secciones transversales ópticas medidas en luz de 400 a 880 nm para las fases amorfas y cristalinas para una misma especie pero sí entre especies. La evidencia indica que con el cultivo de ambas especies en las condiciones ensayadas se pueden obtener materiales mesoestructurados a base de silicatos y TiO<sub>2</sub> de morfologías, composición química y propiedades ópticas especie-específicas. La aplicación directa de estos materiales en distintos productos y procesos requerirá una caracterización mayor de sus propiedades eléctricas y químicas.

## Capítulo X

---

### Recomendaciones

---

Realizar análisis moleculares para ver los genes que se expresan las diatomeas durante su cultivo con titanio y determinar si son los mismos o hay diferencia respecto a los que se expresan en condiciones de cultivo solo con silicatos.

Identificar los pigmentos cuyas absorbancias estén entre los 500 y 600 nm, así como medir las secciones transversales ópticas de las frústulas en este intervalo de longitudes de onda.

Medir las secciones transversales con las frústulas obtenidas pero en otras longitudes de onda, por ejemplo el rango UV de la luz solar.

Determinar la concentración máxima tolerable de titanio de *Nitzschia laevis* y *Navicula incerta*.

Trabajar con sistemas de cultivo que permitan obtener mayor cantidad de biomasa para no comprometer el sistema de cultivo ya que el tipo de muestreo necesario es sin reposición.

Incluir en el diseño experimental de obtención de cinéticas de biomineralización un doble control para los ensayos, uno de cultivo sin titanio y otro sin células.

Definir el efecto quelante de las sustancias poliméricas extracelulares de las diatomeas en el cultivo con titanio y sin titanio.

Definir el origen del cambio de coloración de las muestras de *Navicula incerta* después del tratamiento térmico.

---

Analizar por microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM por sus siglas en inglés) la distribución de los elementos en las frústulas obtenidas en los cultivos con titanio.

Medir las propiedades dieléctricas de las frústulas obtenidas en los cultivos con y sin titanio.

Realizar mediciones de secciones transversales de las partículas en medios inhomogéneos experimentales y realizar simulaciones de algunas de las aplicaciones.

Determinar si las estructuras contienen fases segregadas de  $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$  o son cristales mixtos.

## Capítulo XI

---

### Literatura citada

---

ALGAE BASE. 2010. Bacillariophyceae [Información en línea] Disponible en: <http://algaebase.org/browse/taxonomy/detail/?taxonid=4337&-session=abv4:BDD66FF71194a0D89BLnS14CFB8E> [Consultado en julio de 2010].

Baes CF y RE Mesmer. 1976. The hydrolysis of cations. Citados por C Jeffryes et al. 2008. *American Chemical Society*, 2(10):2103-2112.

Bailleul B, Rogato A, Martino A, Coesel S, Cardol P, Bowler C, Falciatore A y Finazzi G. 2010. An atypical member of the light-harvesting complex stress-related protein family modulates diatom responses to light. *PNAS* [Documento en línea] Disponible en: <http://www.pnas.org/content/early/2010/09/30/1007703107.full.pdf> [Consultado en septiembre de 2011].

Bao Z, MR Weatherspoon, S Shian, Y Cai, PD Graham, SM Allan, G Ahmad, MB Dickerson, BC Church, Z Kang, HW 3<sup>rd</sup> Abernathy, CJ Summers, M Liu y KH Sandhage. 2007. Chemical reduction of three-dimensional silica micro-assemblies into microporous silicon replicas. *Nature*, 446(7132):172-5.

Brutchey RL y DE Morse. 2008. Silicatein and the translation of its molecular mechanism of biosilification into low temperature nanomaterial synthesis. *Chemical Reviews*, 108(11):4915-4934.

---

- Buchheim J. 2011. Oceanography. Water, seawater and ocean circulation and dynamics. [Información en línea] Disponible en: <http://www.marinebiology.org/oceanography.htm> [Consultado en agosto de 2011].
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:249-306.
- Correa-Reyes JG, MP Sánchez-Saavedra, DA Siqueiros-Beltrones y N Flores-Acevedo. 2001. Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions. *Journal of Shellfish Research*, 20(2):603-610.
- De Stefano L, A Lamberti, L Rotiroti y M De Stefano. 2008. Interfacing the nanostructured biosilica microshells of the marine diatom *Coscinodiscus walleisii* with biological matter. *Acta Biomaterialia*, 4(1):126-130.
- Díaz de León - Hernández JN. 2007. Análisis de los efectos producidos por la variación del soporte en el sistema NiW usado en la HDS de DBT. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 137pp.
- Dubinzky Z, R Matsukawa e I Karube. 1994. Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*, 2:61-65.
- Figuerola LF, J Mercado, C Jiménez, S Salles, J Aguilera, MP Sánchez-Saavedra, M Lebert, DP Häder, O Montero y L Lubián. 1997. Relationship between biooptical characteristics and photoinhibition of phytoplankton. *Aquatic Botany*. 59(3):237-251.
- Fogg GE y NJ Thake. 1987. Algal Cultures and Phytoplankton Ecology. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.

- Guillard RL y JH Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detenula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*, 8:229-239.
- Hyun CC, MJ Young y BK Seung. 2004. Size effects in raman spectra of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Vibrational Spectroscopy*, 37:33-38.
- Ivanda M, S. Musić, M Gotić, A Turković, AM Tonejc y O Gamulin. 1998. The effect of crystal size on the raman spectra of nanophase TiO<sub>2</sub>. *Journal of Molecular Structure*, 480-481:641-644.
- Jeffryes C, T Gutu, J Jiao y GL Rorrer. 2008. Metabolic insertion of nanostructured TiO<sub>2</sub> into the patterned biosilica of the diatom *Pinnularia* sp. by two-stage bioreactor cultivation process. *American Chemical Society*, 2(10):2103-2112.
- Kind L. 2009. Template directed synthesis of highly organized functional biomimetic silica nanostructures. Tesis de Doctorado de la Universidad de Basilea. Suiza. 96 pp.
- Kröger N, S Lorenz, E Brunner y M Sumper. 2002. Self-Assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. *Science*, 298:584-586.
- Kotsokechagia T, F Cellesi, A Thomas, M Niederberger y N Tirelli. 2008. Preparation of ligand-free TiO<sub>2</sub> (anatase) nanoparticles through a nonaqueous process and their surface functionalization. *Langmuir*, 24:6988-6997.
-

- Kuwata A, T Hama y M Takahashi. 1993. Ecophysiological characterization of two life forms, resting spores and resting cells, of a marine planktonic diatom, *Chaetoceros pseudocurvisetus*, formed under nutrient depletion. *Marine Ecology Progress Series*, 102:245-255.
- Lain RM. 2005. Nanobuilding blocks based on the  $[\text{OSiO}_{1.5}]_x$  (x 5 6, 8, 10) Octasilsesquioxanes. *Journal of Materials Chemistry*, 15:3725-3744.
- Martin-Jezequel V, M Hildebrand y MA Brzezinski. 2002. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of Phycology*, 36:821-840.
- McConnaughey T. 1989. Biomineralization mechanism. En: RE Crick (Ed.) *Origin, evolution, and modern aspects of biomineralization in plants and animals*. Plenum Press, New York. 1989. 57-73 pp.
- Mihi A, ME Calvo, JA Anta y H Míguez. 2007. Spectral Response of Opal-Based Dye-Sensitized Solar Cells. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(1):13-17.
- Milligan AJ y FMM Morel. 2002. A proton buffering role for silica in diatoms. *Science*, 297:1848-1850.
- Nelson DM, P Tréguer, MA Brzezinski, A Leynaert y B Quéguiner. 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycle*, 9(3):359-372.
- Nölte J. (2003). *ICP Emission Spectrometry. A practical guide*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. GaA, Weinheim. Germany. 267 pp.

- Paniagua-Michel J, Bückle-Ramírez LF, Granados-Machuca C y DH Loyola-Salinas. 1989. Manual de Metodologías y Alternativas para el Cultivo de Microalgas. Segunda Edición. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 78 pp.
- Parkinson J y R Gordon. 1999. Beyond micromachining: The potential of diatoms. *Trends in Biotechnology*, 17:190-196.
- Parsons, T.R., Y. Maita y C.M Lalli, 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Oxford, Pergamon Press. 173 pp.
- Platt T. 1981. *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, 210:346 pp.
- Raven JA y AM Waite. 2004. The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytologist*, 162(1):45-61.
- Riley JP y I Roth. 1971. The distribution of trace elements in some species of phytoplankton grown in culture. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51:63-72.
- Rothenberger G, P Comte, M Grätzel. 1999. A contribution to the optical design of dye-sensitized nanocrystalline solar cells. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 58:321-336.
- Sahai N. 2003. Calculations of  $^{29}\text{Si}$  NMR shifts of silicate complexes with carbohydrates, aminoacids, and multicarboxylic acids: Potential role in biological silica utilization. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2(68):227-237.
-

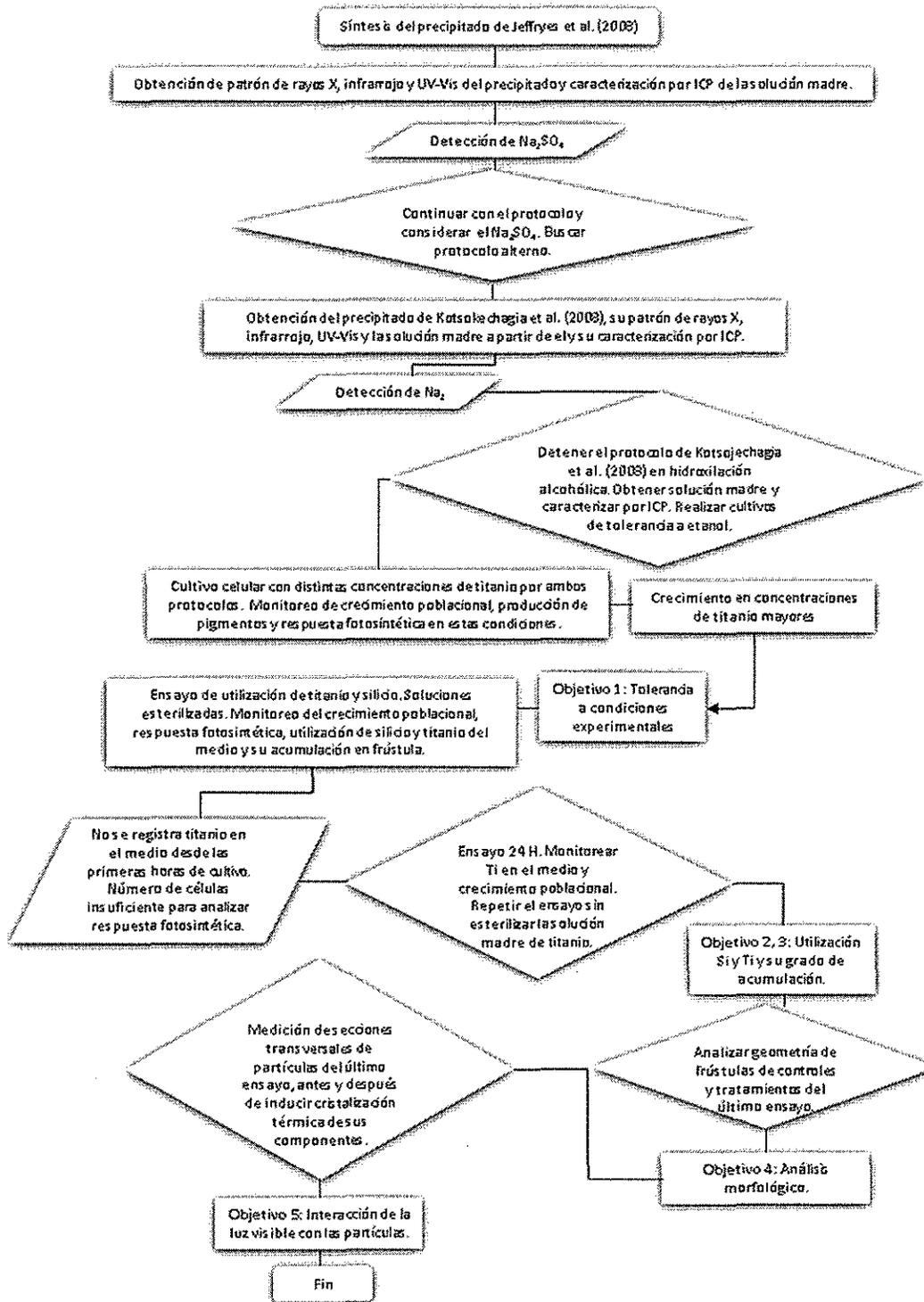
- Sanchez C, B Julián, P Belleville y P Popall. 2005. Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites. *Journal of Materials Chemistry*, 15:3559-3592.
- Sánchez-Saavedra MP y D Voltolina. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1078(1):39-44.
- Sandhage KH, MB Dickerson, PM Huseman, MA Caranna, JD Clifton, TA Bull, TJ Heibel, WR Overton, MEA Schoenwaelder. 2002. Novel, bioclastic route to self-assembled, 3D, chemically tailored meso/nanostructures: shape-preserving reactive conversion of biosilica (diatom) microshells. *Advanced Materials*. 14 (6):429-433.
- Santhiya D, Z Burghard, C Greiner, LPH Jeurgens, T Subkowski y J Bill. 2010. Bioinspired deposition of TiO<sub>2</sub> thin films induced by hydrophobins. *Langmuir*, 26(9):6494-6502.
- Sokal, R y FJ Rohlf 1979. *Biometría: Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H. Blume Ediciones, Barcelona. 845 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volumen and optical density. 321-344. En Stein, J.R., ed. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge: Cambridge University Press. 448 pp.
- Sugimoto T, X Zhou, A Muramatsu. 2002. Synthesis of uniform anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles by gel-sol method.1. Solution Chemistry of Ti(OH)<sub>n</sub><sup>(4-1)+</sup> complexes. Citados por por C Jeffryes et al. 2008. *American Chemical Society*, 2(10):2103-2112.

Terán E, R Méndez, S Enriquez y R Iglesias-Prieto. 2010. Multiple light scattering and absorption in reef-building corals. *Optical Society of America, OCIS codes: 000.1430,010.1030,170.6935,170.5280*

Umemura K, Y Gao, T Nishikawa. 2010. Preparation of photocatalyst using diatom frustules by liquid phase deposition method. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10:4883-4888.

Vogel R, P Meredith I, Katrini, M Harvey, JD Riches, A Bishop, N Heckenberg, M Trau y H Rubinsztein-Dunlop. 2003. Mesoporous dye-doped titanium dioxide for micro-optoelectronic applications. *Chemphyschem*, 4: 595-603.

## Anexos



Anexo 1. Diagrama general del procedimiento experimental en este trabajo de tesis.