

TESIS DEFENDIDA POR
Karla Paulina Alejo González
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. José de Jesús Paniagua Michel
Director del Comité

Dr. Jorge Olmos Soto
Miembro del Comité

Dr. Jaime Färber Lorda
Miembro del Comité

Dr. Miguel Ángel Huerta Díaz
Miembro del Comité

Dr. Rufina Hernández Martínez.
*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias en Ciencias de la Vida.*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

16 de diciembre de 2010

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN CIENCIAS DE LA VIDA**

**BIOPROSPECCIÓN DE MICROALGAS PARA LA REMOCIÓN DE METALES
PESADOS DE AGUAS RESIDUALES Y AMBIENTES COSTEROS: UNA
APROXIMACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE METALOTIONINAS CLASE III.**

TESIS

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

Presenta:

Karla Paulina Alejo González

Ensenada, Baja California, México, diciembre de 2010.

RESUMEN de la tesis de **Karla Paulina Alejo González**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Diciembre de 2010.

BIOPROSPECCIÓN DE MICROALGAS PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS DE AGUAS RESIDUALES Y AMBIENTES COSTEROS: UNA APROXIMACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE METALOTIONINAS CLASE III.

Resumen aprobado por:

José de Jesús Paniagua Michel
Director de Tesis

El incremento descontrolado y alarmante de metales pesados en el ambiente durante las últimas décadas denota la necesidad de implementar estudios y acciones de mitigación y biorremediación. De los metales analizados: cobre, cadmio, hierro, manganeso y zinc, a partir de los elutriados (0%, 50% y 100% v/v de efluente y agua de mar), se concluye que existió el siguiente orden de remoción, de acuerdo a la cantidad de metal: Mn>Zn>Cu. Los porcentajes de remoción (PR), para los metales mencionados fueron: 92.7 ± 5.5 , 67.7 ± 5.8 , 52.3 ± 3.5 respectivamente en 24 horas, para las microalgas representativas del cauce (*Scenedesmus* sp.) del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales, El Gallo. Para el sitio del Sauzal, se determinó que el complejo *Navicula* y *Pseudo-Nitzschia* exhibió de acuerdo a la cantidad de metal removida, el orden siguiente para 0% elutriado: Cu> Mn>Zn> Fe, lo que equivale a un PR de 60.1 ± 4.2 , 37.5 ± 4.3 , 44.3 ± 12.3 , 7.0 ± 3 de manera respectiva; para 50% elutriado: Mn>Cu >Zn> Fe, exhibieron PR de 94.8 ± 0.7 , 72.7 ± 2.0 , 44.2 ± 6.1 , 27.2 ± 1.6 y finalmente, para 100% elutriado: Cu> Zn>Mn> Fe, representaron PR de 79.0 ± 2.2 , 24.6 ± 7.7 , 24.1 ± 4.7 , 0 respectivamente, después de 48 horas. El crecimiento y la biosíntesis de pigmentos corroboraron la capacidad y potencial microalgal para la biorremoción de metales así como en procesos combinados de biorremediación. Los resultados de biorremoción evidenciaron la presencia de transporte activo de los metales hacia el interior de las células. A pesar de que las concentraciones de metales inicialmente fueron las requeridas para inducir la síntesis de la glutatión reductasa y de las metalotioninas clase III, el soporte de inmovilización pudo contribuir en la disminución de las concentraciones inductoras. En este trabajo, no se corroboró la existencia de mecanismos de biosíntesis de metalotioninas, en las especies y fenotipos microalgales aislados. La combinación del soporte de poliuretano y la biomasa microalgal inmovilizada favorecieron la formación de biopelículas y la biorremoción a nivel multimetal.

Palabras Clave: poliuretano, inmovilización, microalgas, metales pesados, biorremoción, metalotioninas.

ABSTRACT of the thesis presented by **Karla Paulina Alejo González** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México. December 2010.

BIOPROSPECTING MICROALGAE FOR REMOVAL OF HEAVY METALS FROM WASTE WATER AND COASTAL ENVIRONMENTS: AN APPROACH FOR DETECTION OF CLASS III METALLOTHIONEIN.

The alarming and uncontrolled increase of heavy metals in the environment during the last decades, shows the need to implement studies and initiatives of mitigation and bioremediation. In this study, it was concluded that the analyzed heavy metals: copper, cadmium, iron, manganese and zinc from the elutriated (0%, 50% y 100% v/v of effluent and seawater), exhibited the following removal pattern of metals: Mn>Zn>Cu, while the removal percentages (RP) were 92.7 ± 5.5 , 67.7 ± 5.8 , 52.3 ± 3.5 respectively in 24 hours for microalgae (*Scenedesmus* sp.) representative of the Gallo effluent causeway (*cauce*) of the municipal wastewater treatment plant. In the case of the Sauzal, it was determined that the complex *Navicula* and *PseudoNitzschia* showed, according to the amount of metal removed, the following order for 0% elutriated: Cu> Mn>Zn> Fe, corresponding to RP of 60.1 ± 4.2 , 37.5 ± 4.3 , 44.3 ± 12.3 , 7.0 ± 3 ; for 50% elutriated: Mn>Cu >Zn> Fe, and the following removal percentage: 94.8 ± 0.7 , 72.7 ± 2.0 , 44.2 ± 6.1 , 27.2 ± 1.6 and finally, for 100 elutriated: Cu> Zn>Mn> Fe, were equivalent to RP of 79.0 ± 2.2 , 24.6 ± 7.7 , 24.1 ± 4.7 , 0 respectively for the elutriated 0%, 50% y 100% after 48 hours. Cell growth and pigment biosynthesis corroborated the capacity and potential of microalgae for metals bioremoval in combined processes of bioremediation. The removal results evidenced the presence of active transport of metals into the microalgal cells. In spite that initial metals concentrations were the required to induce biosynthesis of glutathione reductase and metallothioneins class III, the immobilizing support could contribute to diminish the inducing concentrations. We were unable to prove the existence of biosynthetic mechanisms of metallothioneins in the isolated microalgal species and phenotypes. The development of biofilms and bioremoval at multimetal level were enhanced by the immobilized microalgal biomass in combination with the polyurethane support.

Keywords: polyurethane, immobilization, microalgae, heavy metals, biorremotion, metallothioneins.

Dedicatorias

A Oscar.

A mí querida familia: mis papás Aurora y Gerardo; mis hermanas Mónica y Miriam, mi cuñado Jorge Simón, y a mis petites Lucy, Fa y Mely.

Agradecimientos

A CICESE como institución receptora de mis estudios y al CONACYT por haberme otorgado la beca 269074.

A Dr. José de Jesús Paniagua Michel por encausar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Olmos Soto, Dr. Jaime Färber Lorda y Dr. Miguel Ángel Huerta Díaz por coadyuvar en el desarrollo de mi trabajo como miembros del comité de tesis.

A los técnicos:

M. en C. Rosalía Contreras Flores, equipo de laboratorio en general, DBEA, CICESE.

M. en C. Eduardo Roberto Morales Guerrero, HPLC, DBEA, CICESE.

Ocean. Arturo Siqueiros Valencia, Espectroscopia de absorción atómica, IIO, UABC.

Ing. Israel Gradilla Martínez, micrografías de barrido electrónico (MBE), CNyN, UNAM.

Ing. Luis Carlos Gradilla Martínez, (MBE), Ciencias de la tierra CICESE.

Al Dr. David Hilario Covarrubias Rosales por el apoyo y las facilidades brindadas.

A las Doctoras Pilar Sánchez Saavedra, Meritxchel Riquelme Pérez y Edna Sánchez Castrejón y al Dr. José Luis Stephano Hornedo por haberme convidado equipo y material.

A mis amigos, por la gentileza de su compañía y amistad: Giuly, Efra, Javier, Puebla y Carmen por su apoyo en el laboratorio, a Immitis, al Nacho, a los Ixtepecanos; A la Colpachas, Efrén, Olaya y el resto de los cuates de aguas por acordarse de uno.

A Adriana Mejía, Citlali Romero, Norma Fuentes, Dolores Sarracino e Ivonne Best por su apoyo en los trámites administrativos durante toda mi estancia en CICESE.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	xi
Capítulo I. Introducción.....	1
Capítulo II. Materiales y métodos.....	9
II. 1. Bioprospección de microalgas.....	9
II. 2. Aislamiento y cultivo de microalgas.....	10
II. 3. Identificación de microalgas.....	11
II. 4. Inmovilización celular.....	15
II. 5. Preparación de elutriados.....	17
II. 6. Bioensayo de remoción de metales pesados, inducción de MT III y GSH.....	18

CONTENIDO (continuación)

	Página
II. 6. 1. Remoción de metales pesados e inducción de MT III.....	19
II. 6. 2. Determinación de MT III y GSH.....	21
Capítulo III. Resultados.....	25
III. 1 .Bioprospección microalgal.....	25
III. 1. 1. Aislamiento y cultivo de microalgas	25
III. 2. Selección de especies para los bioensayo.....	31
III. 2. 1. Inmovilización celular.....	31
III. 2. 2. Crecimiento de células libres contra inmovilizadas, efecto del soporte.....	33
III. 2. 3. Características de las células inmovilizadas.....	35
III. 3. Bioensayos de remoción de metales pesados.....	44
III. 3. 1. Características de los medios.....	44
III. 3. 2. Remoción de metales	46
III. 3. 3. Bioabsorción.....	58
III. 3. 4. Absorción total (soporte + microalga).....	59
III. 3. 5. Biorremoción microalgal.....	61
III. 3. 6. Identificación MT III y GSH.....	64
Capítulo IV. Discusiones y conclusiones.....	68
Referencias bibliográficas.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general de la desintoxicación de metales pesados mediado por metalotioninas clase III (MT III) en microalgas.....	8
2	Ubicación de los sitios de muestreo. Dentro de los círculos se muestran los lugares de colecta de sedimento, microalgas y agua...	10
3	Fotografías con microscopio óptico con objetivo de 100X de las microalgas <i>cauce</i> (a), y <i>playa</i> (b).....	26
4	Imágenes de microscopía óptica con objetivo 100X de los tipos de diatomeas <i>sauzal</i>	26
5	Perfil pigmentario (HPLC) extraído con acetona y metanol al 100% (v/v) de las microalgas <i>cauce</i> donde predominaron las Clorofitas.....	28
6	Perfil de pigmentos determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las microalgas <i>cauce</i> extraídos con acetona al 100% (v/v) donde se observa predominancia de pigmentos característicos de cianobacterias.....	29
7	Pigmentos determinados mediante HPLC de las microalgas <i>cauce</i> . Los pigmentos se extrajeron selectivamente con acetona o metanol al 100% (v/v).....	29
8	Perfil pigmentario de las microalgas <i>playa</i> , obtenido mediante HPLC. Los pigmentos se extrajeron con acetona o metanol al 100% (v/v).....	30
9	Perfil pigmentario detectado mediante cromatografía líquida de alta resolución de las microalgas <i>sauzal</i> . Las extracciones de los diferentes pigmentos se realizaron con acetona o metanol al 100% (v/v).....	31
10	Soportes inoculados con microalgas de El Sauzal (esquina superior izquierda) y del cauce (esquina superior derecha).....	32

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
11	Efecto del volumen del soporte en la concentración de las microalgas aisladas del Sauzal cultivadas, inmovilizadas y libres.	34
12	Efecto del volumen del soporte en la concentración de las microalgas <i>cauce</i> cultivadas, tanto inmovilizadas como de manera libre.....	35
13	Fotografía en microscopio óptico a 100X de las diatomeas que se inmovilizaron para los ensayos de remoción de El sauzal.....	36
14	Fotografía en microscopio óptico a 100X de las microalgas del cauce, en su mayoría <i>Scenedesmus</i> sp. (parte superior).....	36
15	Micrografía de barrido electrónico de las diatomeas aisladas de El Sauzal. a) <i>Navicula</i> sp.; b y c) <i>Nitzschia</i> sp.....	38
16	Micrografía de barrido electrónico de microalgas de El Sauzal inmovilizadas a) diatomeas inmovilizadas en poliuretano a 60 μm y b) una sección inserta del mismo a 100 μm	39
17	Micrografías de barrido electrónico de las microalgas inmovilizadas sobre el soporte de poliuretano utilizado en la remoción de metales del cauce. En la parte superior se observan diatomeas y en a) <i>Scenedesmus</i> sp; La inmovilización de las microalgas sobre el poliuretano se observa en b). Mientras c) y d) corresponden a diatomeas.....	40
18	Micrografías de barrido electrónico de la parte interna soporte del utilizado en la inmovilización de microalgas para los bioensayos de biorremoción de metales pesados e inducción a la biosíntesis de metalotioninas. Se observan dos secciones del poliuretano a 500 μm (a y b).	42
19	Perfil de pigmentos obtenido mediante HPLC a partir de la extracción con acetona 100% efectuado a las microalgas <i>cauce</i>	43
20	Perfil de pigmentos obtenido mediante HPLC a partir de la extracción con acetona 100% efectuado a las microalgas <i>sauzal</i> .	45

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
21	Vista del experimento realizado con elutriado para los bioensayos de remoción de metales de El Sauzal donde se observan los inmovilizados de las diatomeas en las columnas de cultivo expuestas a luz fría y aireación baja.....	46
22	Fotografía de los sistemas empleados en el bioensayo de remoción de metales e inducción a la acumulación de MT III utilizando los elutriados y microalgas <i>cauce</i>	47
23	Cinética de remoción de cobre en miligramos por litro (a) y porcentaje de remoción del mismo metal (b), con microalgas <i>sauzal</i> en 24 horas, respectivamente.....	48
24	Cinética de remoción del Fe en mg/l del bioensayo con microalgas <i>sauzal</i> en 48 horas.....	50
25	Muestra la de remoción del manganeso con microalgas <i>sauzal</i> expuestas a los elutriados.....	51
26	Remoción del Zn utilizando las muestras y diatomeas <i>sauzal</i> cultivadas en medios con elutriados en 24 horas.	52
27	Grafica de resultados de los bioensayos de remoción de Cu con microalgas cultivadas en elutriado del cauce en 48 horas.....	53
28	Resultados de los bioensayos de remoción de Mn efectuado por microalgas <i>cauce</i> (a) y al porcentaje de remoción del mismo metal y sitio (b), ambos después de 48 horas de cultivo.....	55
29	Remoción de Zn efectuada con microalgas inmovilizadas utilizando elutriados y agua del cauce en un bioensayo de 48 horas.....	57
30	Concentraciones totales de cada metal y la concentración máxima removida, por microalgas utilizando 0, 50 y 100% de elutriado de El Sauzal.....	58

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
31	Muestra las concentraciones totales de metal y la concentración máxima removida de los experimentos con 0, 50 y 100% de elutriado del cauce	59
32	Remoción del metal total (r, microalga + soporte) y biorremoción de metales con microalgas inmovilizadas (b). La Figura corresponde a los máximos de remoción de metales en elutriados 0, 50 100% en el bioensayo de El Sauzal.....	61
33	Remoción del metal total (r), es decir microalga más soporte; biorremoción de metales con microalgas inmovilizadas (b). La corresponde a los máximos de remoción de metales en elutriados 0, 50 100% en el bioensayo del cauce.....	63
34	Cromatograma en HPLC de los reactivos empleados en la determinación de MTII y GSH.....	64
35	Cromatograma en HPLC de la cisteína. Se muestran unidades de luminiscencia y tiempo de retención en minutos.....	65
36	Se muestra tiempo de retención y unidades arbitrarias de luminiscencia del glutatión o GSH a diferentes concentraciones...	65
37	Cromatograma de la extracción de grupos tioles, efectuado a microalgas <i>cauce</i> y <i>sauzal</i> , se muestra tiempo de retención en minutos y unidades de luminiscencia.....	66
38	Figura 38 .Esquema modificado de Peralez-Vela <i>et al.</i> (2009) de la toma de metales en las microaglas. (Men+) iones de metales libres, (E) ácido glutámico, (C) cisteína, (G) glicina, (γ EC) gama glutamailcisteína (γ ECG) glutatión, ($[\gamma$ EC] $_2$), metalotionina n=2, (cis) cisteína como acarreador, (BPM) complejos de bajo peso molecular, (APM) complejos de alto peso molecular, (γ ECS) gama glutamailcisteína sintetasa, (GS) glutatión sintetasa. Se muestran también los grupos funcionales: (R-NH $_2$) amina, (-OH) hidroxilo, (R-COOH) carboxilo, (R-SH) tiol.....	79

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Perfil de inyección empleado en el HPLC, se muestra el tiempo de inyección y el porcentaje de eluentes. El solvente A consistió en acetato de amonio 0.5 M en metanol/agua (85:15, v/v), B consistió en acetonitrilo/agua (90:10, v/v) y C correspondió a etil acetato (Louda <i>et al.</i> 1998).....	13
II	Relación de áreas de los tres tamaños de soportes probados. Se muestra promedio y desviación estándar para n=15.....	16
III	Programa de inyección en HPLC para la inyección de grupos derivados de tioles derivatizados. La solución A corresponde al ácido trifloro acético al 0.1%, mientras que como eluente y B acetonitrilo al 100%.....	24
IV	Resultado de las pruebas t efectuadas entre los pesos secos de microalgas obtenidos de la inoculación de tres diferentes tamaños de soporte: pequeño ($0.43 \pm 0.01 \text{ cm}^3$), mediano ($0.91 \pm 0.03 \text{ cm}^3$) y grande ($1.03 \pm 0.02 \text{ cm}^3$), para n=3.....	33
V	Valores del crecimiento de las microalgas de los diferentes sitios estudiados y empleadas en los bioensayos con 0, 50 y 100% elutriado a las 24 y 48 horas de exposición. n=3.....	37
VI	Absorción en mg metal/mg de célula + soporte, en el bioensayo del cauce. Se observan los valores de los elutriados 0, 50 y 100% a las 24 y 48 h de exposición.....	60
VII	Absorción en mg metal/mg de célula + soporte, en el bioensayo de El Sauzal, se muestran los valores de los elutriados 0 y 50% a la hora 48 de exposición.....	60

Capítulo I

Introducción

La contaminación por metales pesados, representa un problema ambiental importante debido a los efectos tóxicos de los metales, su acumulación a través de la cadena alimenticia conduce a problemas ecológicos y de salud serios. Recientemente, los informes de la Organización Mundial de la Salud, y de la Secretaria del medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) reportan el aumento preocupante de metales pesados en el ambiente (Zamora-Castro, 2007). En gran medida, el incremento poblacional, la expansión rápida y el aumento de la sofisticación de varias industrias, ha contribuido a incrementar la cantidad y complejidad de efluentes con residuos tóxicos. Existe una documentación abundante sobre la toxicidad de los metales pesados sobre el daño a los nervios, hígado y huesos, además de bloquear a los grupos funcionales de enzimas vitales (Ewan y Pamphlet, 1996). Un rango de efectos negativos en la flora y fauna igualmente han sido documentados. A menudo, también esos contaminantes inhiben los procesos de biorremediación biológica, debido a la sensibilidad de las cepas. La regulación ambiental estricta, conmina al desarrollo de métodos de producción más limpios, requiriendo técnicas ambientalmente compatibles, de bajo costo y eficientes para el tratamiento de efluentes y sitios con contenido de iones metálicos. Aunque la remoción de metales pesados tóxicos de aguas residuales se ha realizado por varias décadas (Oswald, 1957), la efectividad del costo de la mayoría de los procesos físico-químicos, como oxidación y reducción, precipitación química, filtración, tratamiento electroquímico, evaporación, intercambio iónico y ósmosis inversa aun están limitados (Singh *et al.* 2007). Los metales que más se han estudiados en este tipo de tratamientos son: Cd, Zn, Cu, Ag, Pb, Hg, Ni y Cr (Kojima y Lee, 2001; Monteiro *et al.* 2008 y 2009; Omar, 2001; Mehta *et al.* 2002; Perez-Rama *et al.* 2002;

Romera *et al.* 2008; Travieso *et al.* 1999). Ante esta situación, la necesidad de contar con procesos y tecnologías ambientalmente compatibles y de bajo costo para el tratamiento de metales pesados se hace cada vez más necesario. Las plantas de tratamiento municipales en la mayoría de los países en desarrollo, no están equipadas para remover trazas de metales pesados. Durante las últimas décadas, los incrementos en las concentraciones de los metales pesados en ríos, agua y sedimento crea la necesidad de desarrollar biotecnologías que contribuyan a mitigar la presencia de los metales (Volesky, 2000; Veglio *et al.* 2003 en Mohapatra y Gupta 2005). Los tratamientos biológicos utilizando microalgas han demostrado múltiples ventajas sobre los métodos convencionales como el intercambio iónico y la precipitación (Wilde y Benemann, 1993). Los mecanismos de tolerancia de las microalgas en el medio acuático, además de sus características estructurales y funcionales, les confieren propiedades para secuestrar y remover metales de la columna de agua (Frayssse *et al.* 2000, Travieso *et al.* 1999). A pesar de que algunos metales son esenciales, y no están considerados factores limitantes, son parte de las estructuras implicadas en el transporte de electrones en la fotosíntesis, además de activadores de enzimas microalgales. Los metales pesados entran en las células de las algas, ya sea por medio de transporte activo o por endocitosis a través de proteínas y afectan diversos procesos fisiológicos y bioquímicos (Arunakumara y Xuecheng, 2007). Se han propuesto varios mecanismos para explicar la penetración de los iones de metales cuando la concentración es mayor en el exterior que en el interior de la célula: mediante la competencia con la unión de iones multivalentes transportadores, o uniéndose a moléculas de bajo peso molecular como la cisteínas.

Los estudios realizados en los sitios de actividad portuaria y pesquera, como las desarrolladas en el Puerto de El Sauzal han reportado que los niveles de metales pesados no ponen en peligro la biota circundante (Huerta-Díaz *et al.* 2009). Sin embargo, las expectativas y el aumento poblacional e industrial del Municipio de Ensenada pueden generar contaminantes como los metales pesados. Ante esta situación, la necesidad de biotecnologías que mitiguen o reviertan los niveles de metales pesados provenientes de efluentes municipales y de ambientes costeros se hace cada vez más necesario. El poder evaluar los niveles de metales y sus respectivos biomarcadores de absorción y/o

biorremoción permitirá expandir el conocimiento y desarrollar procesos ambientalmente compatibles y de bajo costo utilizando especies específicas de los sitios por biorremediar y que reciben los subproductos y descargas de actividad antropogénica.

Antecedentes

Los primeros estudios sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como microorganismos purificadores de aguas residuales consideraron el aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos contenidos en esta agua, para favorecer el crecimiento de los mismos. Oswald (1957) introdujo un nuevo concepto en la producción masiva de microalgas, mediante el tratamiento de agua residual con producción de biomasa de alto contenido proteico. En 1960, en Richmond, California, se plantea el sistema de cultivo más grande de los Estados Unidos, alcanzando una producción de 12-18 g/m² día. Es a partir de este cultivo de microalgas a gran escala que se desencadenó el desarrollo por parte de diversos países en el cultivo masivo de microalgas en sistemas cerrados y abiertos, con diferentes finalidades.

Dado el papel central que desempeñan las microalgas en el ciclo de los metales en ambientes acuáticos y su excepcional capacidad de secuestrar y unir metales, es evidente que las microalgas silvestres poseen el potencial para controlar y recuperar los metales. La eficiencia de biorremoción varía según la especie de microalga y del metal (Radway *et al.* 2008). Los resultados indican que algunos metales tóxicos son más fácilmente retirados que otros por las microalgas, y que la selección de cepas podría mejorar la biorremoción de determinados metales de las aguas residuales a pH neutro. Nirupama (2002) efectuó una revisión sobre el uso de algas inmovilizadas con el fin de extraer nitrógeno, fósforo y metales de aguas residuales, considerando que la utilización de microalgas inmovilizadas en estos procesos es adecuada y ofrece ventajas significativas en biorreactores. Algunos desarrollos de microalgas transgénicas se han evaluado para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con metales pesados, mediante la sobreexpresión de enzimas, cuyos productos metabólicos asumen los efectos del estrés inducido por los metales pesados y la expresión de proteínas de alta afinidad con metales pesados en la

superficie y en el citoplasma de las células transgénicas. Las estrategias más eficientes han reducido considerablemente la toxicidad de metales pesados permitiendo a las células transgénicas crecer a las velocidades de sus contrapartes silvestres en la presencia de concentraciones letales de metales pesados (Rajamani *et al.* 2007). Existe información de remoción de metales tanto en microalgas unicelulares como filamentosas (Clorofita y Cianofita) y su eficiencia fue demostrada (Singh *et al.* 2007). Para evaluar el impacto potencial de los metales pesados en el medio ambiente es fundamental conocer los niveles de los metales pesados biológicamente disponibles. El total de contenido en metales pesados es generalmente determinado por absorción atómica o espectrometría de masas. Los niveles de biodisponibilidad de metales pesados pueden ser determinados por análisis indirectos similares del total de los metales presentes en un organismo. Una alternativa no destructiva para monitorear la biodisponibilidad de metales pesados es utilizar especies bioindicadores. Estas especies suelen ser hipersensibles a los metales pesados y tienen rasgos fácilmente medibles, como la tasa de crecimiento, que responde a los metales pesados en una forma cuantificable (Rajamani *et al.* 2007).

Sin embargo la viabilidad de bioensayos basados en la síntesis de fitoquelatinas (metalotioninas de clase III) para evaluar la contaminación por metales en los ambientes acuáticos ha sido evaluada utilizando diversas especies por Ahner (1995), Rijtenbil y Wijnholds (1996), Loreti *et al.* (2005), Morelli *et al.* (2008), Scarano y Morelli (2002) y Le Faucheur *et al.* (2002), entre otros. La respuesta de algunas microalgas sugiere que dichas fitoquelatinas podrían representar un biomarcador útil para la estimación de toxicidad de medios marinos y dulceacuícolas. Fraysse (2006) puntualizó la utilidad del monitoreo de la distribución subcelular de los metales, es decir la tasa de metales en la fracción celular soluble y las fracciones asociadas con las metalotioninas.

Grill *et al.* (1987), mencionan que la función de las fitoquelatinas (PCs) es análoga a las metalotioninas. Los estudios bioquímicos han demostrado que la síntesis de metalotioninas está regulada por la disponibilidad de sustratos de metal pesado, es decir, los complejos glutatión-metal pesado activan la síntesis. Una vez sintetizada, la metalotionina es secuestrada en la vacuola. La concentración intracelular de metales pesados aumenta después de la inducción de la síntesis de metalotioninas. Debido al alto contenido de

cisteína, las metalotioninas unidas a iones metálicos reducen la concentración intracelular de iones libres de metales (Gioacchino y Morelli, 2002). Los microorganismos tolerantes a metales son capaces de acumularlos dentro de las células, y la presencia de metalotioninas en el interior de las mismas se relaciona con la disminución de su toxicidad y por ende con la viabilidad de la especie. La síntesis de dichas metaloproteínas en microorganismos constituye un mecanismo posible para explicar los procesos de bioacumulación de metales pesados, y representa una herramienta potencial para el tratamiento biológico de ambientes contaminados por metales. Las metalotioninas se pueden clasificar mediante un criterio basado en el arreglo de los residuos de cisteína (Vasak, 2005), las de clase I (MTI) contiene 20 residuos de cisteína altamente conservados, las de clase II (MTII) no presentan ese arreglo estricto de cisteínas, sin embargo ambas son codificadas por un gen. Con lo que respecta a las de clase I están presentes en algunas cianobacterias y plantas superiores, mientras que clase II en vertebrados y algunos hongos. Al ser descubiertas en plantas superiores, las metalotioninas clase III se llamaron fitoquelatinas y se observó su capacidad de unir iones de cadmio (Grill *et al.* 1985).

Las funciones presuntivas de las metalotioninas clase III son desempeñar un papel en la homeostasis de metales como zinc y cobre principalmente, en procesos de descontaminación para oligoelementos no esenciales como el cadmio, fijación de metales de transición, y protección frente al estrés oxidativo. Su estructura general consiste en $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ donde el largo de la cadena “n” está entre 2 y 11 unidades, los residuos de ácido glutámico no están unidos a la cisteína por un grupo α -carboxilo como en aminoácidos transcripcionales, pero están unidos con un grupo γ -carboxilo. La estructura principal de MTIII en complejos con metales pesados ha sido difícil de obtener debido a fallas en su cristalización (Perales-Vela *et al.* 2006; Rauser 1990). La unión gama entre el ácido glutámico y la cisteína es mediado por la enzima fitoquelatin sintetasa (PCS), dicha enzima es una γ -glutail cisteína dipeptidil trans peptidasa, que cataliza una transpeptidación del γ -Glu-Cys, la unión de la fracción de glutatión (γ GSH) en una segunda molécula de γ GSH convirtiéndolo en un oligomero $n + 1$. Las metalotioninas están relacionadas estructuralmente con GSH y se presume que son producto de una ruta biosintética.

La bahía de Ensenada recibe el aporte constate de efluentes identificados y no identificados los cuales por lo general están tratados deficientemente. La principal descarga a la bahía la representa la denominada el Gallo en la cual confluye la descarga de la planta el Naranjo liberándose aproximadamente 250 litros por segundo. Aunque los niveles de contaminantes inorgánicos se han determinado, su posible efecto en la síntesis de metalotioninas indicativas de remoción de metales traza no se ha realizado. La posibilidad de otros sitios de actividad industrial que descargan a la bahía se puede considerar. La Norma Oficial Mexicana (NOM-003-ECOL-1997) considera los límites máximos permisibles para la descarga de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Por otro lado, en el puerto de El Sauzal incide una intensa actividad pesquera e industrial que conlleva la liberación de metales traza. Las iniciativas de biorremoción de metales traza mediante microalgas del sitio son escasas y aun más del desarrollo de biomarcadores tipo metalotioninas. En este trabajo se utilizaron microalgas colectadas de sitios que reciben intensa actividad antropogénica, con la finalidad de evaluar el potencial de remoción de metales traza y obtener biomarcadores microalgales.

Hipótesis

La hipótesis de este trabajo es evaluar la posibilidad de aislar microalgas de sitios contaminados por metales pesados y que puedan biorremover los metales del efluentes de aguas residuales municipal conocido como El Gallo así como de un sitio costero de El Sauzal y a su vez biosintetizar metalotioninas clase III.

Objetivo general

El objetivo de la presente investigación es determinar el potencial de bioremediación de metales pesados presentes en los efluentes de aguas residuales municipales y sitios costeros de El sauzal utilizando microalgas aisladas de los mismos, así como evaluar la capacidad de biosíntesis de metalotioninas clase III por las microalgas.

Objetivos específicos

- a) Aislar y desarrollar cepas microalgales capaces de remover los metales pesados Cd, Cu, Fe, Mn y Zn, de efluentes de aguas residuales municipales de la planta de tratamiento de El Gallo y de un ambiente costero de El Sauzal, Ensenada BC, México.
- b) Evaluar la capacidad de las cepas microalgales para biorremover los diferentes metales de elutriados colectados en cada sitio de estudio.
- c) Determinar el potencial de biosíntesis de metalotioninas clase III en microalgas asociadas a la remoción de iones de metales (Cd, Cu, Fe, Mn y Zn) presentes en los cultivos aislados de sedimento y efluente de agua residual.

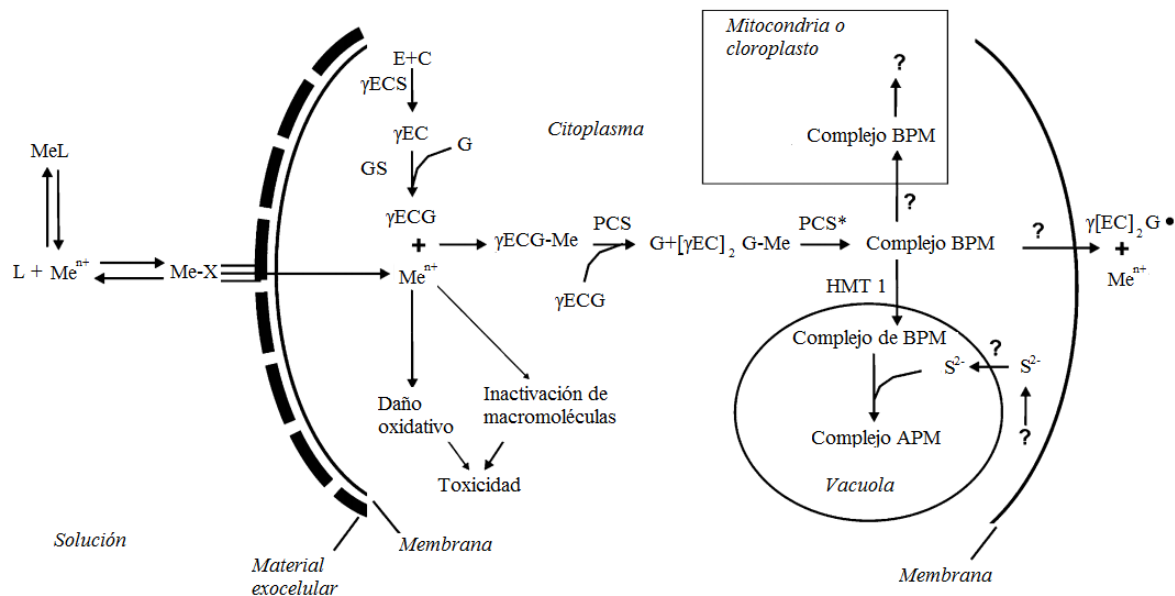


Figura 1. Esquema general de la desintoxicación de metales pesados, mecanismo mediado por metalotioninas clase III (MTIII) en microalgas. Abreviaturas: (MeL) complejos metálicos en solución, (Me^{n+}) iones de metales pesados libres, (X), ligandos bióticos exocelulares, (E), ácido glutámico, (C), cisteína, (G) glicina, (γEC) gama glutamail cisteína, (γECG) glutatión, ($[\gamma EC]_2G$) metalotionina $n = 2$, (BPM) de bajo peso molecular (APM) de alto peso molecular, (γECS) gama glutamail cisteína sintetasa, (GS) glutatión sintetasa (PCS) fittoquelatin sintetasa, (HMT1) transportador vacuolar. * Cuando este paso se repite la cadena larga de MT III puede ser sintetizada, • MT III se disocia cuando se libera al medio (Perales-Vela *et al.* 2006).

Capítulo II

Materiales y métodos

II. 1. Bioprospección de microalgas

Selección y ubicación de sitios de muestreo

En este estudio se seleccionaron sitios expuestos a impactos antropogénicos, específicamente a fuentes de metales traza. Con este criterio se selecciono la descarga de aguas residuales municipales conocida como Arroyo El Gallo que descarga en la Playa Municipal así como una sección contigua al Puerto de El Sauzal.

La selección de los sitios de muestreo obedeció a que de los mismos se realizaron los ensayos de remoción de metales y producción de metalotioninas tipo III (MT III).

Muestreo de microalgas

Se obtuvieron muestras de microalgas y sedimento de dos sitios, en la descarga del efluente El Gallo ($31^{\circ}50'42.42''$, $116^{\circ}36'49.76''$), la cual confluye con la descarga de aguas residuales de la planta El Naranjo, así mismo se obtuvieron muestras en el cauce ubicado entre la descarga y la playa municipal de Ensenada, así como en el puerto El Sauzal ($31^{\circ}53'41.37''$, $116^{\circ}42'4.66''$), cuya ubicación se muestra en la Figura 2. Las muestras de los sitios obtenidas de sedimento y agua, fueron transportadas al laboratorio en tubos plásticos de 50 ml estériles para proceder a su limpieza, aislamiento y caracterización.

Las microalgas de El Gallo fueron denominadas como “*cauce*”, mientras que las que se colectaron en el sitio contiguo se llamaron “*playa*”. Para fines prácticos, las microalgas de este sitio se nombraron “*sauzal*”.



Figura 2. Ubicación de los sitios de muestreo. Dentro de los cirulos se muestran los lugares de colecta de sedimento, microalgas y agua.

II. 2. Aislamiento y cultivo de microalgas

Las muestras microalgales del *cauce* se expusieron a iluminación y temperatura durante una semana aproximadamente en el agua del sitio de donde fueron colectadas, hasta observar crecimiento. El sedimento colectado en el sitio *playa* se dejó en relación 1:5 (V/V) en medio de dicho lugar con la finalidad de propiciar el crecimiento microalgal. El sedimento de El Sauzal se dejó en agua del lugar de origen, con el mismo fin mencionado con anterioridad. Posteriormente, las microalgas fueron sembradas en agar al 1.5% y en medio líquido de los sitios de muestreo enriquecido con F2 de Guillard y Ryther (1962) y Guillard (1975) sin vitaminas. Una vez que se sometieron a un procedimiento de lavado, que consistió en filtrar la muestra a través de mallas de 70 μm y de 40 μm , finalmente se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min con la finalidad de permitir la sedimentación de las

microalgas. Se realizaron lavados con medio estéril a un pH ajustado entre 7.5 y 7.8. Una vez descartado el sobrenadante, se inoculó el precipitado de cada muestra obtenida, por duplicado. Las muestras se conservaron en condiciones de temperatura y luz natural en el invernadero, además en la cámara ambiental con luz continua de día de 40 W a 20 ± 2 °C. Se efectuaron lavados y resiembras periódicas con la finalidad de conseguir el cultivo para la caracterización de algas microscópicas y reducir el número de bacterias.

II. 3. Identificación de microalgas

Las microalgas se identificaron a nivel de género y/o grandes grupos taxonómicos, a menos que se indique lo contrario, utilizando los criterios que se describen a continuación.

- a) Pruebas de utilización de sustrato: las capacidades de utilizar perfiles de nitrógeno y fósforo de aguas residuales se corroboró para microalgas que crecen en latitudes similares (Zamora-Castro *et al.* 2007 y Martínez-Cortés 2010).
- b) Claves taxonómicas de acuerdo a Allen *et al.* (2001) y Ripka *et al.* (1979) en donde las principales características morfológicas se correlacionaron con las pruebas de utilización de sustrato.
- c) Análisis de imágenes de las microalgas obtenidas mediante microscopía óptica y de barrido electrónico
- d) Perfil pigmentario (Bustillo-Guzmán *et al.* 2004; Kosakowska *et al.* 2002; Kosakowska 2002; Louda 1998; Stón y Kosakowska, 2002 y Louda *et al.* 2002).

Microscopía de barrido electrónico (MBE)

Se prepararon algunas células para observarse en microscopio de barrido electrónico (MBE), siguiendo criterios de acuerdo a Martínez- Cortés (2010), con la finalidad de contar con más elementos para la identificación de las mismas y para la observación de la disposición de las células inmovilizadas en el poliuretano cuyo método se describe posteriormente. Se manejaron microalgas libres y soporte inoculado, con un espesor

aproximado de 1 mm. Las células libres se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante. Por otro lado los soportes se decantaron, ambos se lavaron con formato de amonio con el fin de eliminar sales. Posteriormente las células, tanto libres como inmovilizadas se dejaron en 1 ml de formaldehído al 4% durante 3 horas. Después se lavaron con un amortiguador PBS durante 10 minutos. La deshidratación procedió con la adición de etanol al 10% (V/V) en agua durante 10 minutos, etanol 20% y así sucesivamente 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90% y 100% respectivamente. Finalmente las muestras se dejaron en el desecador con sulfato de calcio anhidro (diedrita) activado, durante 24 h para que el proceso de secado terminase. Transcurrido éste proceso, las muestras celulares fueron recubiertas con oro o carbón. Las micrografías fueron amablemente realizadas por el personal técnico del CNyN-UNAM y de Ciencias de la Tierra, CICESE.

Adicionalmente, se utilizó el perfil pigmentario para identificar las microalgas. Los perfiles pigmentarios se obtuvieron siguiendo la metodología de Louda *et al.* (1998) con algunas modificaciones, mismas que describen posteriormente.

Extracción de pigmentos

Los pigmentos fueron extraídos de las microalgas siguiendo el método reportado por Louda *et al.* (1998) con algunas modificaciones. Las microalgas que fueron inmovilizadas se extrajeron del soporte aplicando presión en repetidas ocasiones hasta que el soporte perdió la coloración característica del cultivo. Una vez de manera libre las células se concentraron mediante centrifugación a 2000 rpm durante 15 min, dicho concentrado celular fue congelado a -20 °C durante un tiempo mínimo de 14 h. Posteriormente se le adicionó de 1 a 2 ml de acetona al 100% y se maceró con pistilo de vidrio. La mezcla se dejó en contacto durante 24 h en oscuridad a -20 °C, una vez transcurrido dicho periodo se centrifugó a 3600 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue colectado, mientras al concentrado se adicionó 1 ml de acetona al 100%, fue macerado y centrifugado nuevamente bajo las condiciones previamente mencionadas. Ambos sobrenadantes se combinaron para proceder a su lectura a través del

espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 mediante un barrido de 300 a 750 nm de longitud de onda y en cromatografía líquida de alta definición, HPLC por sus siglas en inglés.

Las características del HPLC fueron: una columna Eclipse XDB-C8, un aro de inyección de 20 μ l, siendo el programa de inyección el descrito en la Tabla I.

Tabla I. Perfil de inyección empleado en el HPLC, se muestra el tiempo de inyección y el porcentaje de eluentes. El solvente A consistió en acetato de amonio 0.5 M en metanol/agua (85:15, v/v), B consistió en acetonitrilo/agua (90:10, v/v) y C correspondió a etil acetato (Louda *et al.* 1998).

Tiempo(min)	Solvente A	Solvente B	solvente C
0	60	40	0
5	60	40	0
10	0	100	0
40	0	30	70
45	0	30	70
46	0	0	100
47	0	100	0
48	60	40	0

Determinación de densidad celular y peso seco.

La cantidad celular se cuantificó mediante conteos directos en cámara de Neubauer de 0.100 mm. La concentración celular por ml se obtuvo mediante la ecuación 1. Se desarrolló el método de densidad óptica para correlacionar el número celular con la absorción de luz de las mismas en suspensión, seleccionando un volumen de medio de cultivo denso de microalgas en fase exponencial el cual se diluyó a 75, 50 y 25%. La calibración del número celular y absorción se realizó mediante densidad óptica cuantificándose como se mencionó anteriormente y midiendo la densidad óptica de cada dilución en el espectrofotómetro. Los máximos de absorción observados fueron de 678 y 691 nm para los cultivos *sauzal* y *cauce* respectivamente, se correlacionaron contra número de células en la ecuación obtenida de la regresión de los datos.

$$C = (N \times 10^4)(FD) \quad (1)$$

donde C es el número de células por mililitro, N el promedio de células presentes en 1 mm^2 o en $1 \mu\text{l}$ y FD corresponde al factor de dilución.

Las regresiones lineales 2 y 3 muestran la ecuación que se empleó para la correlación de lectura del máximo de absorbancia del barrido de lectura in vivo realizado a cada cultivo.

$$y = 3 \times 10^6 x + 384548, R^2 = 0.995 \quad (2)$$

donde y es el número de células por mililitro y x es la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 678 nm in vivo de los cultivos *sauzal*.

$$y = 1 \times 10^{+07} x + 3 \times 10^{+06}, R^2 = 0.9936 \quad (3)$$

donde y es el número de células por mililitro y x es la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 691 nm in vivo de los cultivos *cauce*.

El peso seco se determinó mediante gravimetría a 100 °C. Una vez que se midió el volumen y la densidad óptica del cultivo, éste fue colectado mediante filtros de fibra de vidrio previamente secados en la estufa a 100 °C durante 24 h y registrado su peso constante. Las células en el filtro se lavaron con 10 ml de una solución de formato de amonio 0.1 M para la eliminación de sales. Los filtros se colocaron en la estufa a 100 °C durante 24 h, transcurrido este tiempo se retiraron y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta obtener un peso constante. El peso seco total se relacionó con el número de células. El peso seco unitario se calculó mediante la fórmula 4.

$$PSu = \left(\frac{NS}{PS} \right) \quad (4)$$

donde PSu es el peso aproximado en gramos de cada célula calcinada, NS es el número de células obtenido mediante la interpolación de la densidad óptica del cultivo en las ecuaciones 2 y 3, según el cultivo del que se trató. PS es el peso en gramos obtenido del procedimiento, para determinación de peso seco mencionado con anterioridad.

II. 4. Inmovilización celular

Una vez que se generó biomasa, ésta fue inoculada en segmento de poliuretano de baja densidad y alta flexibilidad previamente cortados, es decir soportes.

La selección del método de esterilización se realizó en un número aleatorio de soportes de poliuretano, se colocaron en agua libre de iones, otros en agua con cloro al 10%, y otros más en agua destilada para ser esterilizados en autoclave a 121 °C, 115 lb/plg. Se seleccionaron los soportes que fueron introducidos a la autoclave al no observar deformación ni cambio en la coloración como en el caso de los que se introdujeron en cloro.

Una vez esterilizados los cubos de poliuretano se dejaron a temperatura ambiente hasta que se equilibró con la del ambiente, seguido de un proceso de drenado

posteriormente el poliuretano fue vertido en matraces estériles, se adicionó la biomasa y el medio de cultivo, dejándose en exposición a luz natural hasta el desarrollo de biomasa. Para efectuar renovación de medio de cultivo los soportes fueron drenados.

Se efectuaron ensayos de inmovilización en poliuretano, con efluente, agua de mar, efluente con agua de mar a 10 partes por mil de salinidad, todos enriquecidos con F2 carente de vitaminas y un pH ajustado a 7.5, se expusieron a luz y temperatura ambiente y en cámara ambiental con una luz de día 40 W a 20 ± 2 °C.

Elección de tamaño de soporte

Se cortaron tres tamaños de soportes con forma de cilindro con las siguientes medidas, nombrándolos como grande, mediano y pequeño, las dimensiones y áreas se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Relación de áreas de los tres tamaños de soportes probados. Se muestra promedio y desviación estándar para $n=15$.

	Grande	mediano	pequeño
Altura (cm)	1.18 ± 0.01	1.180 ± 0.009	1.18 ± 0.01
Diámetro (cm)	0.99 ± 0.01	0.932 ± 0.01	0.68 ± 0.01
Área (cm ²)	6.62 ± 0.08	5.20 ± 0.09	3.230 ± 0.004

La efectividad del tamaño del soporte se relacionó en un experimento con los cultivos de cada sitio de estudio: *cauce*, *sauzal* y *playa*. Se inocularon grupos de soportes, por triplicado de los diferentes tamaños (Tabla II) cuyo número dependió de la superficie a considerar, es decir se buscaron equivalencias entre los números de soportes necesarios para cubrir un área específica con los tres tamaños de soporte. Se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura naturales durante 24 días, con recambio de medio cada 8 días. Una vez concluido dicho periodo, los soportes se secaron en la estufa a 100 °C durante 24 h y se determinó su peso constante.

Elección de biomasa inmovilizada vs libre.

Se efectuó un ensayo para determinar la diferencia entre el crecimiento sobre soporte de poliuretano y de manera libre en la columna de medio. El experimento se efectuó en placas de cultivo de seis pozos de 15 ml de capacidad. Se inocularon los soportes y la columna de medio, cada uno por triplicado. En cada cultivo y réplica se midió la densidad óptica inicial, así como al día 4, 9 y 21. Se calcularon diferencias significativas mediante pruebas t entre crecimiento de microalgas libres e inmovilizadas.

II. 5. Preparación de elutriados (resuspensión de sedimentos)

El procedimiento de preparación de elutriados de sedimento de cada sitio se realizó mediante dos métodos que se describen a continuación.

Método de peso seco

El proceso de elutriados se inició el mismo día de la colecta seleccionando medio gramo de sedimento húmedo que se colocó en la estufa a 100 °C durante 24 h, de lo cual se obtuvo la relación peso seco a peso húmedo de acuerdo a Volpi *et al.* (2003). El material empleado fue previamente lavado con HNO₃ al 10% con la finalidad de remover iones adheridos al mismo (Singh *et al.* 2007). El sedimento del cauce se mezcló con el efluente, mientras el de El Sauzal con agua del mismo sitio, ambos en una razón 1:4 (peso/volumen), basándose en el peso seco. La mezcla se homogenizó en licuadora durante 5 minutos, posteriormente se agitó utilizando un agitador magnético durante 1 hora a temperatura ambiente, la mezcla se dejó sedimentar durante 30 min y la fracción acuosa se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min, finalmente se filtró a través de filtros de membrana de 0.45 µm y se almacenó a -20 °C para su utilización posterior en los bioensayos.

Método de peso húmedo

Se efectuó un proceso más de elutriados utilizando sedimento fresco. Se pesaron 25 gramos de sedimento húmedo, el cual fue suspendido y homogenizado en 100 ml de agua de cada sitio según correspondió al sedimento, efluente o agua de mar. Estos se dejaron en agitación mediante barras magnéticas durante 1 hora, la mezcla se licuó a velocidad alta durante 5 minutos y se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se filtró a través de filtros de membranas de 0.45 μm y se depositó a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

II. 6. Bioensayos de remoción de metales pesados, inducción de metalotioninas tipo III (MT III) y glutatión (GSH)

Selección de efluentes.

Para la evaluación de la remoción y contenido de MT III, se eligió el agua del sitio de proveniencia de las microalgas y se diseñaron medios de cultivo enriquecidos con elutriados de sedimento colectado de los sitios contiguos a descargas de aguas residuales y con influencia de contaminantes xenobióticos, en porcentajes de 50 y 100% para el bioensayo. El pH de dichos medios de cultivo fue ajustado entre 7.3 y 7.5 con NaOH y HCl.

Pre cultivo de biomasa

Fueron inoculados una cantidad suficiente de soportes estériles con microalgas *cauce* y *sauzal*, en el tamaño de soporte elegido previamente. Los cultivos se mantuvieron en medio a base de efluente estéril y filtrado en agua, en relación 50:50 (V/V) para las microalgas *cauce*, mientras que para las microalgas *sauzal* en agua de mar con 35 ppm de salinidad, ambos enriquecidos con medio F2 sin vitaminas.

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de luz y temperatura naturales con cambio de medio de cada 8 a 10 días, una vez que los soportes se observaron lo suficientemente cubiertos de biomasa y que su cantidad en la columna de agua era mínima,

se prepararon para los ensayos biológicos de remoción e inducción de MT III. Los medios de cultivo fueron cambiados por los mencionados anteriormente pero carentes de metales traza y se mantuvieron durante 15 días con dos recambios de medio. 24 horas previo al bioensayo se realizó un tratamiento con los siguientes antibióticos: 100 mg/l de penicilina G, 0.017 mg/l de anfotericina B y 41.5 μ g/l de estreptomina en medio, dejándose en contacto durante un día. Una vez transcurrido dicho periodo, el medio fue reemplazado por uno fresco carente de metales traza.

II. 6. 1. Remoción de metales pesados e inducción de MT III

Cinéticas de remoción

Los bioensayos consistieron en tres réplicas para cada condición y tres controles, en medios con 0, 50 y 100% de elutriado, según correspondiese a cada sitio. Los controles consistieron en soportes estériles sin microalgas, con la finalidad de cuantificar el efecto de remoción efectuado por el mismo.

El sistema empleado en los bioensayos consistió en probetas de vidrio de 100 ml previamente lavadas con HNO_3 al 10%, a manera de columnas que contuvieron los soportes inoculados y controles, suspendidos en los medios seleccionados. Con la finalidad de coadyuvar al metabolismo de las microalgas y permitir la circulación y homogenización del medio se suministró aireación continua, la iluminación a la que se expusieron fue luz de día de 40 W sin fotoperiodo.

Se tomaron alícuotas de medio al tiempo inicial, a la hora 2, 4, 6, 10, 2 y 48, las cuales fueron acidificadas con HCl 0.1 M y centrifugadas a 7000 rpm durante 15 minutos para leer en el espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA 220 Fast Sequential, localizado en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC. La relación empleada para el evaluar la cinética de remoción fue la descrita en la ecuación 5, mientras que el porcentaje de remoción se calculó de acuerdo con la ecuación 6.

$$\text{Remoción (mg/l)} = \text{control} - \text{tratamiento} \quad (5)$$

$$\% \text{ Remoción} = [(\text{control} - \text{tratamiento}) / \text{control}] (100) \quad (6)$$

donde *tratamiento* corresponde a la cantidad de metal calculada en cada sistema experimental y réplica, *control* al valor obtenido de los sistemas controles es decir sin microalgas.

Se tomaron alícuotas de soportes con microalgas al inicio, a la hora 24 y al final del ensayo, una vez extraída la biomasa se midió la densidad óptica con la finalidad de cuantificación celular, posteriormente fue centrifugada a 2000 rpm durante 15 min, el botón celular obtenido se lavó con 1 ml de medio estéril correspondiente al sitio que se trató, se suspendieron con ayuda del agitador tipo vórtice y se lavaron nuevamente. El concentrado celular se congeló a -80 °C hasta su procesamiento, ya sea extracción de pigmentos o determinación de MT III cuya metodología se describe con posterioridad.

El procedimiento anteriormente expuesto se efectuó para los dos sitios tratados, variando el número de soportes empleados. En cada tiempo de muestreo se extrajeron soportes para conservar la proporcionalidad entre estos y el volumen de medio.

Cálculo de bioabsorción de metales

La bioabsorción, es decir la cantidad de metal absorbida en gramos por gramo de microalga en peso seco, fue calculada con la biomasa del cauce a la hora 24 y 48, mientras que sólo para las 48 h con las células *sauzal*. El cálculo de bioabsorción fue de acuerdo a Volesky (1990), a través de la ecuación 7.

$$q_{eq} = \frac{V(C_1 - C_{eq})}{M} \quad (7)$$

donde q_{eq} corresponde a la tasa de incorporación específica de cada metal (mg metal/g absorbido), V es el volumen de la solución con metales, C_1 es la concentración inicial del metal (mg/l) y C_{eq} la final del metal (mg/l), y finalmente M corresponde al peso del

bioabsorbente, es decir se calculó sumando el peso seco de las microalgas con el del soporte.

La absorción máxima efectuada por la biomasa fue calculada mediante la diferencia entre la remoción efectuada por el sistema microalga-soporte y el soporte sin microalgas (controles), ambas se obtuvieron mediante la ecuación 5.

Tasas de crecimiento

Las tasas de crecimiento fueron calculadas al inicio, a las horas 24 y 48 en las células *cauce*, mientras que al inicio y a la hora 48 para las células *sauzal*, de los bioensayos, mediante la ecuación 8.

$$\mu = \left[\frac{\left(\ln \frac{x_1}{x_0} \right)}{\ln 2} \right] / (t_1 - t_2) \quad (8)$$

donde μ es la tasa de crecimiento en días⁻¹, x corresponde a la concentración de biomasa inicial (0) y final (1) en células/ml, t es el tiempo en días, (0) inicial y (1) final, $\ln 2$ se emplea en vista que la mayoría de las microalgas se reproducen mediante división binaria.

II. 5. 2. Determinación de MT III y GSH

Con la finalidad de relacionar las concentraciones de metales pesados presentes en los medios seleccionados con la producción de MT III y GSH en las microalgas, se efectuaron varias pruebas para la estandarización de la técnica de detección reportada por diversos autores. A continuación se describen los métodos empleados para dicho fin.

Se formó un concentrado de células mediante filtros de membrana de 1.2 μm con presión baja para las células que no estaban almacenadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, mientras que con los concentrados de células congeladas se procedió directamente a la extracción, reducción y

derivatización de grupos tioles según varios autores, los métodos se describen posteriormente.

Con la metodología de Rijstenbil y Wijnholds (1996) sin reducción y con algunas modificaciones, el cultivo concentrado se resuspendió en 1.2 ml de HCl 0.12 M/DTPA(ácido dietilen triamino penta acético) 5 mM y se aplicó sonicated a 14 μ m de amplitud de onda durante tres periodos de 1 min por 1 min de descanso. Posteriormente la mezcla se centrifugó 13000 rpm a temperatura ambiente durante 25 min. A 250 μ l de sobrenadante se le adicionaron 10 μ l de mBrB (monobromobimano) 100 μ M, 650 μ l de HEPES (ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico) 200 μ M/DTPA 5 mM a pH 8.3 y se dejó durante 15 min en obscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se adicionaron 100 μ l de ÁMS (ácido metano sulfónico) 1 M para detener la reacción.

La aplicación del método reportado en Morelli *et al.* (2008) con algunas modificaciones, consistió en homogenizar el cultivo en 1.5 ml de una solución de HCl 0.1 M y DTPA 5 mM, la mezcla se centrifugó 20000 g a 4 °C durante 25 min. Posteriormente a 400 μ l de sobrenadante se adicionaron 200 μ l de HEPES 400 μ M/DTPA 5 mM a pH 9, y 20 μ l de TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina) 10 mM, dejándose durante 15 min. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 40 μ l de mBrB 10 mM y dejan durante 15 min en baño de agua a 45 °C en obscuridad. Se vertieron 40 μ l de una solución 100 mM de cisteína en HCl 0.1 M y DTPA 5 mM y se dejó bajo las mismas condiciones que la reacción anterior. Finalmente para detener la reacción se adicionaron 40 μ l de ÁMS 1 M.

Con el método de Scarano y Morelli (2002) con algunas modificaciones, el botón celular se homogenizó en 2 ml de HEPES 50 mM en HCl 50 mM y TCEP 1 mM, se aplicó agitación tipo vórtice durante un minuto con uno de descanso, con cinco repeticiones. La mezcla se centrifugó durante 20 min a 20000 g y 4 °C. 100 μ l del sobrenadante se acidificaron con 10 μ l de HCl 1.2 M en DTPA 5 mM, después de 30 minutos de incubación se agregó 130 μ l de HEPES 200 mM en DTPA 5 mM a pH 8.3 y 10 μ l de TCEP 10 mM y se mantuvo durante 25 minutos. Se vertieron 20 μ l de mBrB 10 mM y se trasladó a baño maría a 45 °C en oscuridad durante 15 min. Se mantuvo bajo las condiciones anteriores, y

posterior a eso se adicionaron 20 μ l de cisteína 100 mM cisteína en HCl 0.12 M y DTPA 5 mM para que reaccionara el mBrB remanente. Para concluir la reacción se añadieron 20 μ l de AMS 0.1 M.

Técnicas para rompimiento celular empleadas

Una vez que se observó la efectividad del método de etiquetado o derivatización con los estándares GSH y cisteína, se procedió a probar distintos métodos de rompimiento celular para la extracción de grupos tioles: mayor intensidad en el sonicado, de 30 a 40 μ m en periodos que fueron de los 5 a 11 minutos con una variación en el pulso de 0.3 a 0.5s, con amplitud de 60 a 80. Se sometieron algunas células a macerado con pistilos de teflón, mientras que otras microalgas se liofilizaron según Le Faucheur *et al.* (2005) durante 20 horas y se homogenizaron en HCl 0.12 M y DTPA 5 mM para ser transferidos a baño de agua a 95 °C durante dos minutos con el fin de desactivar proteasas. Otra técnica ejecutada fue la propuesta por Le Faucheur *et al.* (2006) con algunas modificaciones, que consistió en el uso de Bead Beater, que permitió la colisión entre las células con esferas suspendidas en el amortiguador anteriormente mencionado, durante tres periodos de 1 min de agitación por uno de descanso en cama de hielo.

De cada uno de los métodos para la disrupción celular mencionados anteriormente, siguió la derivatización de tioles propuesta por Rijkenbil y Wijnholds (1996) con modificaciones de Morelli *et al.* (2009) y Le Faucheur (2005), mismo que se menciona a continuación. El cultivo se homogenizó en 1.5 a 2 ml de HCl 0.12 M/DTPA 5 mM, a la mezcla se le aplicó sonicado con Ultrasonic Processor GE 100, con una amplitud de onda de 60, un pulso de 0.3 s hasta que el rompimiento de las células se detectó al observar al microscopio. Se centrifugó a 20000 g durante 20 min a 4 °C. A 250 μ l de sobrenadante se le sumaron 25 μ l de TCEP 20 mM en HCl 0.12 M /DTPA 5 mM, la reacción se dejó durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 160 μ l de HEPES 200 μ M/DTPA 5 mM a pH 9 y la reacción se mantuvo durante 10 min en obscuridad en cama de hielo. A la mezcla anterior se adicionaron 10 μ l de mBrB 100 μ M y 465 μ l de HEPES 200 μ M/DTPA 5 mM

a pH 8.2, dejándose en oscuridad durante 15 min. Transcurrido dicho periodo se adicionaron 40 μ l de mBrB 100 mM y se dejó reaccionar en baño de agua a 45 °C y en ausencia de luz durante 15 min. Después se vertieron 40 μ l de una solución 100 mM de cisteína en HCl 0.1 M y DTPA 5 mM para que reaccionase con el mBrB remanente y se mantuvo bajo las mismas condiciones de la reacción anterior. Finalmente se detuvo la reacción con 100 μ l de ÁMS 1 M. Las preparaciones se mantuvieron en oscuridad a 4 °C mientras fueron inyectadas al HPLC.

Las muestras derivatizadas fueron inyectadas a un HPLC Hewlet Packard (Agilent) 1100, de acuerdo a Rijstenbil y Wijnholds (1996) en una columna Vydac 218TP52 C-18 de 2.1 mm de diámetro por 250 mm de largo y 5 μ m de tamaño de partícula, con un flujo de 0.5 ml/min en un circuito de 20 μ l, con una excitación de 380 nm y emisión de 470 nm. El perfil de elución empleado se describe en la Tabla III.

Tabla III. Programa de inyección en HPLC para la inyección de grupos derivados de tioles derivatizados. La solución A corresponde al ácido trifloro acético al 0.1%, mientras que como eluente y B acetonitrilo al 100%.

Tiempo (min)	Eluente A (%)
0-15	10-12
16-55	12-28

Capítulo III

Resultados

III. 1. Bioprospección microalgal

De cada sitio de muestreo seleccionado se colectaron microalgas como bioindicadores de biorremoción de los metales pesados estudiados. Las microalgas colectadas en el cauce del efluente de la descarga de aguas residuales municipales denominada Arroyo El Gallo, fueron cultivadas en medios preparados en base a efluente, a menos que se indique de otra manera, con el fin de promover el desarrollo *in vitro e in vivo* de las especies. La bioprospección inicial de especies cuyo desarrollo se promovió para la selección posterior de especies cultivables y resistentes a metales se muestra en las Figuras 3 y 4.

III. 1. 1. Aislamiento, identificación y caracterización de microalgas.

Las microalgas colectadas en el cauce fueron sembradas en seis réplicas que a su vez se resembraron y diluyeron para obtener especies por separado.

En la Figura 3 a) se observan especies de Clorofitas como *Scenedesmus* sp., las cianobacterias *Anabaena* sp. y *Clorococus* sp. En la Figura 3 b) se observan algunas diatomeas en la parte superior izquierda e inferior derecha, además de algunas Clorofitas en la parte inferior izquierda.

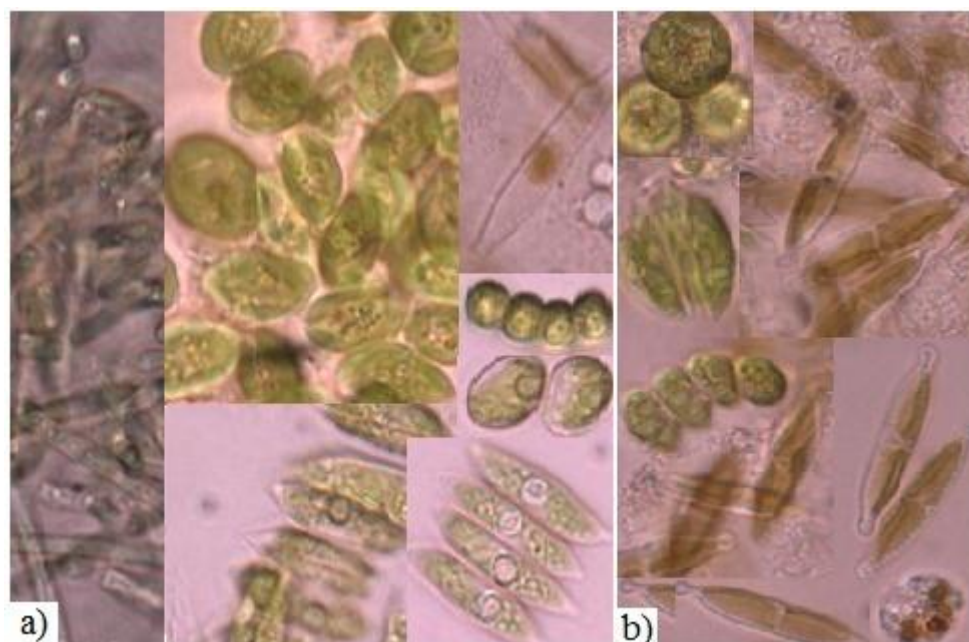


Figura 3. Fotografías con microscopio óptico con objetivo de 100X de las microalgas cauce (a), y playa (b).

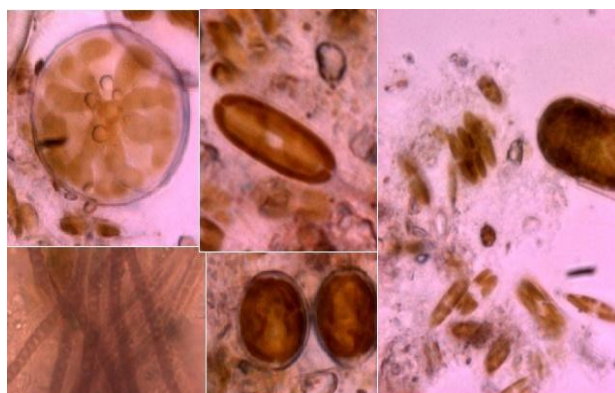


Figura 4. Imágenes de microscopía óptica con objetivo 100X de los tipos de diatomeas sauzal.

Perfil pigmentario

Se realizaron extracciones de pigmentos con acetona y metanol a las microalgas colectadas con la finalidad de seleccionar la mejor resolución de pigmentos entre ambos solventes, además de aportar elementos para la identificación de especies. Se obtuvieron algunos de los pigmentos presentes en tres divisiones de microalgas: Clorofitas, Feofitas y Cianofitas, los cuales fueron identificados mediante espectrofotometría de absorción y HPLC.

Entre los pigmentos representativos de los grupos de microalgas colectadas: *Nitzschia* sp., *Navicula* sp., *Phaeodactylum* sp. y *Pseudonitzschia* sp., se encuentran la clorofila *a* y *c*, β caroteno, fucoxantina, diatoxantina y diadinoxantina (Hgerthey *et al.* 2006). De las cianobacterias se ubicaron: *Synechococcus* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp. y *Nonstoc* sp., las cuales producen echinenone, myxoxantofila (Bonilla, 2005), scytonemi, en sus formas oxidada y reducida, myxoxantofila, zeaxantina y canthaxantina (Hgerthey *et al.* 2006). Por último también se encontraron *Oocystis* sp., *Scenedesmus* sp., *Zoochlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp., que se encuentran dentro de las Clorofitas y producen pigmentos como clorofila *b*, violaxantina, y luteína (Bonilla, 2005; Hgerthey *et al.* 2006).

En la Figura 5 se muestra el perfil pigmentario de las microalgas cauce realizado mediante cromatografía líquida de alta resolución del cual se identificaron la clorofila *c*, que se presentó alrededor de los minutos 3 y 8 (Kosakowska *et al.* 2002; Bustillo-Guzmán *et al.* 2004; Stón y Kosakowska, 2002). Se observó la presencia de scytonemi, pigmento presente en algas verde azules que se encontró alrededor de los 5 minutos (Hgerthey *et al.* 2006), así mismo la violaxantina, producida por clorofitas fue detectada ceca del minuto 10 (Stón y Kosakowska, 2002). La luteína también generada por algas verdes se registró entre el minuto 11 y 12 (Bustillo-Guzmán *et al.* 2004), la clorofila *b* se presentó cerca del minuto 26 (Hgerthey *et al.* 2006), y finalmente a partir del minuto 33 se observó el β caroteno (Louda *et al.* 2002).

Los cromatogramas de las Figuras 6 y 7 de las microalgas *cauce* difieren de la Figura 5 en la presencia de algunos pigmentos, debido a que en cada cultivo a pesar de ser del mismo origen, se presentó abundancia de especies diferentes. En la Figura 7 se muestra la cantaxantina cerca del minuto 24 (Louda *et al.* 2002; Hgerthey *et al.* 2006), pigmento que es producido por las cianobacterias, se observa también la fucoxantina producida por diatomeas, cerca del minuto 9 (Stón y Kosakowska, 2002; Kosakowska *et al.* 2002; Bustillo-Guzmán *et al.* 2004).

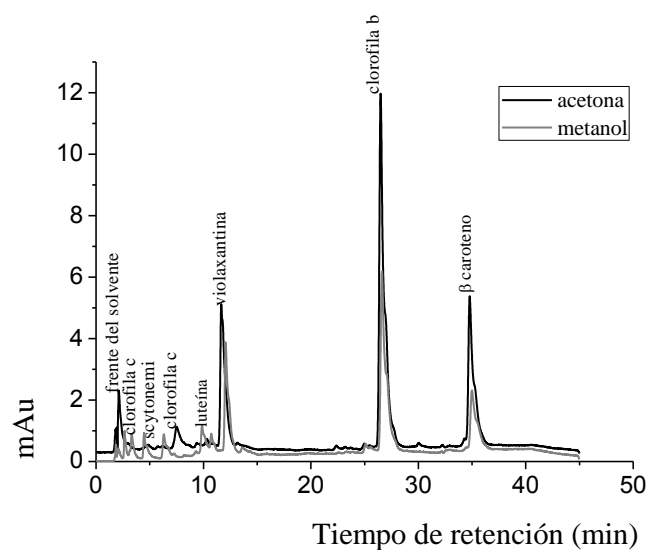


Figura 5. Perfil pigmentario (HPLC) extraído con acetona y metanol al 100% (v/v) de las microalgas *cauce* donde predominaron las Clorofitas.

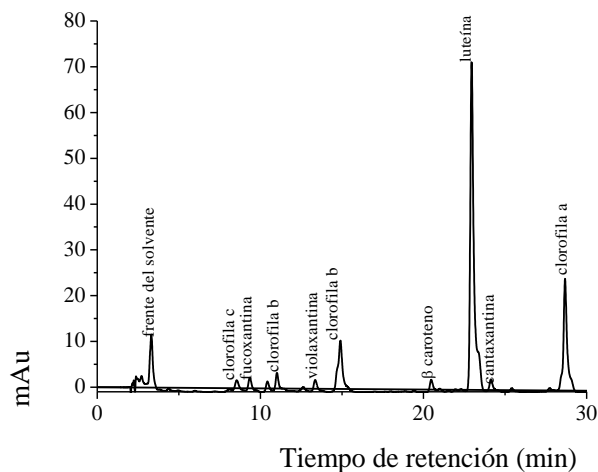


Figura 6. Perfil de pigmentos determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las microalgas *cauce* extraídos con acetona al 100% (v/v) donde se observa predominancia de pigmentos característicos de cianobacterias.

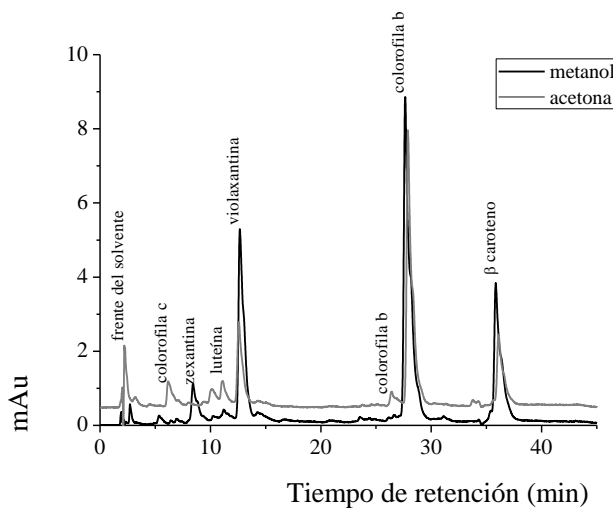


Figura 7. Pigmentos determinados mediante HPLC de las microalgas *cauce*. Los pigmentos se extrajeron selectivamente con acetona o metanol al 100% (v/v).

Entre los sitios muestreados se seleccionó la zona de la playa donde ocurre la mezcla de aguas residuales con agua de mar. En la Figura 8 se observa extracción con acetona y metanol, ambos solventes al 100% realizado a las microalgas colectadas en dicho sitio. De los pigmentos producidos por diatomeas se identificó fucoxantina que es retenida en la columna hasta el minuto 9 aproximadamente (Stón y Kosakowska, 2002; Kosakowska *et al.* 2002; Bustillo-Guzmán *et al.* 2004) y posterior al minuto 10 (Hgerthey *et al.* 2006). La clorofila *c* se observó cerca del minuto 3 (Bustillo-Guzmán *et al.* 2004; Louda *et al.* 2002), y 8 (Kosakowska *et al.* 2002; Stón y Kosakowska, 2002).

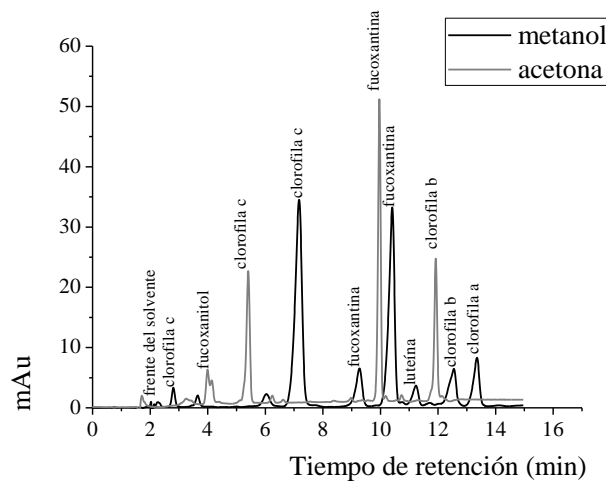


Figura 8. Perfil pigmentario de las microalgas *playa*, obtenido mediante HPLC. Los pigmentos se extrajeron con acetona o metanol al 100% (v/v).

En la Figura 9 se observan las muestras de microalgas *sauzal*. Los pigmentos producidos por diatomeas como fucoxantina que la cual fue eluída de la columna cerca del minuto 9 (Stón y Kosakowska, 2002; Kosakowska *et al.* 2002; Bustillo-Guzmán *et al.* 2004). La clorofila *c* se observó cerca del minuto 3 (Bustillo-Guzmán *et al.* 2004; Louda *et al.* 2002) y del minuto 8 (Kosakowska *et al.* 2002; Stón y Kosakowska, 2002). Además se

presentó el β caroteno cerca del minuto 36 de elución (Louda 1998; Stón y Kosakowska 2002; Louda *et al.* 2002).

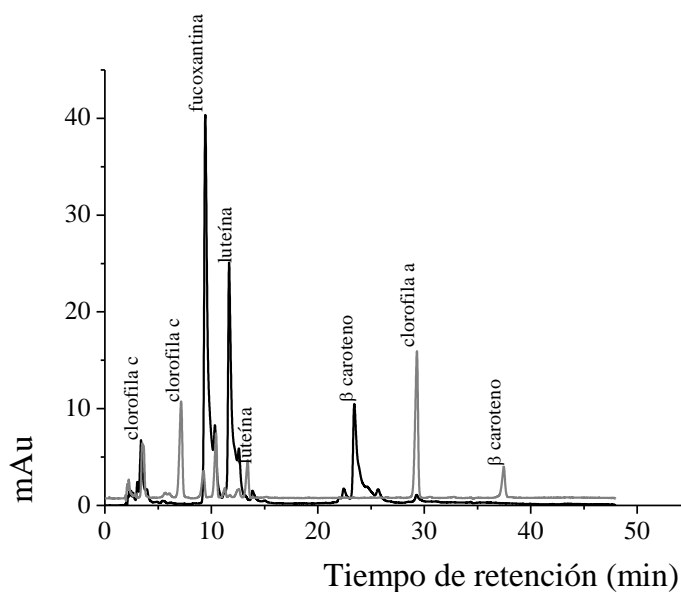


Figura 9. Perfil pigmentario detectado mediante cromatografía líquida de alta resolución de las microalgas *sauzal*. Las extracciones de los diferentes pigmentos se realizaron con acetona o metanol al 100% (v/v).

III. 2. Selección de especies para los bioensayos

III. 2. 1. Inmovilización celular

Elección de tamaño de soporte

Una vez que se efectuaron siembras en el poliuretano y se observó la capacidad de las microalgas de crecer de forma bentónica adheridas al mismo, se efectuó un experimento con los cultivos *sauzal*, *cauce* y *playa* con la finalidad de encontrar diferencias entre los pesos secos de las células adheridas a los tres diferentes tamaños de soporte probados.

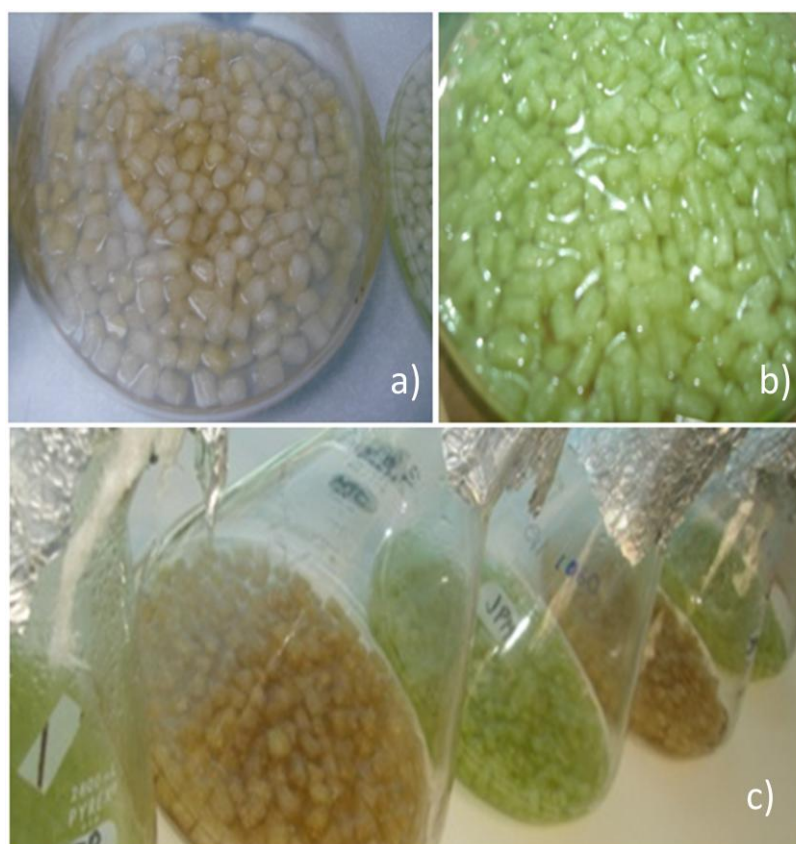


Figura 10. Soportes inoculados con microalgas *sauzal* (a) y *cauce* (b) así como los cultivos de ambos sitios a nivel masivo (c).

Tabla IV. Resultado de las pruebas t efectuadas entre los pesos secos de microalgas obtenidos de la inoculación de tres diferentes tamaños de soporte: pequeño ($0.43 \pm 0.01 \text{ cm}^3$), mediano ($0.91 \pm 0.03 \text{ cm}^3$) y grande ($1.03 \pm 0.02 \text{ cm}^3$), para $n=3$.

	Pequeño-mediano	Pequeño-grande	Mediano-grande
<i>Cauce</i>	($P < 0.001$)***	($P < 0.001$)***	($P > 0.05$) ns
<i>Playa</i>	($P > 0.05$), ns	($P > 0.05$), ns	($P > 0.05$), ns
<i>Sauzal</i>	($P > 0.05$), ns	($P > 0.05$), ns	($P > 0.05$), ns

Como puede observarse en la Tabla IV, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones de peso seco de las muestras de *playa* y *sauzal*, mientras que para *cauce* se observaron diferencias entre los soportes pequeños y grandes, y entre pequeños y medianos. Se observó el mayor peso seco en los soportes pequeños en el cauce, en comparación con los soportes grandes en los cultivos *sauzal* y *playa*. Criterio elegido para seleccionar los soportes en los diferentes experimentos aquí reportados.

III. 2. 2. Crecimiento de células libres contra inmovilizadas, efecto del soporte

Con la finalidad de comprobar si el crecimiento de células en soporte fuese mayor en número que de manera libre, se efectuó un experimento que consistió en inocular con microalgas *sauzal* tres soportes grandes ($1.03 \pm 0.02 \text{ cm}^3$) en una columna de 15 ml de medio y la misma cantidad de células de manera libre en el mismo volumen de medio. Por otro lado se inocularon también 6 soportes pequeños ($0.43 \pm 0.01 \text{ cm}^3$) con la misma cantidad de células *cauce* que de manera libre en 15 ml de medio. El número de células del inóculo *sauzal* fue de $7.7 \times 10^{+06} \pm 2.0 \times 10^{+05}$ por cada 3 soportes, es decir por cada 3.08

$\pm 0.05 \text{ cm}^3$ de soporte en 15ml de medio. Para el cultivo con células libres el número de las mismas y volumen de medio fueron iguales que las anteriores, sin embargo al dividir la cantidad de inóculo en 15 ml, se obtienen $5.26 \times 10^{+05} \pm 1.4 \times 10^{+04}$ células por cada $3.08 \pm 0.05 \text{ cm}^3$. En la Figura 11 se muestra la curva obtenida de la cuantificación de células al día 5, 15 y 19 del experimento. Al final se obtuvo una densidad de $4.7 \times 10^{+06} \pm 4.6 \times 10^{+05}$ células libres por unidad de volumen de medio y de $3.0 \times 10^{+07} \pm 3.0 \times 10^{+05}$ células inmovilizadas por unidad de volumen de soporte.

El inóculo para el experimento con células *cauce* fue de $2.2 \times 10^{+06} \pm 2.6 \times 10^{+05}$ células por cada $2.55 \pm 0.03 \text{ cm}^3$ de poliuretano equivalente a 6 soportes pequeños ($0.43 \pm 0.01 \text{ cm}^3$), mientras que para el experimento con células libres fue de $3.3 \times 10^{+07} \pm 3.9 \times 10^{+06}$ células con referencia al mismo volumen ($0.43 \pm 0.01 \text{ cm}^3$) pero de medio de cultivo, alcanzando un número de $8.6 \times 10^{+07} \pm 6.1 \times 10^{+06}$ en forma libre y $8.7 \times 10^{+07} \pm 7.4 \times 10^{+06}$ en manera inmovilizada al final del experimento, ambos por cada $2.55 \pm 0.03 \text{ cm}^3$ de volumen. La Figura 12 muestra la curva obtenida del experimento con las células *cauce*.

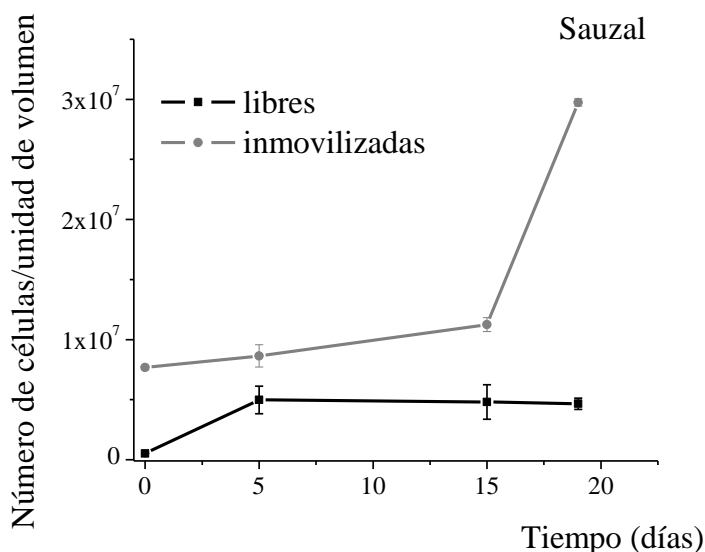


Figura 11. Efecto del volumen del soporte en la concentración de las microalgas aisladas del *sauzal* cultivadas, inmovilizadas y libres.

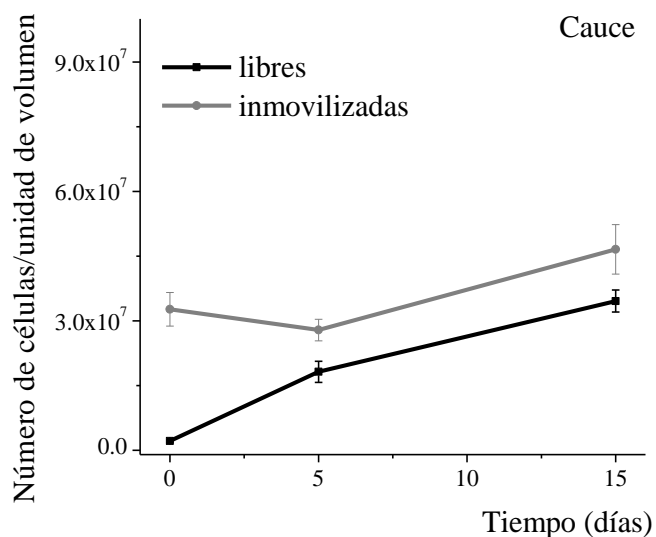


Figura 12. Efecto del volumen del soporte en la concentración de las microalgas *cauce* cultivadas, tanto inmovilizadas como de manera libre.

III. 2. 3. Características de las células inmovilizadas

Una vez seleccionado el tamaño de soporte a emplear en cada uno de los sitios se procedió a producir inóculo suficiente para cada soporte seleccionado. Una vez inoculados se mantuvieron en los medios seleccionados para el crecimiento, reduciéndose el número de especies presentes en los cultivos. Las especies predominantes en los cultivos de El Sauzal y cauce se muestran en las Figuras 13 y 14, respectivamente.

Del total de microalgas de El Sauzal cuantificadas en la cámara de Neubauer se obtuvo que aproximadamente el 37% corresponde a *PseudoNitzschia* sp., el 29% a *Amphora*, el 20% *Nitzschia* sp. el 8% a otra *Nitzschia* sp. y el resto a *Navícula* sp. El porcentaje de *Scendesmus* sp. es las microalgas empleadas en el bioensayo del cauce es

cercano al 70%, *Chlorella* sp. 19%, *Clorococcus* sp. 9% mientras que de diatomeas es cercano al 1%.



Figura 13. Fotografía en microscopio óptico a 100X de las diatomeas que se inmovilizaron para los ensayos de remoción de El sauzal.

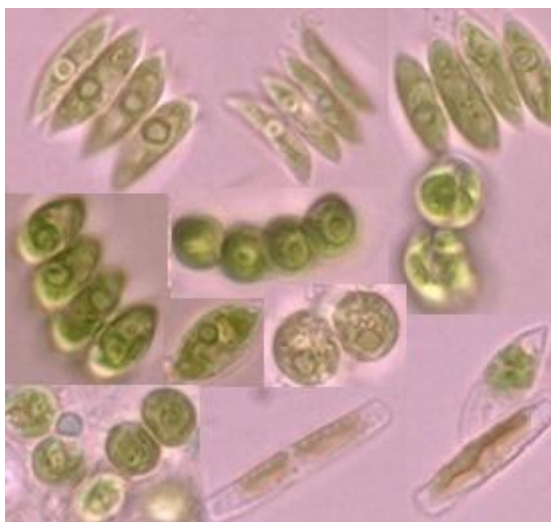


Figura 14. Fotografía en microscopio óptico a 100X de las microalgas del cauce, en su mayoría *Scenedesmus* sp. (parte superior).

Se empleó una densidad celular de $7.6 \times 10^{+06} \pm 1.4 \times 10^{+06}$ células, equivalente a $3.7 \times 10^{+07} \pm 5.6 \times 10^{+06}$ células/soporte, en cada columna empleada en el bioensayo de remoción de metales con elutriados de sedimento de El Sauzal. Para el bioensayo que se efectuó con elutriados de la descarga el gallo, se usó una densidad celular de $4.6 \times 10^{+08} \pm 3.2 \times 10^{+07}$ células, equivalente a $1.5 \times 10^{+07} \pm 1.1 \times 10^{+06}$ células/soporte.

El peso seco unitario de las microalgas empleadas en el bioensayo de El Sauzal fue $2.88 \times 10^{-09} \pm 7.20 \times 10^{-11}$ g/célula, mientras que para las microalgas *cauce* se obtuvieron $7.23 \times 10^{-10} \pm 2.47 \times 10^{-11}$ g/célula.

Tabla V. Valores del crecimiento de las microalgas de los diferentes sitios estudiados y empleadas en los bioensayos con 0, 50 y 100% elutriado a las 24 y 48 horas de exposición. n=3.

Sitio-tiempo	Tasa de crecimiento (días ⁻¹)		
	0%	50%	100%
Cauce 1 día	0.36±0.16	0.46±0.04	0.25±0.09
Cauce 2 días	0.22±0.04	0.16±0.02	0.30±0.04
Sauzal 2 días	0.40±0.04	0.47±0.02	0.52±0.02

Las tasas de crecimiento se muestran en e la Tabla V. Se calcularon diferencias mediante una prueba t, entre los valores de tasa de crecimiento de los cultivos sin elutriado y los de 50 y 100%. En las microalgas *cauce* no hubo diferencia estadística entre las tasas de crecimiento en un día de exposición. (P = 0.251) y (P = 0.251) corresponden a las pruebas entre 0 y 50% elutriado y 0 y 100% elutriado respectivamente; con lo que respecta a los dos días de exposición a metal, no hubo diferencia entre 0 y 50% elutriado (P = 0.052) pero sí entre 0 y 100% elutriado (P = <0.001), alfa = 0.050: 0.996. Con respecto a las microalgas *cauce*, se encontraron diferencias estadísticas entre los valores de 0 y 50%

elutriado y 0 y 100% elutriado a los dos días de exposición al metal, ($P = <0.001$), $\alpha = 0.050$: 0.984 y ($P = <0.001$), $\alpha = 0.050$: 1.000 de manera respectiva.

La tasa de crecimiento en el cauce a las 24 h de exposición a 50% elutriado disminuyó en 26%, mientras que para el de 50% un 7.8% a las 48 h. Con respecto al experimento de 100% elutriado del mismo sitio de estudio se observó un incremento en la tasa de crecimiento aumentó en un 3.17% a las 24 h y en 18.3% a las 48 h. Por otro lado en el experimento de El Sauzal se observó un incremento en la tasa de crecimiento de 22 y 45% a la hora 48 de exposición a elutriados de 50 y 100%, respectivamente.

Con el objetivo de recolectar información útil para la identificación de las microalgas que se emplearon en los ensayos biológicos de remoción de metales, se captaron algunas micrografías de barrido electrónico de muestras celulares. Las cuales se muestran de las Figuras 15 a la 22. La Figura 15 muestra las imágenes de la microscopía electrónica de las diatomeas *sauzal*, las cuales fueron identificadas como *Navicula* sp. y *Nitzschia* sp.

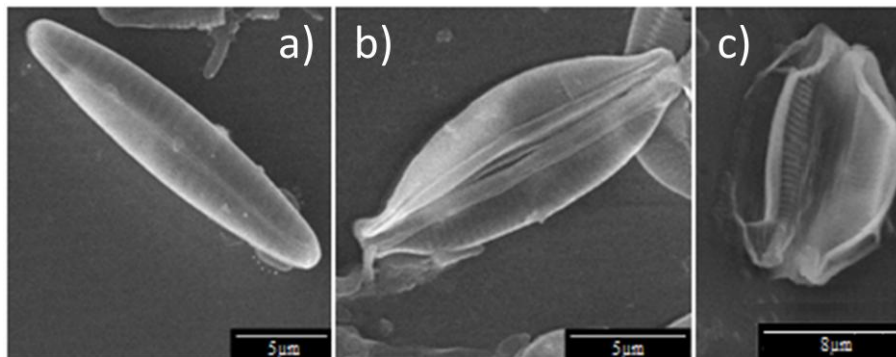


Figura 15. Micrografía de barrido electrónico de las diatomeas aisladas de El Sauzal. a) *Navicula* sp.; b y c) *Nitzschia* sp.

La disposición de las diatomeas inmovilizadas sobre el soporte de poliuretano se puede observar en la Figura 16.

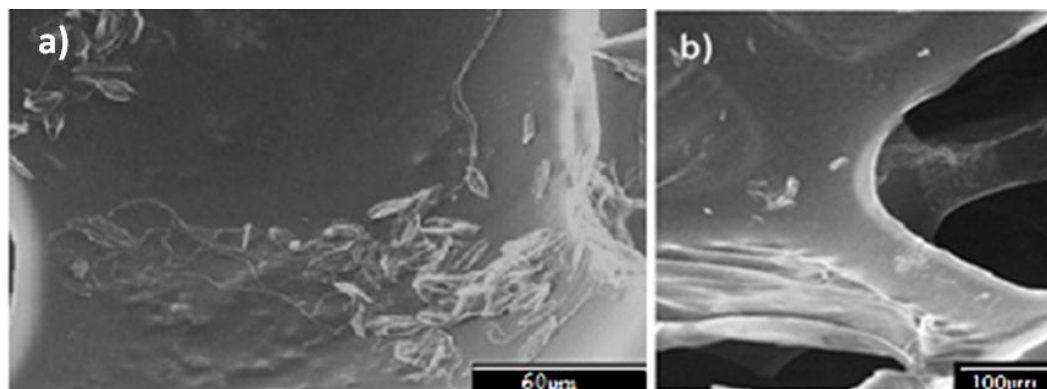


Figura 16. Micrografía de barrido electrónico de microalgas de El Sauzal inmovilizadas a) Diatomeas inmovilizadas en poliuretano a 60 μm y b) una sección inserta del mismo a 100 μm .

De manera similar se caracterizaron las muestras de la bioprospección inicial del cauce, observándose en el registro de microscopía electrónica de barrido (Figura 17) también la presencia de diatomeas *Navicula* sp. y *Nitzschia* sp., y un número de Clorofitas representadas por *Scenedesmus* sp., así como cianobacterias. Se observa la presencia de la Clorofita, *Scenedesmus* sp. abundante sobre el soporte de poliuretano de la micrografía inferior. Los diferentes ensayos realizados con las muestras de esta bioprospección inicial en el cauce, así como los ensayos previos de crecimiento fue un factor importante para continuar los bioensayos con *Scenedesmus* sp.

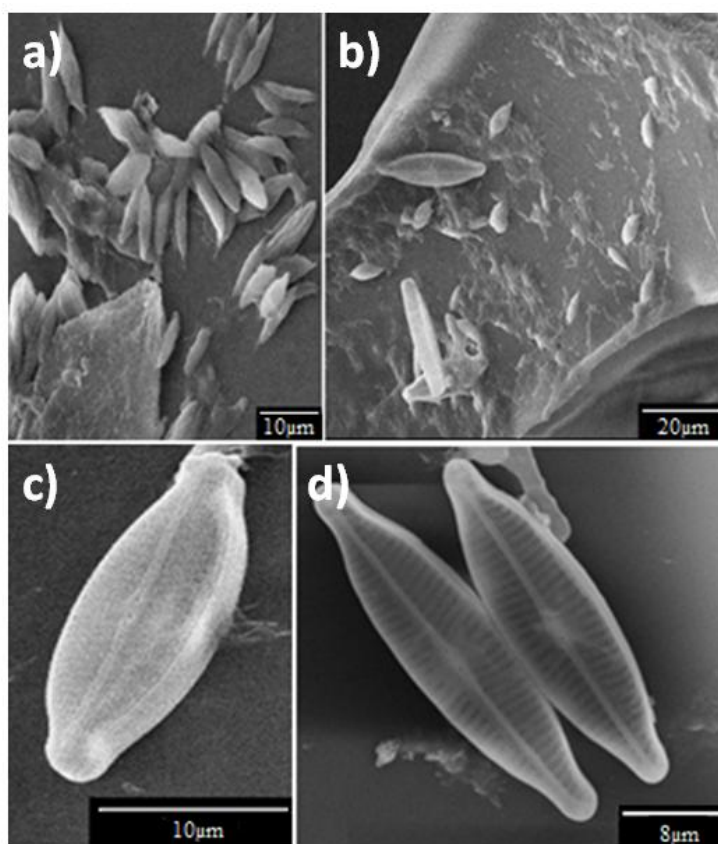


Figura 17. Micrografías de barrido electrónico de las microalgas inmovilizadas sobre el soporte de poliuretano utilizado en la remoción de metales del cauce. En la parte superior se observan diatomeas y en a) *Scenedesmus* sp; La inmovilización de las microalgas sobre el poliuretano se observa en b). Mientras c) y d) corresponden a diatomeas.

La trama interna del poliuretano utilizado como soporte para la inmovilización de las microalgas y la formación de biopelículas utilizadas en este estudio se muestra mediante microscopía electrónica de barrido en la Figura 18 a) y b).

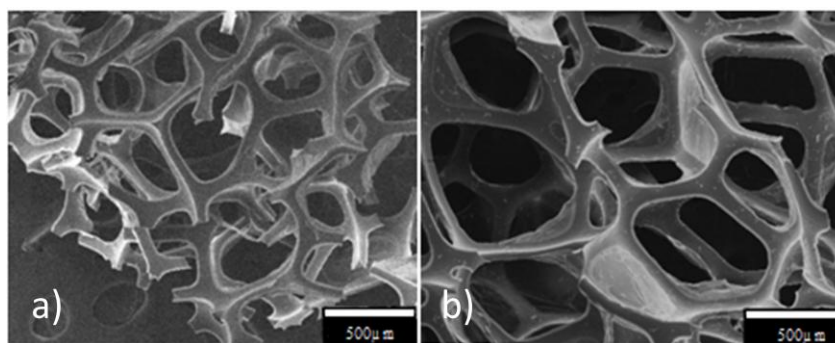


Figura 18. Micrografías de barrido electrónico de la parte interna soporte del utilizado en la inmovilización de microalgas para los bioensayos de biorremoción de metales pesados e inducción a la biosíntesis de metalotioninas. Se observan dos secciones del poliuretano a 500 μm (a y b).

De los perfiles pigmentarios obtenidos de las células empleadas en los bioensayos, se observan pigmentos producidos por microalgas verdes como *Scenedesmus* sp., que predominó en el ensayo (Figura 19). Se muestran el tiempo de retención correspondiente al pico de violaxantina, alrededor de los 12 minutos (Stón y Kosakowska, 2002; Louda *et al.* 2002), el del β caroteno aparece alrededor de los 20 minutos (Stón y Kosakowska, 2002; (Kosakowska *et al.* 2002) y a los 36 minutos (Louda *et al.* 2002; Louda, 1998). La luteína se detectó alrededor del minuto 22 de acuerdo a Louda *et al.* (2002 y 2006). Los hombros correspondientes a la clorofila *b* se obtuvieron en un tiempo de retención alrededor de 30 minutos (Hgerthey *et al.* 2006). Finalmente, a un tiempo de retención cercano a 40 minutos, aparece el pico pronunciado correspondiente a ésteres de astaxantina de acuerdo con Bustillo-Guzmán *et al.* (2004).

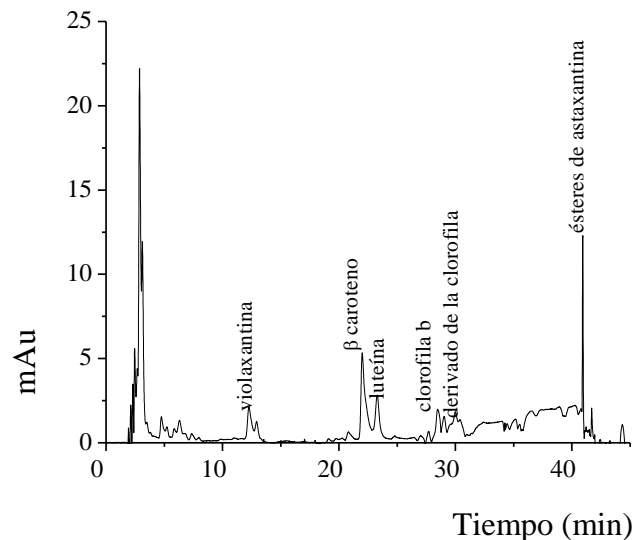


Figura 19. Perfil de pigmentos obtenido mediante HPLC a partir de la extracción con acetona 100% efectuado a las microalgas *cauce*.

Con lo que respecta a la Figura 20 se muestra el perfil pigmentario de las microalgas empleadas en el bioensayo de El Sauzal. La clorofila *c* se observa a un tiempo de retención alrededor de 8 minutos (Stón y Kosakowska, 2002; Kosakowska *et al.* 2002). La fucoxantina se detectó a los 9, 9.78 y 13 minutos aproximadamente (Stón y Kosakowska, 2002; Hgerthey *et al.* 2006; Kosakowska *et al.* 2002). El pico más pronunciado en el cromatograma, a los 20 minutos pertenece al β caroteno (Stón y Kosakowska, 2002; Kosakowska *et al.* 2002), un hombro adicional cercano a 22 se refiere al mismo pigmento. Finalmente se observó un ligero hombro alrededor del minuto 28 correspondiente a clorofila *a* (Hgerthey *et al.* 2006).

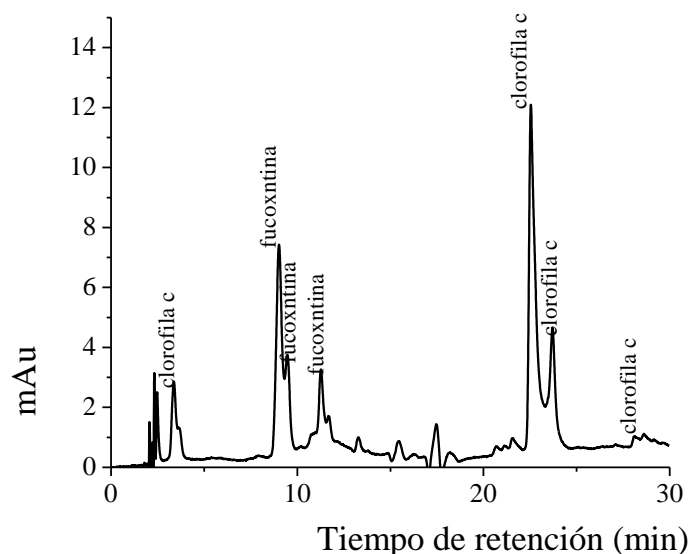


Figura 20. Perfil de pigmentos obtenido mediante HPLC a partir de la extracción con acetona 100% efectuado a las microalgas *sauzal*.

Los perfiles pigmentarios descritos a partir de los cromatogramas así como de los registros respectivos de espectroscopia UV-Vis permitieron cuantificar el contenido de clorofila de la biomasa empleada para los bioensayos de remoción. Se obtuvo que de un número de $1.06 \times 10^{08} \pm 1.73 \times 10^{06}$ células para *cauce* y de $2.43 \times 10^{06} \pm 2.24 \times 10^{05}$ de células *sauzal*, que corresponde, en el caso del cauce, a $7.17 \times 10^{-11} \pm 1.18 \times 10^{-12}$ μmol clorofila *a*/célula, mientras que en las diatomeas *sauzal* se cuantificó la clorofila *c* y se obtuvo un valor de $9.34 \times 10^{-09} \pm 7.74 \times 10^{-10}$ μmol clorofila *c*/célula. Se calculó también el valor la clorofila *b* para ambos sitios, siendo de $5.84 \times 10^{-11} \pm 9.62 \times 10^{-13}$ μmol clorofila/células *cauce* y $1.26 \times 10^{-09} \pm 1.04 \times 10^{-10}$ μmol clorofila/células *sauzal*.

III. 3. Bioensayos de remoción de metales pesados

III. 3. 1. Características de los medios

Los medios experimentales se formularon con efluente colectado en la descarga de agua residual El Gallo así como con agua del sitio bioprospectado de El Sauzal de los cuales se colecto el sedimento para la preparación de los elutriados respectivos en una proporción de 0:100, 50:50 y 100:0 (v/v). El potencial de hidrógeno del efluente empleado fue inicialmente de 7.44 ± 0.006 y del agua de mar fue 7.73 ± 0.05 . Al final de los bioensayos con microalgas *cauce*, el pH incrementó a 9.46 ± 0.31 en el elutriado del 0%, a 9.8 ± 0.12 en 50% y a 9.73 ± 0.17 en elutriado de 100%. Los valores de los controles fueron de 8.30 ± 0.02 , 8.35 ± 0.11 y 8.41 ± 0.01 , en los experimentos de 0, 50 y 100% elutriado respectivamente. Los valores del experimento con elutriado de 0, 50 y 100% del cauce al final del mismo fueron de 7.23 ± 0.08 , 7.51 ± 0.07 y 7.80 ± 0.06 de manera respectiva.

En el efluente colectado se registro una salinidad de 2 ppm, mientras que en el agua de mar empleada en el ensayo biológico fue de 35 ppm, las cuales se consideraron en todos los bioensayos correspondientes para cada sitio.

De los elutriados realizados se obtuvieron las concentraciones de Cu, Fe, Mn y Zn que se presentan en Tabla VI.

Tabla VI. Concentraciones de cada metal analizado de los elutriados elaborados de muestras de El Sauzal y del cauce.

Metal-% de elutriado	Cantidad de metal por sitio (mg/l)	
	Sauzal	Cauce
Cd 0	0.01±0.00*	0.01±0.00*
Cd 50	0.01±0.00*	0.01±0.00*
Cd 100	0.01±0.00*	0.01±0.00*
Cu 0	0.20±0.17	0.14±0.04
Cu 50	0.38±0.14	0.14±0.04
Cu 100	0.67±0.11	0.11±0.02
Fe 0	0.26±0.03	**
Fe 50	0.32±0.21	**
Fe 100	0.23±0.02	**
Mn 0	0.06±0.01	0.06±0.01
Mn 50	0.79±0.04	0.25±0.01
Mn 100	1.44±0.28	0.43±0.03
Zn 0	0.12±0.04	0.13±0.08
Zn 50	0.12±0.04	0.12±0.04
Zn 100	0.16±0.04	0.09±0.03

*Valores fuera del límite de detección del equipo, ** Valores no determinados.

III. 3. 2. Remoción de metales

La remoción de metales para cada sitio, se conceptualizó en éste trabajo como el total de metal (mg) retirado del medio (l) con elutriados por el sistema microalga soporte. La Figura 21 muestra los bioensayos de remoción de Cu, Fe, Mn y Zn de los bioensayos efectuados con microalgas *sauzal* en la matriz de agua marina con 0, 50 y 100% de elutriado.

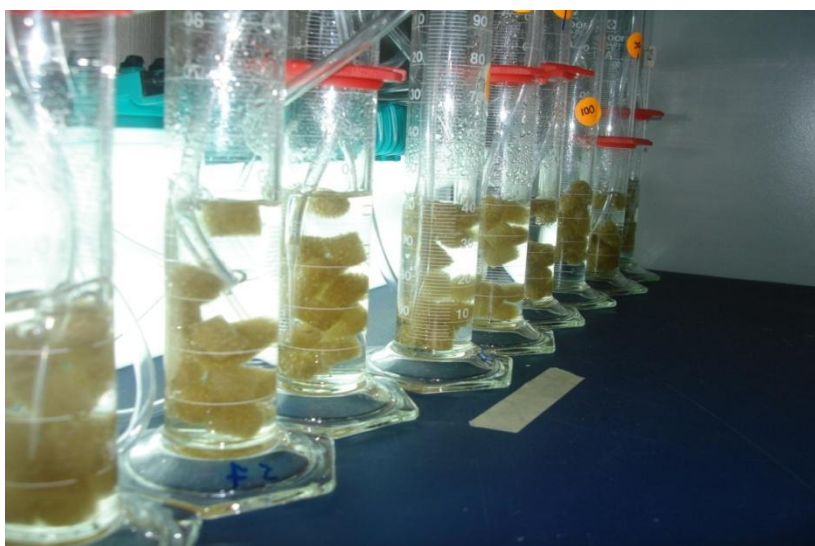


Figura 21. Vista del experimento realizado con elutriado para los bioensayos de remoción de metales de El Sauzal donde se observan los inmobilizados de las diatomeas en las columnas de cultivo expuestas a luz fría y aireación baja.

La Figura 22 presenta el bioensayo de remoción de Cu, Mn y Zn con las células *cauce* observándose los inmobilizados con la Clorofita *Scenedesmus* sp.

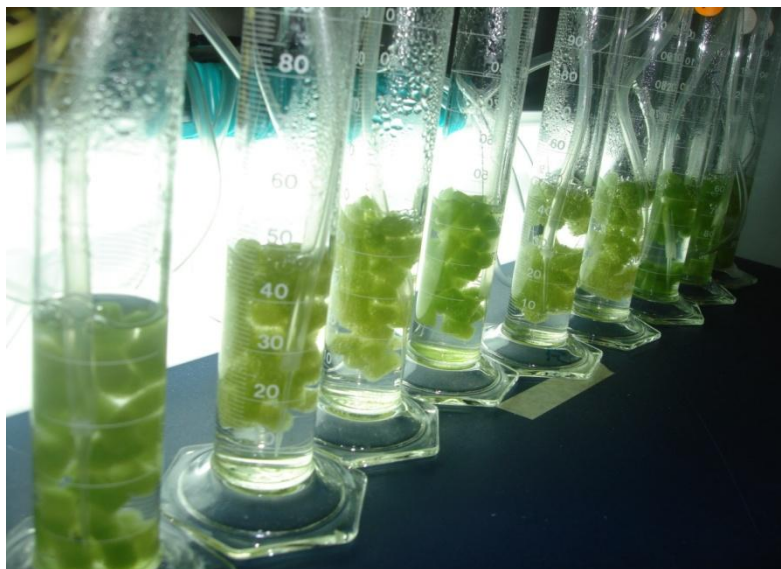


Figura 22. Fotografía de los sistemas empleados en el bioensayo de remoción de metales e inducción a la acumulación de MT III utilizando los elutriados y microalgas del cauce.

La cantidad de cadmio presente en el elutriado en el respectivo cultivo estuvo fuera del límite de detección del equipo empleado, el cual se obtuvo del triple de la desviación estándar de 10 mediciones, efectuadas a la concentración más baja de metal estándar empleada en la curva de calibración del equipo.

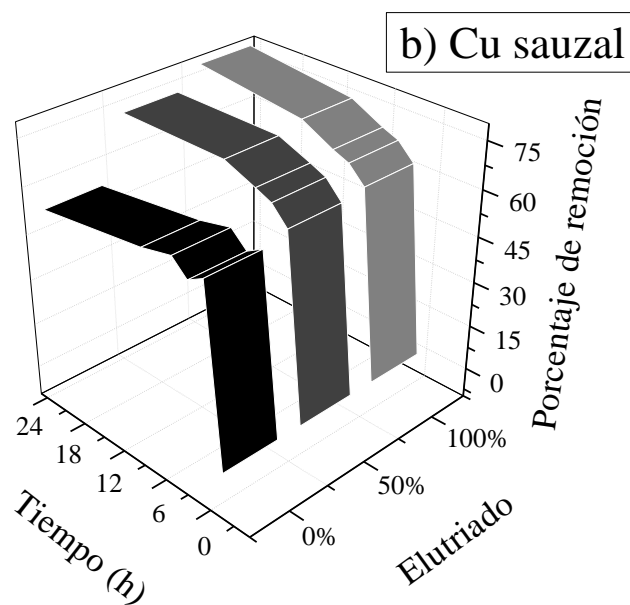
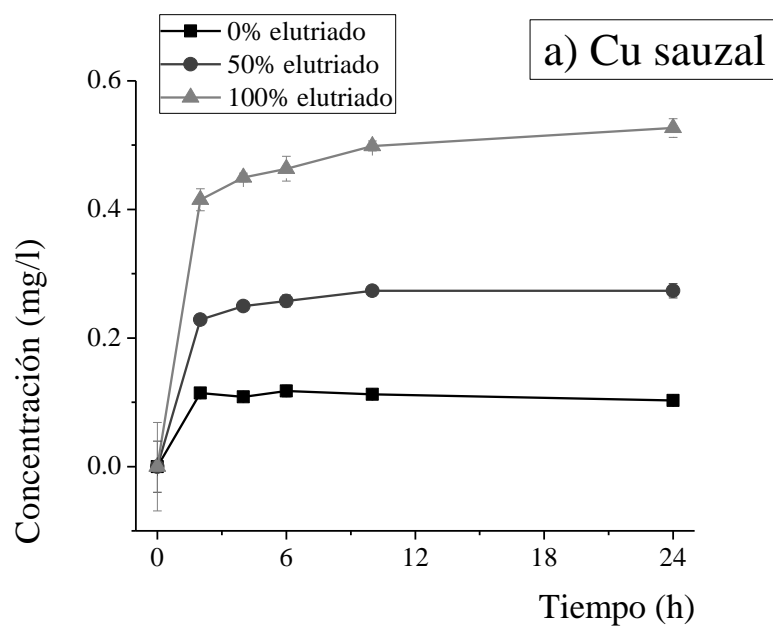


Figura 23. Cinética de remoción de cobre en miligramos por litro (a) y porcentaje de remoción del mismo metal (b), con microalgas *sauzal* en 24 horas, respectivamente.

En las Figuras 23 a y b se exponen los resultados de remoción de cobre en mg/l y en porcentaje respectivamente, realizado con microalgas *sauzal*. La remoción máxima ocurrió a la hora 6 para el bioensayo sin elutriado con 0.122 ± 0.004 mg/l que corresponde a un 62% (62.4 ± 1.8) del total del cobre inicial. Respecto a la mezcla de 50% elutriado se observó una remoción de 0.27 ± 0.01 mg/l, equivalente a un 72% (72.7 ± 1.9) a la hora 8 del ensayo. El máximo de remoción del elutriado 100% se presentó a la hora 24, siendo removido aproximadamente un 79% de cobre (79.0 ± 2.2) correspondiente a 0.53 ± 0.02 mg/l.

Con respecto a la prueba t efectuada se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P=0.048$) entre la cantidad de metal removida en el tiempo 0 y 24 del bioensayo de 0% elutriado. Los máximos de remoción mencionados fueron los correspondientes al experimento con 50% elutriado. Sin embargo sí se observaron diferencias al contrastar los valores del tiempo inicial y a la hora 4 y 6 ($P=<0.001$), del ensayo de 100% elutriado.

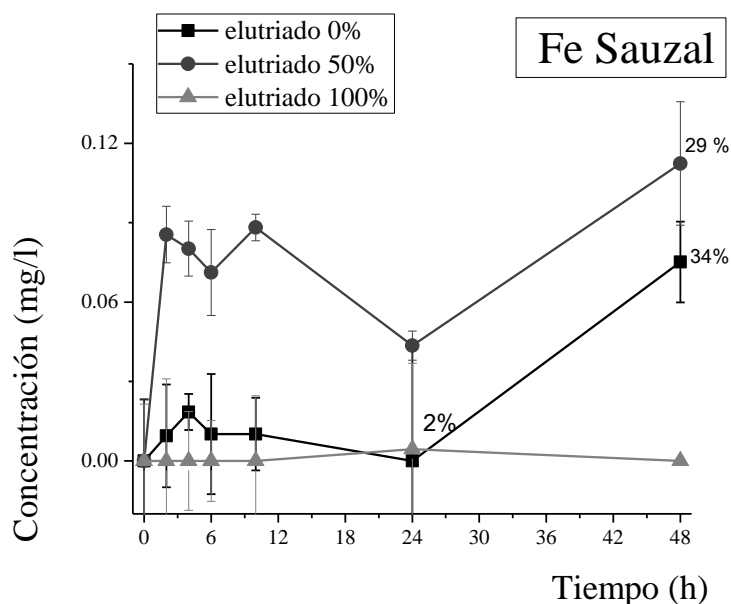


Figura 24. Cinética de remoción del Fe en mg/l del bioensayo con microalgas *sauzal* en 48 horas.

Las Figura 24 muestra el máximo de remoción de Fe en el experimento con 0% elutriado a la hora 48, el cual correspondió a $28.6 \pm 5.8 \%$ (0.08 ± 0.02 mg/l). En el experimento de 50% el máximo también se presentó al final, $34.69 \pm 7.21\%$ equivalente a una concentración de Fe de 0.11 ± 0.02 mg/l. Finalmente en el caso del ensayo de 100% elutriado el máximo se presentó al inicio, obteniendo un 1.92% , 0.004 ± 0.033 mg/l de Hierro.

Sólo se observó diferencia de significancia estadística entre los valores iniciales y a la hora 6 de remoción de hierro en el ensayo que contuvo 100% de volumen de elutriado, con una $P=0.013$.

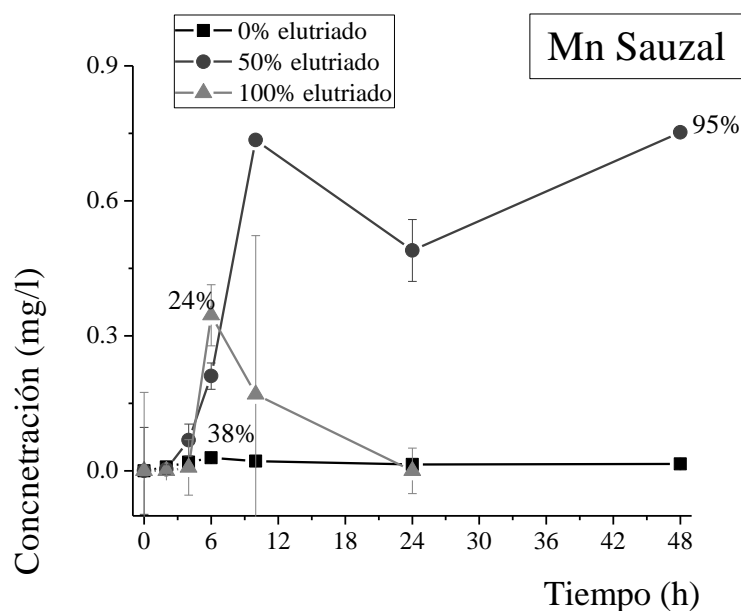


Figura 25. Muestra la de remoción del Mn con microalgas de *sauzal* expuestas a los elutriados.

En la Figura 25 se pueden observar los máximos de remoción, en el caso del experimento con cero elutriado ocurrió a la hora 10, cuyo porcentaje de remoción fue de $37.54 \pm 7.4.33$ % del total del manganeso presente en la columna de medio (0.022 ± 0.002 mg/l). El ensayo efectuado con 50 % elutriado, registro una remoción de 94.8 ± 0.7 %, correspondiente a 0.752 ± 0.006 mg/l. Con lo que respecta al experimento que consistió sólo de elutriado, la máxima cantidad de metal removida, 0.35 ± 0.07 mg/l exhibió 24.1 ± 4.7 % a la 8 del ensayo.

Una vez efectuada la prueba t, se observó diferencia significativa ($P=0.049$) entre los valores iniciales y a la hora 10 del ensayo 50% elutriado.

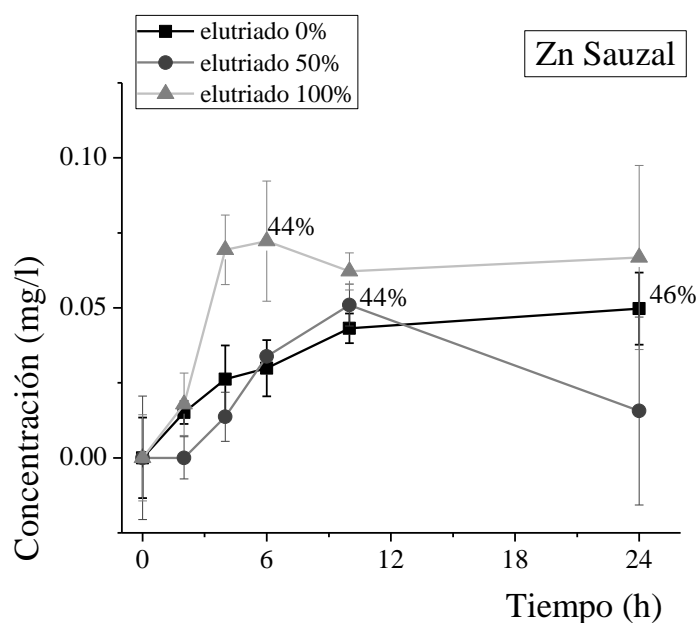


Figura 26. Remoción del Zn utilizando las muestras y diatomeas *sauzal* cultivadas en medios con elutriados en 24 horas.

Los resultados de los bioensayos de remoción de Zn se muestran en la Figura 26 de la cual se observan los máximos de remoción a la hora 24 del experimento. La muestra carente de elutriado presento un porcentaje de remoción de $45.7 \pm 8.2\%$, 0.05 ± 0.01 mg/l del mencionado metal. Al mismo tiempo se observó el máximo de remoción en el ensayo con 50% de elutriado igual a 0.051 ± 0.007 mg/l equivalente al $44.15 \pm 6.06\%$ del total del Zn presente inicialmente. Con lo que resta al ensayo que contuvo 100% de elutriado, el máximo ocurrió en la hora 6, con un remoción de $44.3 \pm 12.3\%$ y a una concentración de 0.07 ± 0.02 mg/l.

Se realizó un prueba t entre los valores de remoción a la hora 0 y el resto de la cinética y se observó diferencia estadísticamente significativa en la hora 24 ($P=0.034$), correspondiente al ensayo sin elutriado. Otra diferencia se observó entre la hora 6 y el inicio del experimento de 100% elutriado ($P=0.012$).

Los bioensayos realizados para evaluar la capacidad de las microalgas *cauce* inmovilizadas y con 0, 50 y 100% de elutriado correspondiente al volumen total del medio para remover cobre se muestra en la Figura 27.

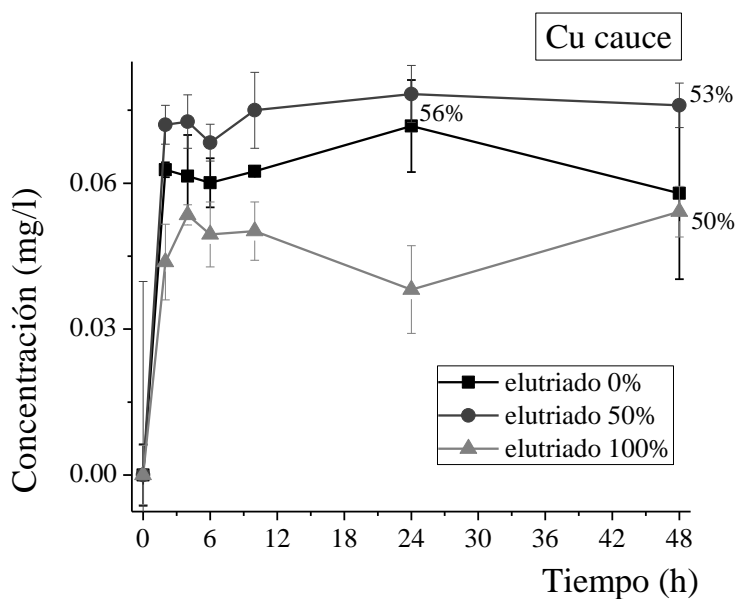


Figura 27. Grafica de resultados de los bioensayos de remoción de Cu con microalgas cultivadas en elutriado del cauce en 48 horas.

Los máximos y porcentajes respectivos de remoción de Cu en mg/l con microalgas *cauce* se presentan en las Figura 27. La máxima remoción de Cu en el ensayo sin elutriado ocurrió en la hora 48 y fue igual a 0.073 ± 0.004 mg/l equivalentes a $52.7 \pm 2.6\%$ del metal removido. Se observó el punto máximo de remoción en el experimento de 50% elutriado al mismo tiempo que el anterior, de $54.3 \pm 3.3\%$ correspondiente a 0.076 ± 0.005 mg/l. Finalmente, del elutriado 100 % se obtuvo una remoción de $50.07 \pm 4.81 \%$ a una concentración de 0.054 ± 0.005 mg/l.

Una vez efectuada la prueba t, se encontraron diferencias de significancia estadística entre los valores de remoción en tiempo cero y a la hora 6 ($P=0.035$) y 24 ($P=0.016$) del experimento sin elutriado. Se obtuvieron diferencias estadísticas con lo que respecta a la comparación realizada entre los valores iniciales y de la hora 4($P=0.027$), 6($P=0.047$), 10($P=0.033$), 24($P=0.011$) y 48($P=0.011$) del ensayo con 50% elutriado. Finalmente hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la hora cero y la hora 2($P=0.043$), 4($P=0.002$), 6($P=0.013$) y 48($P=0.004$) del experimento con 100% elutriado.

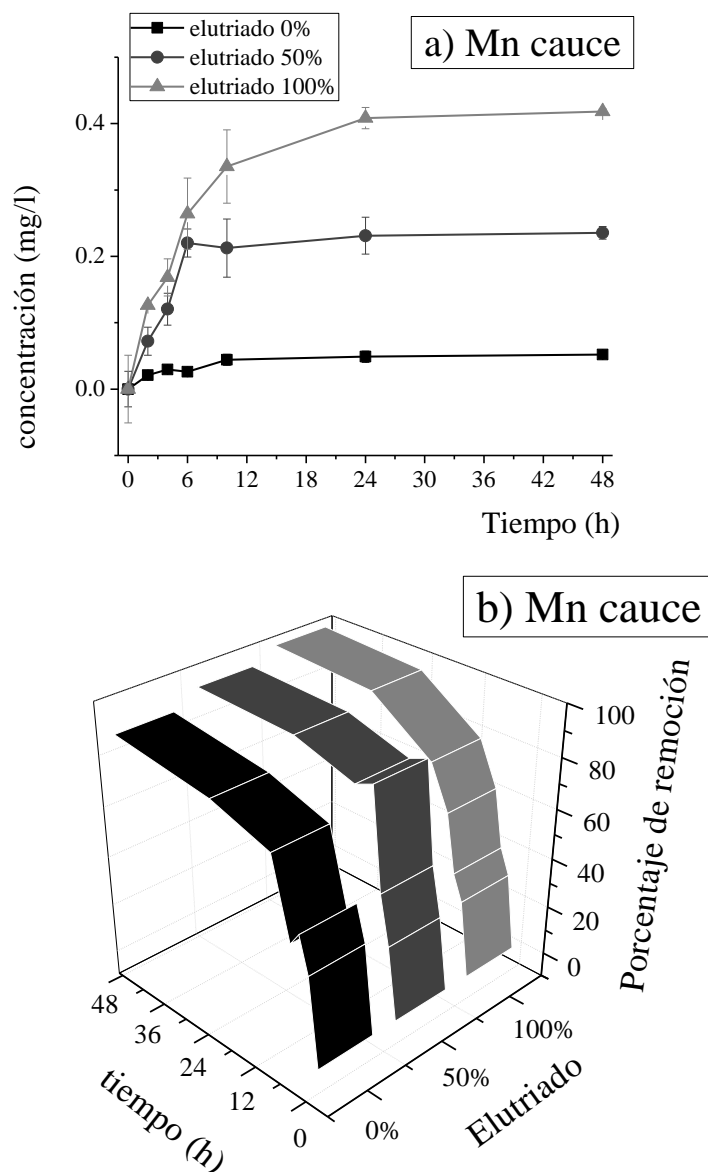


Figura 28. Resultados de los bioensayos de remoción de Mn efectuado por microalgas *cauce* (a) y al porcentaje de remoción del mismo metal y sitio (b), ambos después de 48 horas de cultivo.

Los máximos de remoción de Mn para los tres ensayos se observaron al final del experimento (Figura 28 a), oscilando de un 86 a 97% (Figura 28 b). El ensayo sin elutriado arrojó $86.70 \pm 8.64\%$ de manganeso removido equivalente a 0.052 ± 0.005 mg/l. Los inmobilizados expuestos a 50 % de elutriado, registraron $92.7 \pm 3.8\%$ igual a 0.235 ± 0.010 mg/l de Mn. En los cultivos con 100 % de elutriado se registro $97.6 \pm 1.0\%$ de remoción, correspondiente a 0.418 ± 0.004 mg/l.

Una vez que se aplicó un prueba t entre los valores observados al tiempo cero de remoción y el resto del ensayo se encontraron diferencias de importancia estadística al contrastar con la hora 2(P=0.047), 4(P= 0.010), 10 (P=0.004), 24 (P=0.002) y 48(P=<0.001), lo anterior para el ensayo son elutriado. Para el ensayo que consistió en 50% del volumen de elutriado, se observó que entre los valores del tiempo cero y la hora 4(P=0.008), 6(P=0.008), 10 (P=0.003) y 24(e =<0.001) hubo diferencias estadísticamente significativas. Con lo que respecta al ensayo que contuvo medio compuesto por sólo elutriado se observaron diferencias entre los valores de remoción iniciales y la hora 4(P=0.004), 6(P=0.002) y 10(P=0.001).

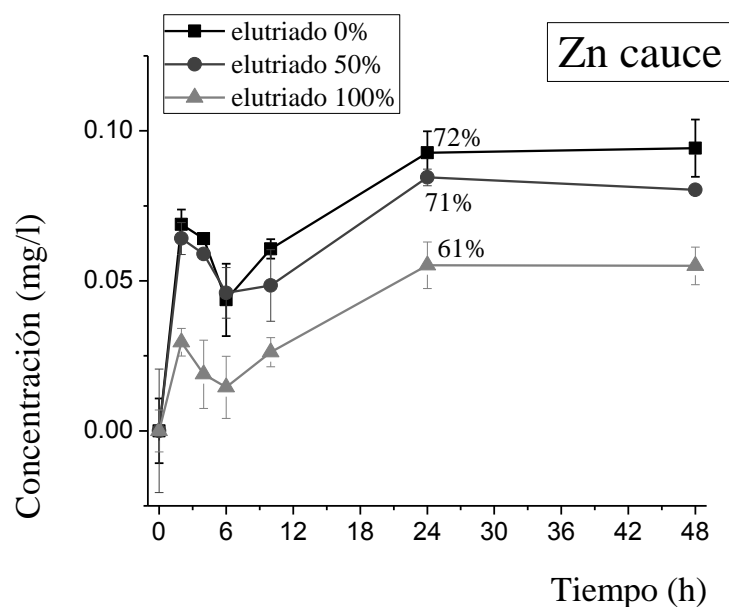


Figura 29. Remoción de Zn efectuada con microalgas inmobilizadas utilizando elutriados y agua del cauce en un bioensayo de 48 horas.

En la Figura 29 se observan el máximo porcentaje de remoción del Zn en el experimento con 0% elutriado de 72.2 ± 7.3 % equivalente a 0.09 ± 0.01 mg/l, al final del ensayo. Mientras que para el de 50% elutriado fue de 71.01 ± 2.32 %, y una concentración de 0.085 ± 0.003 mg/l a las 24 horas. Por último, el tercer experimento, de 100% elutriado, presentó una remoción máxima a partir de la hora 24 del mismo, igual a 61.4 ± 8.7 % equivalente a 0.06 ± 0.01 mg/l.

La prueba t aplicada entre los valores de remoción de Zn iniciales y con el resto del ensayo arrojaron diferencias estadísticamente significativas a la hora 6 ($P=0.043$), 24 ($P=0.043$) y 48 ($P=0.049$) del experimento sin elutriado. Con respecto al que se adiciono el 50% de elutriado correspondiente al volumen se encontraron diferencias sólo con respecto a la hora 2 del mismo con un valor de $P= 0.003$. Finalmente sólo se observó diferencia de significancia estadística con respecto a los valores de remoción de la hora 4 del experimento de 100% elutriado, siendo $P=0.037$.

III. 3. 3. Comparación de máximos de remoción total de metales

La comparación de los máximos de concentraciones removidas para cada metal en función de los elutriados en cada sitio investigado (Figuras 30 y 31), se registró para el caso de El Sauzal (Figura 30) que en el 100% de elutriado se logró remover mayor cantidad de Cu, seguido del Mn y finalmente en Zn. Con lo que respecta al experimento con 50% elutriado, se identificó una remoción mayor de Mn, seguido por el Zn y finalmente Fe. En el 0% elutriado se removió en mayor cantidad el Cu, seguido por el Fe y el Zn. Por lo que se concluye el siguiente orden de remoción: para el elutriado 100% de $Cu > Mn > Zn$, para el elutriado de 50% de $Mn > Zn > Fe$ y finalmente en el experimento sin elutriado de $Cu > Fe > Zn$.

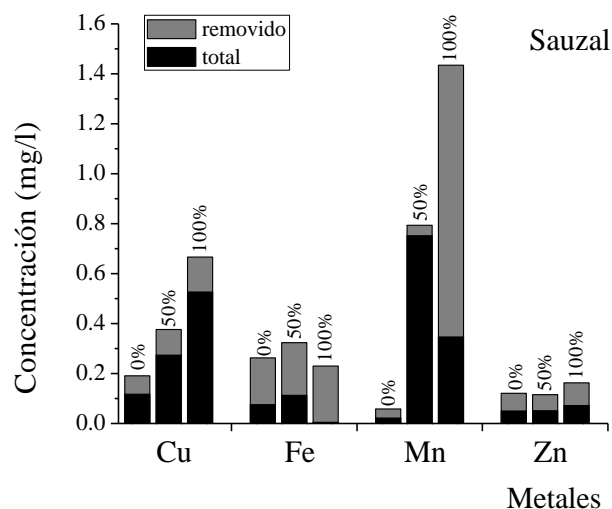


Figura 30. Concentraciones totales de cada metal y la concentración máxima removida, por microalgas utilizando 0, 50 y 100% de elutriado de El Sauzal.

En la Figura 31 se observa la comparación entre los máximos de remoción en el caso del ensayo del cauce. El orden de remoción de acuerdo a la cantidad de metal removida en los elutriados de 100, 50 y 0% fue: Cu > Zn > Mn.

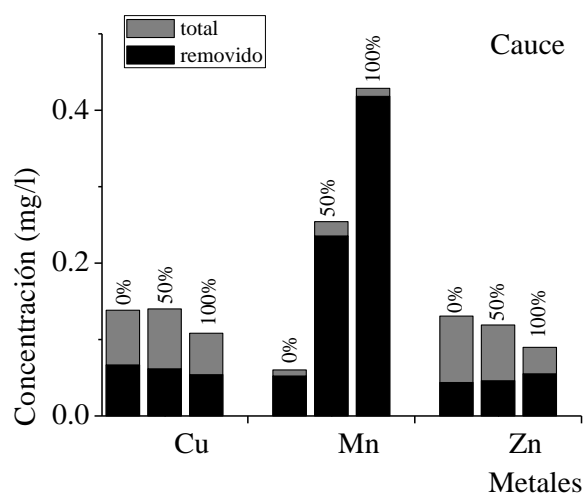


Figura 31. Muestra las concentraciones totales de metal y la concentración máxima removida de los experimentos con 0, 50 y 100% de elutriado del cauce.

III. 3. 4. Absorción total (soporte + microalga)

La estimación de la absorción total, es decir la cantidad de metal absorbido (g) por peso seco de microalga más el soporte de inmovilización, se determinó para cada sitio de estudio de acuerdo a Volesky (1990). Los valores de la absorción total, considerando el total de los absorbentes en peso seco, al 1 y 2 días de tratamiento del cauce y en dos días para El Sauzal, se muestran en las Tablas VI y VII, respectivamente.

Tabla VI. Absorción en mg metal/mg de célula + soporte, en el bioensayo del cauce. Se observan los valores de los elutriados 0, 50 y 100% a las 24 y 48 h de exposición.

Elutriado	Cu	Mn	Zn
24 h			
0%	10.4 ± 0.6	7.1 ± 0.4	13.5 ± 0.7
50%	10.3 ± 0.8	33.2 ± 2.7	12.1 ± 1.0
100%	5.6 ± 0.1	59.5 ± 2.0	8.0 ± 0.3
48 h			
0%	9.7 ± 0.4	7.0 ± 0.3	12.8 ± 0.5
50%	10.8 ± 0.5	32.1 ± 1.4	11.7 ± 0.5
100%	4.7 ± 0.1	50.7 ± 1.4	6.8 ± 0.2

Como se puede observar en la Tabla VI, los máximos de absorción se presentaron en los experimentos de elutriados 50%, excepto en el caso del manganeso en el que la máxima ocurrió en el 100% elutriado. Sin embargo en todos los casos la absorción que ocurre a las 24 h es mayor que la que ocurre a las 48h.

Tabla VII. Absorción en mg metal/mg de célula + soporte, en el bioensayo de El Sauzal, se muestran los valores de los elutriados 0 y 50% a la hora 48 de exposición.

Elutriado	Cu	Fe	Mn	Zn
48 h				
0%	7.9 ± 0.4	5.2 ± 0.2	1.05 ± 0.05	0.51 ± 0.02
50%	17.0 ± 0.5	2.4 ± 0.1	47.8 ± 1.4	0

A diferencia del experimento del cauce, el máximo de absorción ocurrió en el elutriado 0%, es decir el soporte con microalgas removió más cantidad de metal de la columna de medio sin elutriado que aquellos que sí contenían, excepto en el caso del

manganeso en el que como en experimento del cauce, la cantidad removida fue mayor en el experimento 50% que en el 0% elutriado. Los valores de absorción mencionados con anterioridad se pueden observar en le Tabla VII.

III. 3. 5. Biorremoción microalgal

La biorremoción calculada se muestra en las Figuras 32 y 33 cuyos máximos, es decir la cantidad de metal removido por la biomasa microalgal, diferencia entre lo absorbido por el soporte y la remoción total de la biomasa inmovilizada, en los experimentos del cauce y El Sauzal respectivamente.

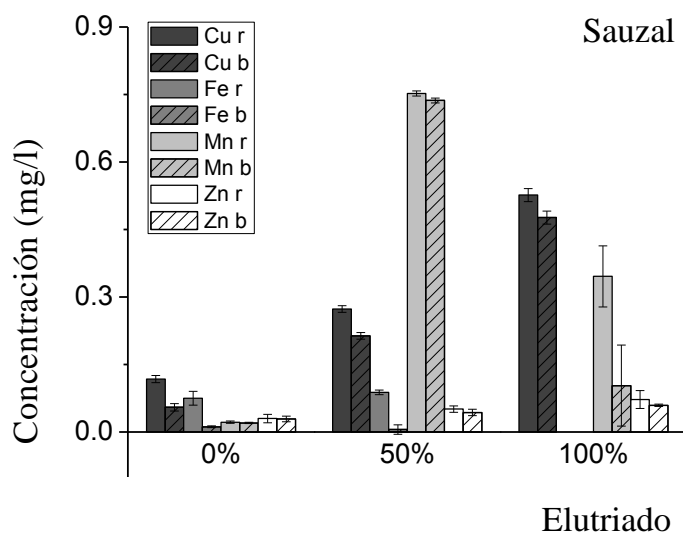


Figura 32. Remoción del metal total (r, microalga + soporte) y biorremoción de metales con microalgas inmovilizadas (b). La Figura corresponde a los máximos de remoción de metales en elutriados 0, 50 100% en el bioensayo de El Sauzal.

En la Figura 32 se observa que el caso del Cu removido mediante microalgas de El Sauzal el valor total bioabsorbido en el experimento con 0% elutriado es de 0.06 ± 0.01 mg/l que sería equivalente a 46.8% del total removido. En el elutriado de 50% la biorremoción fue de 0.21 ± 0.01 mg/l correspondiente al 78% del total removido. Finalmente en el elutriado de 100% se logró remover por medio de biomasa el 90.5% del total de metal.

En lo que respecta el hierro se logro remover mediante biomasa un 15 y 6% equivalentes con 0.012 ± 0.002 y 0.005 ± 0.011 mg/l (Figura 32), de manera correspondiente con los experimentos de elutriados 0 y 50%.

El Mn fue bioabsorbido en 91.9 y 97.9%, 0.0201 ± 0.0014 mg/l (Figura 32) y de manera respectiva, mientras que para el experimento de 100% elutriado el porcentaje bioabsorbido fue menor de 29.7% es decir 0.10 ± 0.09 mg/l, lo anterior se observa en la Figura 35.

La biorremoción del Zn con microalgas *sauzal*, como se muestra en la Figura 32, fue de 97.2% equivalente a 0.03 ± 0.01 mg/l en el experimento con 0% elutriado, de 85% igual a 0.04 ± 0.01 mg/l en 50% elutriado y finalmente de 82% correspondiente a 0.059 ± 0.003 mg/l del total removidos en el experimento con 100% elutriado.

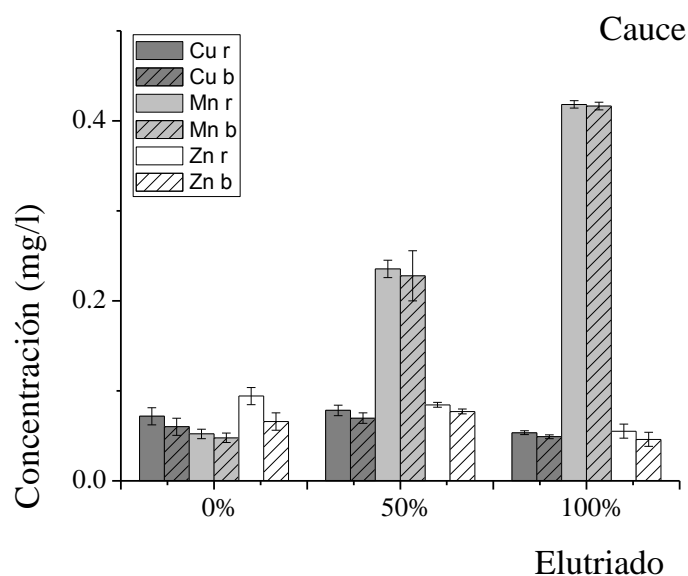


Figura 33. Remoción del metal total (r), es decir microalga más soporte; biorremoción de metales con microalgas inmovilizadas (b). La Figura corresponde a los máximos de remoción de metales en elutriados 0, 50 100% en el bioensayo del cauce.

Con lo que respecta al Cu (Figura 33), los valores de biorremoción en el elutriado de 0% fueron de 0.06 ± 0.01 mg/l equivalente a un 83.8% del total removido. En el experimento de 50% elutriado se biorremovieron 0.07 ± 0.01 mg/l, correspondieron a 89% del total removido. Finalmente en el experimento de 100% elutriado se removieron mediante biomasa *cauce* 0.049 ± 0.002 mg/l, es decir el 91.6% del total removido.

Con lo que respecta al Mn, en la Figura 33 se puede observar que los valores oscilaron entre el 91 y 99% de remoción mediante biomasa del cauce. En el experimento de 0% elutriado se biorremovieron 0.048 ± 0.005 mg/l esto es el 91.7% del total removido. Se lograron remover mediante biomasa 0.23 ± 0.03 mg/l equivalente con 96.7% del total removidos. Por último se logro biorremover un 99.6%, es decir 0.417 ± 0.004 mg/l.

Con respecto al Zn removido mediante biomasa *cauce* (Figura 33), se obtuvo que en el elutriado de 0% se biorremovieron 0.07 ± 0.01 mg/l equivalentes a 70% del total removido. En el experimento de 50% elutriado se obtuvo un total de 91.2% de Zn

biorremovidos, es decir 0.077 ± 0.003 mg/l. con lo que concierne al experimento de 100% elutriado un 83.5% fue removido mediante biomasa, lo que equivale a 0.05 ± 0.01 mg/l.

III. 3. 6. Identificación de MT III y GSH

Se inyectaron en HPLC muestras de los reactivos empleados en el proceso de extracción, reducción y derivatización de grupos tioles (Figura 34) con la finalidad de descartar picos diferentes a MT III y GSH, se inyectó además cisteína (Figura 35) y glutatión (Figura 36). Todos los anteriores fueron obtenidos siguiendo el método de Rijstenbil y Wijnholds (1996) con algunas modificaciones de Morelli (2008) y fueron detectados mediante fluorescencia.

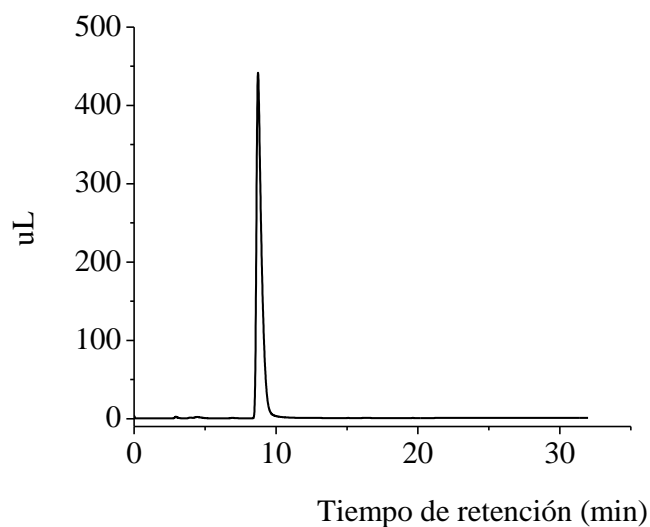


Figura 34. Cromatograma en HPLC de los reactivos empleados en la determinación de MT III y GSH.

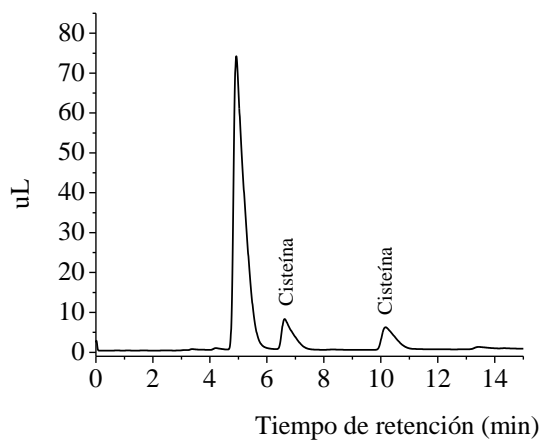


Figura 35. Cromatograma en HPLC de la cisteína. Se muestran unidades de luminiscencia y tiempo de retención en minutos.

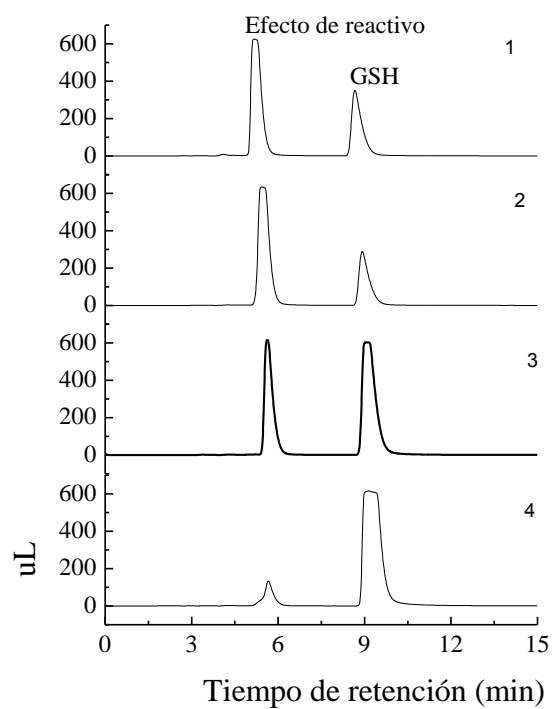


Figura 36. Se muestra tiempo de retención y unidades arbitrarias de luminiscencia del glutatión o GSH a diferentes concentraciones.

En el cromatograma de la Figura 34 se muestra el tiempo de retención en minutos y unidades de luminiscencia. El pico más pronunciado que aparece en cerca del minuto 10 en dicha Figura, pertenece al efecto de los reactivos empleados (Rijstenbil y Wijnholds, 1996). En la Figura 35 se presenta el cromatograma referente a la cisteína que aparece cerca del minuto 7 y después del 10, el pico más pronunciado pertenece a los reactivos. La 36 muestra el cromatograma obtenido del proceso de etiquetado de GSH con mBrB, mismo que fue detectado entre los minutos 8 y 9. En la misma Figura, el cromatograma 1 corresponde a la concentración más baja de glutatión empleada, es decir 0.01 mg/ml, en 2 se refiere 0.001 mg/ml, mientras que el 3 corresponde a una concentración de 0.0001 mg/ml y finalmente el cromatograma 4 corresponde a 0.00001 mg/ml de GSH etiquetado.

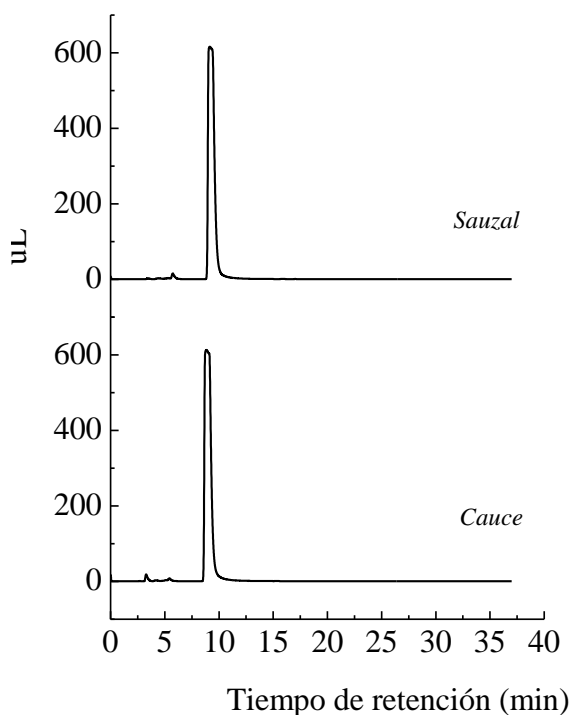


Figura 37. Cromatograma de la extracción de grupos tioles, efectuado a microalgas *cauce* y *sauzal*, se muestra tiempo de retención en minutos y unidades de luminiscencia.

En la Figura 37 se muestran los cromatogramas realizados al tratamiento de células *cauce* y *sauzal* siguiendo la metodología de Rijstenbil y Wijnholds (1996) con algunas modificaciones de Morelli (2008). El pico más alto pertenece al efecto de los reactivos, como se muestra la Figura 34. De todas las pruebas realizadas con variación en el método de extracción el resultado fue el mismo, es decir en el cromatograma sólo aparecieron picos respectivos al efecto de los reactivos empleados en el proceso de extracción, reducción y etiquetado de los grupos tioles.

Capítulo IV

Discusiones y conclusiones

El interés en la utilización de biomasa como adsorbente y/o bioadsorbente para la remoción de cantidades traza de metales pesados tóxicos de efluentes de aguas residuales municipales y ambientes con actividad industrial permite explorar alternativas de bajo costo, alta disponibilidad, procesos regenerativos prácticos así como capacidad de unión a metales pesados por adsorción, quelación e intercambio iónico (Gardea-Torresdey *et al.* 1999; Gang y Weixing, 1998). Entre los microorganismos, las microalgas pueden considerarse como poseedores potenciales de las propiedades mencionadas. Los iones metálicos en medios acuáticos interactúan con las microalgas, en gran medida mediante coordinación con grupos funcionales presentes en las proteínas, lípidos y carbohidratos de las paredes celulares (Quek *et al.* 1998). El uso de especies microalgales nativas de los sitios contaminados para la extracción de iones de metales de aguas residuales es otro atributo que se utilizó para fines de biorremoción de los mismos en el presente trabajo, una vez conciliados aspectos de abundancia, disponibilidad, adaptación y crecimiento en aguas residuales y sitios de estudio de la región. En los sistemas de tratamiento, existe una correlación directa entre sistemas inmovilizados y la eficiencia en biorremediación y remoción de contaminantes, lo cual se buscó en esta investigación.

El proceso de inmovilización

Existen varios métodos de inmovilización celular, los cuales basan su funcionamiento en materiales poliméricos naturales (*e.g.* colágeno, agar, alginato) y los sintéticos (*e.g.* poliuretano, polivinilo, poliéster). En este trabajo se utilizó poliuretano de baja densidad y alta flexibilidad considerando sus ventajas para fines de empaque de

biorreactores y tratamiento de aguas residuales (Ribeiro *et al.* 2005). Las microalgas se inmovilizan en un sustrato, en este caso poliuretano que actúa como un intermediario entre el medio acuático que contiene los contaminantes como metales traza, y la superficie de las microalgas. La inmovilización permite también un incremento en el contacto entre célula y medio, ya que se ha aumentado el área superficial disponible para la fijación celular buscando optimizar la tasa de degradación y biorremediación. Las Figuras 11 y 12 muestran que la mayor densidad celular por superficie de poliuretano se obtuvo para el caso de las microalgas *sauzal*: *Nitzschia* sp., *Navicula* sp., y *PseudoNitzschia* sp. exhibieron la mayor densidad celular al compararse con cultivos del mismo origen pero de manera libre y carentes de soporte. Para las microalgas *cauce*, las diferencias fueron menos marcadas, sin embargo se observó mayor densidad cuando se inmovilizó *Scenedesmus* sp., que su contraparte de manera libre. Al comparar la inmovilización entre sitios y especies se concluyó que las diatomeas exhibieron mayor fijación al poliuretano y el menor desprendimiento microalgal, condición determinada en gran medida a su estructura morfo celular así como su característica de bentónica obligada, a diferencia de las Clorofitas y *Scenedesmus* sp., de los cultivos *cauce*, consideradas bentónicas facultativas, por lo que el proceso de formación de biopelículas es más lento y el desprendimiento celular es mayor.

Las concentraciones de metales removidos

Los valores máximos de cobre registrados en éste trabajo fueron de 0.67 ± 0.11 mg/l, concentración a la que fueron expuestas las microalgas *sauzal* y de 0.108 ± 0.019 mg/l para las microalgas *cauce* (Tabla VI). Se ha registrado que algunas microalgas como las cianobacterias *S. platensi* toleran concentraciones de 5 mg/l de Cu. Para el caso de diatomeas, se ha reportado que toleran concentraciones del mismo metal del orden de 0.2×10^{-05} mg/l, otros registros indican inhibición microalgal a concentraciones entre 0.01 y 0.05 mg/l del mismo metal. Los experimentos se realizaron en el rango de pH de 7.5 - 8.3, los reportes existentes puntualizan que pH's bajos son necesarios para garantizar la suspensión de los metales para fines de remoción, valores superiores a pH 6 pueden favorecer la precipitación cuando se experimentan medios sintéticos y monometálicos. En este trabajo se utilizó el agua proveniente de los sitios de estudio como base para los

experimentos de remoción por lo que no se observó precipitación de metales debido a la presencia de los quelantes naturales que poseen las aguas residuales y marinas. Algunos metales son esenciales, por ejemplo el Fe y el Mn, y no están considerados factores limitantes, otros como el Cu y el Cd son parte de las estructuras implicadas en el transporte de electrones en la fotosíntesis, además son activadores de enzimas microalgales (Marcano *et al.* 2009). Entre las fuentes principales consideradas de estos metales se puede mencionar, para el caso del cauce, escurrimientos y lixiviados naturales de origen terrígeno así como de actividad antrópica que se captan en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Zamora-Castro *et al.* 2007). Para el caso de El Sauzal, el sitio muestreado alberga embarcaciones estropeadas y en algunos casos abandonadas; la descarga oficial y/o furtiva de materiales y el mantenimiento de embarcaciones e infraestructura portuaria liberan pintura con contenido metálico lo que puede promover reacciones fisicoquímicas de oxido-reducción *in situ*. (Huerta-Díaz *et al.* 2008). Por otro lado, la descarga intermitente de aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas residuales liberan a la Bahía de Ensenada una descarga aproximada de 250 l/s, cuyo flujo incide directamente en el cauce de dicha descarga.

Otro de los máximos de metales traza registrados fue el manganeso, cuyos niveles de concentración a partir de la resuspensión de sedimento fueron de 1.4 ± 0.3 mg/l en el elutriado de El Sauzal y de 0.43 ± 0.03 (mg/l) en el caso del cauce (Tabla VI), cantidad que fue la mayor comparada con el resto de los metales. Sin embargo se trata de un metal que está involucrado en la fisiología de las microalgas transportando electrones en el fotosistema II de la fotosíntesis así como en el mantenimiento de la estructura de la membrana. Una concentración por debajo de $2-3 \times 10^{-9}$ mol/l ($109.8-164.7 \times 10^{-9}$ mg/l) de Mn inhibe el crecimiento de algunas microalgas. El Fe fue otro de los elementos analizados, cuantificado solamente en El Sauzal, se observó en una cantidad igual a 0.23 ± 0.02 mg/l. El Fe es un elemento importante para las microalgas como para la mayoría de los microorganismos debiendo su intervención en las reacciones bioquímicas incluyendo la respiración, transporte fotosintético, síntesis de nitrato, fijación del nitrógeno así como en la desintoxicación de los radicales de oxígeno (Abdul *et al.* 2004). Las microalgas en

condiciones aerobias requieren de Fe para una variedad de funciones incluyendo la reducción de oxígeno para la síntesis de ATP, la formación de heme y para otros propósitos esenciales. Se considera que un nivel de al menos 1 μmol de Fe se requiere para el crecimiento microalgal óptimo (Abdul *et al.* 2004). Las concentraciones determinadas en éste trabajo ($0.23 \pm 0.02 \text{ mg/l}$) no inhibieron el crecimiento y coadyuvaron en la generación de biomasa considerando los niveles de clorofila, las cuales fueron en el caso de las células *cauce* de $5.84 \times 10^{-11} \pm 9.62 \times 10^{-13} \mu\text{mol clorofila/células}$ y de $1.26 \times 10^{-09} \pm 1.04 \times 10^{-10} \mu\text{mol clorofila/células sauzal}$, y la tasa de crecimiento.

Los sitios investigados presentaron niveles contrastantes en relación al Cd ya que es uno de los metales más tóxicos, utilizado ampliamente en los procesos industriales, y las baterías, pinturas, subproductos de la minería, entre otros, se consideran las fuentes principales de contaminación de dicho metal en ambientes acuáticos y terrestres (Nriagu y Pacyna, 1988). Sin duda el uso de microalgas para fines de remoción de Cd es una alternativa amigable con el ambiente y de bajo costo en relación a los tratamientos existentes. (Huerta-Díaz *et al.* 2008) reportaron la presencia de Cd en niveles altos $0.23 \pm 1.0 \times 10^4 \text{ mg/g}$, seguido de Cu $19.2 \pm 0.7 \text{ mg/g}$, Fe $3.23 \pm 0.04 \times 10^4 \text{ mg/g}$, Mn de $220 \pm 10 \text{ mg/g}$ y Zn $112 \pm 5 \text{ mg/g}$, todos los valores son en sedimento. Entre la biomasa existente para fines de bioabsorción de Cd (Chang *et al.* 1997 y Esposito *et al.* 2001), el uso de estirpes microalgales locales que incorporan los niveles de Cd pueden coadyuvar en la activación de la bioabsorción en aguas residuales y sitios contaminados, una vez conciliados los factores físicos como el pH y la concentración del bioabsorbente, mismos que fueron considerados en este trabajo. La biodisponibilidad de los metales depende también de la especiación de los mismos, lo cual no se consideró en éste trabajo.

Al compara los valores de Cu obtenidos en éste trabajo ($0.667 \pm 0.105 \text{ mg/l}$ en el elutriado de El Sauzal y $0.108 \pm 0.019 \text{ mg/l}$ en el cauce.) con lo reportado por Morelli *et al.* (2009), $3.5 \pm 1.2 \mu\text{g/l}$ y $16.1 \pm 1.2 \mu\text{g/l}$ de Cd, $41.0 \pm 2.9 \mu\text{g/l}$ y $11.0 \pm 3.4 \mu\text{g/l}$ de Cu, con elutriados colectados en las costas contaminadas de Pisa.

Tasa de remoción de metales

En este estudio se probaron las capacidades de absorción y biorremoción de las microalgas nativas de los sitios de estudio de por los iones metálicos Cd, Cu, Zn, Mn, Fe, así como su efecto ulterior en el metabolismo microalgal para la biosíntesis de MT III.

Esta investigación demostró la capacidad de un sistema de inmovilización de microalgas en poliuretano, para la remoción de los metales: Cu, Fe, Mn y Zn (Figuras 26 a 32 y Tablas VII y VIII). Monteiro *et al.* (2009) reportaron una remoción máxima de Cd en biomasa viable de 11.4 mg de cadmio/g de células empleando *Scendesmus obliquus*, cepa aislada de un sitio contaminado, lo que equivale a tasas de remoción entre 22.8 y 23%. Cultivos de *Scendesmus acutus* y *Chlorella vulgaris* (Travieso *et al.*, 1999) de manera libre e inmovilizadas en cubos de 5 mm de poliuretano, exhibieron remoción de 69 y 57 % del mismo metal, respectivamente, en un tiempo de 72 horas de exposición a Cd, Cr y Zn. La remoción que reportaron dichos autores fue de 48% de Cd²⁺ después de 2 días, 68% a los 4 días, 80% en 6 días y 90% después del octavo día, a partir de una concentración de 5 µg /l contenido en el medio de cultivo. Estudios de Perez-Rama *et al.* (2002) realizados con *Tetraselmis suecica*, demostraron la capacidad de remover el 59.6% de cadmio (expuesta a 6 mg/l de Cd), atribuyendo el resultado al tamaño de *T. Suecica* en comparación con *Chlorella* sp., lo que podría ser un factor que incrementaría la eficiencia en el proceso de remoción. Los valores de remoción del 97% de Cd (concentración inicial de 10 mg/l) se reportaron por Akhtar *et al.* (2003) utilizando *Chlorella sorokiniana* inmovilizada en la esponja *Luffa cylindrica*. Los resultados de las tasas de remoción con el sistema mencionado, se explican debido a la disponibilidad de la matriz de inmovilización abierta que contribuye a una mayor superficie de contacto con el medio y el libre acceso del Cd a los sitios de absorción.

Se esperaba que con las microalgas *cauce* se obtuviese una tasa de remoción cercana a lo reportado en Travieso *et al.* (1999) debido a la semejanza en el experimento, sin embargo las diferencias pueden deberse a las dimensiones de la superficie de contacto del soporte ($3.23 \pm 0.004 \text{ cm}^2$).

En lo que concierne a la remoción del Cu con microalgas *cauce*, se determinó de 54% para el elutriado de 50% a concentración inicial de 0.140 mg/l, después de 48 horas

de exposición. Soldo *et al.* (2005) reportaron que *Oocystis nephrocytioide*, removi6 85% a partir de una concentraci6n de 0.1 mg/l del metal. Sin embargo Nacorda *et al.* (2007) reportaron una tasa de remoci6n entre 50.7 y 60.9% con *Chlorella vulgaris* Beijerick de manera libre en el mismo periodo de tiempo. Mohapatra y Gupta, (2005) probaron remoci6n de Cu, Zn y Co en funci6n del pH, adem6s en sistemas separados, binarios y ternarios con la cianobacteria *Oscillatoria angustissima* inmovilizada en case6na. Los autores reportaron valores de remoci6n de aproximadamente el 24% de Cu en soluci6n individual (0.12 mol/g de biomasa) de una concentraci6n inicial igual a 0.4 mM. Seg6n De Philippis *et al.* (2002), *C. capsulata* y *Nostoc* fueron capaces de remover 96 ± 2 y 79 ± 3 mg Cu²⁺/g de prote6na, a partir de soluciones con un contenido del metal de 2.5 y 7.5 mg/l del metal a un pH de 5.5 durante 24 horas. El efecto del pH sobre la capacidad de remoci6n ha sido reportado por varios autores, Wang *et al.* (2010) mencionan el m6ximo de remoci6n a un pH entre 4 y 6 debido a que a un pH bajo los protones (H⁺) tienden a completarse con cationes para adherirse a los sitios de uni6n, reduciendo la absorci6n. A pH entre 4 y 6 casi todos los metales est6n ionizados y los grupos carboxilo de la biomasa mayormente disociados, por lo que se genera una superficie cargada negativamente resultando en una interacci6n electrost6tica. Por otro lado, la presencia de exopolisac6ridos en microalgas bent6nicas les permite adherirse a la superficie del soporte a diferencia de *Scenedesmus* sp. que carece de dicho mecanismo. Con lo que respecta a las microalgas *sauzal* inmovilizadas (Figura 23), se obtuvo un m6ximo de remoci6n de cobre a la hora 8 del ensayo con un valor de 72% en el elutriado de 50%, que conten6a 0.376 mg/l de Cu inicialmente; el m6ximo de remoci6n del elutriado 100% se present6 a la hora 24, siendo el 70% del cobre presente al inicio. El m6ximo de remoci6n de Cu para el caso de las microalgas *cauce* fue de 54% para el elutriado de 50% a partir de una concentraci6n de 0.140 ± 0.042 mg/l. Concerniente a las cantidades de Cu empleadas en el presente trabajo fueron menores que las reportadas como ideales para remoci6n, 10 mg/l en Wang *et al.* (2009) donde se hace menci6n que pudiese haber una explicaci6n en el incremento en la capacidad de remoci6n al aumentar la cantidad del metal en el medio, dicho aumento puede provocar un incremento en la probabilidad de colisiones entre los iones y el absorbente e incremente la competencia del cobre por los sitios de uni6n con protones. En 6ste trabajo la

mayor remoción de Cu se encontró en los medios de 50% elutriado: 0.140 ± 0.042 mg/l en el ensayo de El Sauzal y 0.140 mg/l en el cauce (Figuras 26 y 30). En esta ocasión el máximo de remoción de Cu fue en mayor proporción que los reportado, a excepción de Wang *et al.* (2010), y en menor tiempo para las microalgas *sauzal* en comparación con las *cauce*. En algunas Clorofitas y cianobacterias se han reportado valores máximos de remoción entre 1 y 12 días de exposición al metal, lo que sugiere que la disponibilidad de los sitios de unión podría ser mayor en sistemas integrados por células bentónicas.

Entre los metales traza analizados, el Mn ha sido reportado en aguas contaminadas por descargas industriales (Ehrlich, 1996), en analogía a las descargas del arroyo El Gallo y los sitios de muestreo de El Sauzal. Los ensayos con Clorofitas efectuados en este trabajo, presentaron tasa de remoción de 86, 93 y 97% (Figura 28 b), de manera respectiva con 0, 50 y 100% elutriado. Éste resultado podría estar relacionado con las colisiones efectuadas por las partículas en el medio que propiciaron mayor contacto con las superficies absorbentes de las algas inmovilizadas. Además de que es un elemento que las microalgas incorporan para fines fisiológicos, lo que podría explicar el alto porcentaje de remoción en un tiempo de 48 horas. Sin embargo ésta situación no se observó con las células bentónicas *sauzal* (Figura 25) ya que en el experimento de 0% elutriado, el máximo de remoción ocurrió a la hora 6 del experimento y sólo fue cercano al 50%. La remoción de 95% en el ensayo con 50% elutriado en 48 horas, y finalmente 24% de remoción en la hora 6(100% elutriado). Este elemento, en la forma de Mn(II) es un componente importante de la química redox de metales en suelos y medios dulceacuícolas y marinos (Ehrlich, 1996) debiéndose esta acción principalmente a los microorganismos capaces de oxidar Mn(II) A Mn (VI) como bacterias, algas, levaduras y hongos (Ehrlich, 1996).

Otro elemento analizado y considerado ubicuo en ambientes acuáticos es el hierro. En agua, el hierro se encuentra en estado ferroso (Fe II), y férrico (Fe III), altamente insoluble a pH's neutrales. En el presente trabajo se emplea la denominación hierro sin especificar su estado. Las concentraciones de éste elemento determinadas en los ensayos de El Sauzal son indicativas de la presencia de las fuentes abundantes del mismo, principalmente cascos metálicos y actividades portuarias con base en este elemento, a

diferencia del cauce cuyo efluente de aguas residuales es principalmente de origen doméstico.

Dentro de los constituyentes metálicos en las aguas residuales y ambientes marinos contaminados, se encuentra el Zn, considerado un contaminante ambiental que es tóxico aún a concentraciones muy bajas. La remoción máxima de Zn con microalgas *cauce*, en su mayoría *Scenedesmus* sp., fue cercana al 70% para las tres concentraciones de elutriado (0, 50 y 100%), a pesar de que la concentración inicial de Zn fue mayor en el experimento del 0% elutriado. Posiblemente en consecuencia de que el Zn contenido en el efluente no se conservó al efectuar los elutriados. Monteiro *et al.* (2009) reportaron una tasa de remoción máxima de 92% de un total de zinc inicial de 1mg/l para una cepa de *Desmodesmus pleiomorphus* aislada de un sitio contaminado en Portugal, durante 3 días de exposición a un pH 5. Una de las principales diferencias por las que se pudiese ver afectada la remoción y obtener niveles más bajos que los reportados, podría ser que el pH utilizado estuvo dos unidades arriba, de manera que la disponibilidad del metal se pudo ver afectada. Travieso *et al.* (1999), investigaron la remoción con *Chlorella vulgaris* inmovilizada en poliuretano obteniendo una tasa de remoción de 78% (concentración inicial de 300 mg/l), mientras con *Scenedesmus* sp la remoción fue de 84% (inicial de 50 mg/l). Posiblemente las discrepancias entre los máximos de remoción, puedan deberse a las diferencias en los valores de exposición (Tabla VI). Estas diferencias se podían explicar mediante las concentraciones de Zn iniciales, ya que en los dos reportes mencionados con anterioridad, fueron superiores a las empleadas en éste trabajo. Mophapatra *et al.* (2005) reportan una remoción de Zn de 66% a un pH 4, de una solución inicial de 0.5 mM de Zn en una hora con la cianobacteria *O. angustissima* inmovilizada en caseína. En los ensayos de remoción efectuadas con microalgas de El Sauzal se observaron tasas de remoción menores comparativamente a las células *cauce*, en todo los casos cercanas al 50%.

La capacidad de remoción y metabolización de metales demostrada en las microalgas evidencia la acción de varios mecanismos involucrados como la adsorción. Esta propiedad está asociada con la relación superficie: volumen, la afinidad por el sustrato y la presencia de grupos de unión a metales en la superficie de las células, a diferencia de la metabolización que implica la existencia de sistemas eficientes de almacenamiento. Entre

los factores que pudieron ejercer acción en la tasa de remoción por las especies aisladas y condiciones experimentadas se puede considerar el pH, la cantidad de metal y las características de la biomasa, asumiendo la presencia de otros compuestos presentes en los medios como agentes quelantes, compuestos orgánicos producidos por los microorganismos y otros metales, ya que en conjunto afectan las tasa de remoción.

De los metales determinados se concluye que existió el siguiente orden de remoción: Mn>Zn>Cu, a las 24 horas de exposición para las microalgas *cauce* con las tres concentraciones de elutriado utilizadas. Para el caso de las células *sauzal*, se determinó el orden de remoción, siendo de Cu> Mn>Zn> Fe; Mn>Cu >Zn> Fe y Cu> Zn>Mn> Fe, para los ensayos de 0%, 50% y 100% elutriados respectivamente, en un tiempo entre 2 y 48 horas. A pesar de que las diatomeas poseen mayores características aplicables en la remoción de metales, dicha remoción se ve mayormente afectada por el medio utilizado. Romera *et al.* (2008) concluyeron que la presencia de otros iones metálicos en solución afectó de manera significativa la absorción y la recuperación de cada metal. La absorción de Zn, Cd y Ni fue menor en los sistemas con dos o tres metales que en los sistemas mono metálicos. El incremento en el número de metales en solución produce un número limitado de sitios activos en la biomasa, por los cuales compiten los metales presentes. Mohapatra y Gupta (2005) encontraron que para un sistema ternario, la afinidad por los metales fue Cu(II)>Co(II)>Zn(II) en un sistema con *Oscillatoria angustissima* inmovilizada en caseína en una hora de exposición. La disminución del metal por precipitación, interfiriere en la determinación de la capacidad real de unión al biosorbente. Se procedió a determinar si la biomasa microalgal ejerció un efecto en la bioabsorción de los metales del agua representativa del efluente y del agua del sitio muestreado de El Sauzal.

Los porcentajes de biorremoción obtenidos sugieren la posibilidad de que los metales una vez en contacto pudiesen ser incorporados mediante mecanismos de incorporación.

Tasa de crecimiento

Entre los aspectos importantes para evaluar el efecto de los metales traza en el crecimiento microalgal se consideró a la tasa de crecimiento microalgal, una estimación importante que posee implicaciones fisiológicas y metabólicas. Una diferencia en la tasa de crecimiento (Tabla V) indicaría la posibilidad de que la fase de remoción ha pasado de pasiva a activa. Los metales en suspensión se adhieren a la superficie de la microalga, en los sitios de unión en una fase rápida, o bioabsorción, que implica la adsorción fisicoquímica del metal en las paredes celulares y a sitios como metabolitos intra y/o extracelulares. Posteriormente, se presenta una fase lenta o activa y posiblemente irreversible, llamada también bioacumulación, que generalmente implica mecanismos dependientes de energía para la acumulación de metales por las células vivas. En esta fase están envueltos mecanismos usados en la acumulación de otros cationes divalentes como Mn^{2+} y Ca^{2+} (Trevors *et al.* 1986). Por las diferencias en las tasas de crecimiento (Tabla V), se infiere que la cantidad de metales acumulada ha afectado la integridad de la célula, es decir ya la está incorporado. Con respecto a la tasa de crecimiento se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P = <0.001$), entre las microalgas de elutriado 0% y 50% a la hora 24 y 48 del bioensayo del cauce, lo que indica que los metales removidos comenzaron a acumularse en el interior de las células. El porcentaje de diferencia en la tasa de crecimiento es de 27% al día de exposición y de 8% a los dos días. Al ser menor la afectación al final del experimento podría deberse a que la cantidad de metales ya estaba agotada, como se puede observar en las Figuras de remoción (23 a 29), los máximos en su mayoría ocurrieron a la hora 24. Esta condición, permite el desarrollo de la biomasa, o bien a que las células sobrepasaron una etapa de aclimatación al medio experimental. El hecho de encontrar menor afectación en el elutriado de 100% sugiere una riqueza mayor de nutrientes naturales que las microalgas pueden utilizar más eficientemente en sus funciones básicas. Con lo que respecta a las células *sauzal* hubo diferencias significativas, pero con incremento en la tasa de crecimiento en un 21 y 45% en 50 y 100% elutriado respectivamente, con lo que se infiere una menor afectación o inclusive una respuesta positiva a la exposición a elutriados.

Ensayos aproximativos de presencia de GSH y MT III

Una vez que se detectaron los controles GSH y cisteína, se descarto la posibilidad de que el método de etiquetado y derivatización propuesto por Rijkenbil y Wijnholds, 1996 (con modificaciones de Morelli *et al.* 2009 y Le Faucheur, 2005) impidiese la detección de tioles y por ende de MT III de las microalgas. La explicación más convincente de éste resultado pudo residir en los niveles de metales pesados requeridos para inducir la síntesis de MT III en las microalgas, asumiendo que los fenotipos utilizados efectivamente biosintetizan las mismas, lo cual se desconoce. Las cantidades de metales obtenidas mediante el proceso de re suspensión de sedimento, están dentro de las que se han reportado como suficientes para producción de tioles en cantidades adecuadas para ser detectadas mediante HPLC. En la Tabla VI se observan las cantidades de metales a las que se expusieron las microalgas. El Cd se obtuvo en menor cantidad en el orden de 10×10^{-08} M, sin embargo se reporta producción desde 10×10^{-09} hasta 10×10^{-06} M en diatomeas y desde 10×10^{-14} hasta 10×10^{-07} M en *Scenedesmus* sp. El Zn se logró en el orden de 10×10^{-06} M en ambos sitios y se reportan de 10×10^{-07} - 1×10^{-06} M, mientras el cobre se obtuvo en el orden de 10×10^{-06} M y se ha reportado entre 2.5×10^{-08} y 2×10^{-07} M en diatomeas y 8×10^{-11} y 1.5×10^{-06} M en *Scenedesmus* sp. Así, las cantidades de metal que inducen la producción se aplicaron en el presente trabajo, sin embargo las concentraciones disponibles de metal para inducción fueron inferiores debido a que el soporte contribuyo en la remoción de metal, lo que disminuye la concentración requerida para inducir biosíntesis de MT III en las microalgas.

A pesar de que la literatura considera las propiedades bioquímicas únicas de las metalotioninas, los estudios genéticos no han enfatizado la importancia de las MT en determinadas funciones fisiológicas. Los estudios de la estructura, características bioquímicas, inducción y consecuencias de la disrupción genética y sobre expresión, las fuerzas evolutivas que llevan a la presencia inicial, duplicación génica así como casi todas las expresiones ubicuas de las MT III de acuerdo a Palmiter (1998) permanecen enigmáticas.

Un mecanismo mediante el cual las microalgas biorremueven metales pesados en función de su estructura celular se puede observar en la Figura 38.

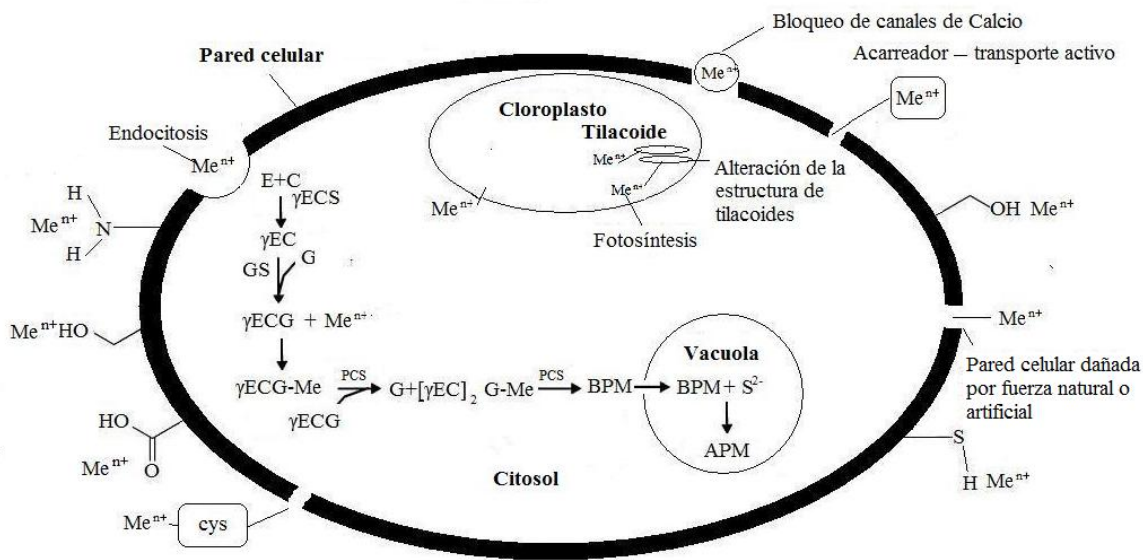


Figura 38 .Esquema modificado de Peralez-Vela *et al.* (2009) de la toma de metales en las microalgas. (Me^{n+}) iones de metales libres, (E) ácido glutámico, (C) cisteína, (G) glicina, (γEC) gama glutamailcisteína (γECG) glutatión, ($[\gamma EC]_2$), metalotionina $n=2$, (cis) cisteína como acarreador, (BPM) complejos de bajo peso molecular, (APM) complejos de alto peso molecular, (γECS) gama glutamailcisteína sintetasa, (GS) glutatión sintetasa. Se muestran también los grupos funcionales: (R- NH_2) amina, (-OH) hidroxilo, (R-COOH) carboxilo, (R-SH) tiol.

Conclusiones

1. El crecimiento microalgal en los diferentes elutriados de las especies aisladas de los sitios demostró la capacidad y potencial microalgal para bioremoción de los metales Cu, Mn y Zn con cultivos *sauzal*, y todos los anteriores además de Fe en cultivos *cauce*.
2. El soporte de inmovilización, poliuretano, fue eficiente para promover el crecimiento de manera inmovilizada de las células *sauzal*. Por su parte, el sistema soporte microalgas *sauzal*, permitió la remoción del 60 al 79% de Cu, del 38 al 95% de Mn y del 25 al 44% de Zn, mientras con las células *cauce* se exhibió una remoción de 49 a 53% de Cu, de 87 a 98% de Mn y del 61 al 71% de Zn.
3. Por su parte la biomasa *sauzal* permitió remover un 44% del total de los metales removidos, mientras que la biomasa *cauce* un 41%, lo cual evidencia que no existió un efecto negativo sobre las microalgas.
4. Las diferencias en las tasas de crecimiento de las células *cauce*, con respecto al control, indican que la presencia de metales en el medio provocó decremento en el número de divisiones celulares. Mientras que al observarse incremento en dicha medición en las microalgas *sauzal*, con respecto al control, indica que las células superaron en mayor medida la presencia de metales en el medio.
5. Las concentraciones de los metales pesados estudiados, aunque inicialmente fueron las requeridas para inducir la síntesis de MT III, la acción del soporte de inmovilización contribuyó en la disminución de las concentraciones inductoras, ya que el soporte por sí mismo removió, en el caso del experimento de El Sauzal un 56%, mientras que en el cauce un 59%.

Recomendaciones

1. Evaluar las condiciones óptimas de crecimiento de las microalgas en función de sus propiedades y para desarrollar biopelículas en el soporte de inmovilización.
2. Determinar las concentraciones de metales traza biodisponibles e inductores de MT III en función de la capacidad de adsorción del soporte de inmovilización.
3. Optimizar la biorremoción de Fe y Cd por las microalgas seleccionadas: mediante la concentración de metal, pH, condiciones de cultivo.
4. Las propiedades de biosíntesis de MT III en microalgas deben corroborarse previamente a los procesos inductivos, ya que es posible que las especies de microalgas carezcan de mecanismos de biosíntesis.

Referencias bibliográficas

- Ahner B. A. 1994. Phytochelatin induction by trace metals in marine algae. Tesis. Massachusetts Institute of Technology.124p.
- Akthar N., Saeed A. e Iqbal. M. 2003. *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. *Bioresource Technology* 88: 163-165
- Allen, A., M.G. Booth. M. Frischer, , P. Verity, J. Zehr y S. Zani. 2001. Diversity and detection of nitrate assimilation genes in marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5343-5348.
- Arredondo-Vega, B. O. y D. Voltolina. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. CIB. 97p.
- Arunakumara K. K. I. U. y Z. Xuecheng. 2008. Review Heavy Metal Bioaccumulation and Toxicity with Special Reference to Microalgae .J. *Ocean Univ. Chin., Oceanic and Coastal Sea Research.*7 (1): 60-64.
- ASTM. Standard guide for collection, storage, characterization and manipulation of sediment for toxicological testing. 1994. Annual book of standards. Philadelphia, USA: American Society for Testing and Materials. E1391-94.
- Bustillos-Guzman, J. I. Garate-Lizarraga., D. Lopez-Cortes y F. Hernandez-Sandoval. 2004. The use of pigment "fingerprints" in the study of harmful algal blooms. *Rev. biol. Trop.* 52:17-26.
- Chang, J.S. R. y C.C., Law Chang. 1997. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Res.* 31 (7): 1651-1658.
- Cobbett C. S. 2000. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiology.* 123: 825-832.

- Cobbett, C., P. Goldsbrough. 2002. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
- De Philippis, R., R. Paperi., C. Sili y M.Vincenzini. 2003. Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, *Cyanospira capsulata* and *Nostoc* PCC79362003. *Journal of Applied Phycology* 15: 155-161.
- Downes M. T., L. Hrstich y W. F. Vincent. 1993. Extraction of chlorophyll and carotenoid pigments from Antarctic benthic mats for analysis by HPLC. *Journal of Applied Phycology.* 5:623-628.
- Ehrlich. H. L. 1996. *Geomicrobiology*, New York, Marcel Dekker.
- Esposito A., F., Pagnanelli, A., Lodi, C., Solisio y F., Veglio. 2001. Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations. *Hydrometallurgy* 60: 129-141.
- Ewan K.B y R. Pamphlett. 1996. Increased inorganic mercury in spinal motor neurons following chelating agents. *Neurotoxicology*;17:343- 9.
- Fraysse a B., O. G. B. Berthet., H. Quéau., S. Biagiante-Risbourg y A. Geffard. 2006. Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology.*144: 286-293.
- Gang S y S. Weixing. 1998. Sunflower as adsorbents for the removal of metal ions from wastewater. *Ind. Eng. Chem. Res.* 37:1324-1328.
- Gardea-Torresdey, J.L.,Tiemann, K.J., Gamez y G., Dokken. 1999. Effect of chemical composition for multi-metal binding by *Medicago sativa* (Alfalfa). *J. Hazard. Mater.* 69: 41-51.
- Ghirardini A. V, A. A. Novelli, C. Losso, P.F. Ghetti. 2003, en Morelli E., Marangi M.L., Fantozzi L. 2009. A phytochelatin-based bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. *Environment International.* 35:532-538.

- Gioacchino S y E. Morelli. 2002. Characterization of cadmium and lead phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *Biomaterials*. 15: 145-151.
- Grill E., E.L Winnacker, H.H. Zenk. 1987. Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 439-443.
- Grill E., Winnacker, H.H. Zenk. 1985. Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Guillard R. R.L y J.H. Ryther 1962. Studies of marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*. 8:229-239.
- Guillard R.R.L. 2005. Purification Methods for Microalgae. *Algal Culturing Techniques*. Andersen , R.E. (ed), Elsevier Academic. 117-132.
- Hamidi Abdul Aziz, Mohd Suffian Yusoff, Mohd Nordin Adlan, Nurul Hidayah Adnan y Salina Alias. 2004. Physico-chemical removal of iron from semi-aerobic landfill leachate by limestone filter. *Waste management*. 24: 353-358.
- Hgerthey S.E., J.W. Louda.,y P. Mongkornsri, 2006. Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment. *J. Phycology* 42: 1125-1136.
- Horvatić J., V. Peršić. The Effect of Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} on the Growth Rate of Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: Microplate Growth Inhibition Test. 2007. *Bull Environ Contaminant Toxicol*. 79: 494-498.
- Huerta-Díaz M.A., F. Delgadillo-Hinojosa., M. Hernández-Ayón., J. A. Segovia-Zavala., Z. García-Esquivel., H. López-Zárate., A. Siqueiros-Valencia y S. Galindo-Bect. 2008. Diagnosis of trace metal contamination in sediments: The example of Ensenada and El Sauzal, two harbors in Baja California, Mexico. *Marine Environmental Research*.66: 345-358.

- Kawakami S.K., M. Glenhill. y E.P. Achterberg. 2006. Production of phytochelatins and glutathione by marine phytoplankton in response to metal stress. *J. Phycol.* 42: 975-989.
- Kojima H. y K. Lee. (2001). *Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology*. Springer-Verlag. Hong-Kong. 310p.
- Kosakowska A., J. Lewandowska, J. Stón y K. Burkiewicz. 2003. Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) stressed by iron. *BioMetals*. 17:45-52.
- Le Faucheur S. V., R. Behra, y L. Sigg. 2005. Thiol and Metal Contents in Periphyton Exposed to Elevated Copper and Zinc Concentrations: A Field and Microcosm Study *Environ. Sci. Technol.* 39: 8099-8107.
- Louda J. W., Liu, M, E. W. Baker. 2002. Senescence- and death-related alteration of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Organic Geochemistry* 33: 1635-1653.
- Louda J. W., J. Li. L., Liu, M., N. Winfree y e. W. Baker. 1998. Chlorophyll-a degradation during cellular senescence and death. *Org. Geochem.* 29: 1233-1251.
- Marcano C., L. B., I. M. Carruyo., X. M. Montiel., C. B. Morales y P. Moreno de Soto. 2009. Effect of Cadmium on Cellular Viability in Two Species of Microalgae (*Scenedesmus sp. and Dunaliella viridis*) *Biol Trace Elem Res.* 130: 86-93.
- Martínez-Cortés G.I. 2010. Tratamiento avanzado y remoción de bacterias patógenas de aguas residuales mediante un bio-reactor híbrido (acoplamiento de tapetes microbianos y membranas poliméricas). Tesis, CICESE. 79p.
- Mehta S.K., B.N. Tripathi y J.P. Gaur. 2002. Enhanced sorption of Cu^{2+} and Ni^{2+} by acid-pretreated *Chlorella vulgaris* from single and binary metal solutions. *Journal of Applied Phycology.* 14: 267-273.
- Mohapatra H. y R. Gupta. 2005. Concurrent sorption of Zn(II), Cu(II) and Co(II) by *Oscillatoria angustissima* as a function of pH in binary and ternary metal solutions *Bioresource Technology* 96:1387-1398.

- Monterio C. M., A.P.G. Márquez, P.M.L. Castro y F.X. Malcata. 2009. Characterization of *Desmodesmus pleiomorphus* isolated from a heavy metal-contaminated site: biosorption of zinc. *Biodegradation*. 20:629-641.
- Monterio C. M., P.M.L. Castro y F.X. Malcata. 2009. Use of the microalga *Scenedesmus obliquus* to remove cadmium cations from aqueous solutions. *World J Microbiol Biotechnol*. 25:1573-1578.
- Morelli E., L. Fantozzi. 2008. Phytochelatins in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: An Evaluation of their Use as Biomarkers of Metal Exposure in Marine Waters. *Bull Environ Contam Toxicol*. 8: 236-241.
- Morelli E., Marangi M.L., Fantozzi L. 2009. A phytochelatin-based bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. *Environment International*. 35:532-538.
- Nalimova A.A., V.V. Popova., L.N. Tsoglin y N.A. Pronina. 2005. The Effects of Copper and Zinc on *Spirulina platensis* Growth and Heavy Metal Accumulation in Its Cells. *Russian Journal of Plant Physiology*. 52(2): 229-234.
- Nirupama Mallick. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*. 15: 377-390.
- Nriagu J.O. y J.M., Pacyna. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*. 333: 134-139.
- Omar H.H. 2001. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 50: 95 -100.
- Oswald W. J. 1957. Light conversion efficiency in photosynthetic oxygenation. IER, series 44. Sanitary Engr. Res. Lab. Univ. Calif. Berkeley. 127p.
- Palmiter. R. D. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 8428-8430.

- Perales-Vela H. V., J. M. Peña-Castro., R. O. Cañizares-Villanueva. 2006. Review Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*. 64: 1-10.
- Pérez-Rama M., Abalde-Alonso J., Herrero-López C. y Torres-Vaamonde E. 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*. 84: 265-270.
- Pistocchi R., A.M. Mormile., F. Guerrini, G. Isani., L. Boni. 2000. Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *Journal of Applied Phycology*. 12:469-477.
- Prasanna R., P.Jaiswal., B. D. Kaushik. 2008. Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability – promises and challenges .*Indian J. Microbiol*. 48: 89-94.
- Quek S.Y., D. A. J., Wase y C.F., Forster. 1998. The use of sago waste for the sorption of lead and copper. *Water SA*. 24 (3):251-256.
- Radway J. C., E.W. Wilde. , M. J. Whitaker y J. C. Weissman. 2001. Screening of algal strains for metal removal capabilities. *Journal of Applied Phycology* 13: 451-455.
- Rajamani S., S.Siripornadulsil., V.Falcao ., M. Torres. P. Colepicolo y R. Sayre. 2007.Chapter 9, *Phycoremediation of Heavy Metals Using Transgenic Microalgae*. En: Rosa León, Aurora Galván y Emilio Fernández *Advances in Experimental Medicine and Biology, Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. Landes Bioscience and Springer Science Business Media. USA. 99-109p.
- Rauser W. E. 1990. Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem*. 59: 61-86.
- Ribeiro R., M.B.A. Varesche, E. Foresti y M. Zaiat. 2005. Influence of the carbon source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices. *Journal of Environmental Management* 74: 187-194.
- Rijstenbil J.W, Wijnholds J.A. 1996. HPLC analysis of non-protein thiols in planktonic diatoms: pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. *Mar Biol* 127: 45-54.

- Rippka R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman y R.Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61.
- Roesijadi G., 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22: 81-114.
- Romera E., González F., Ballester A., Blázquez M. L. y Muñoz J. A. 2008. Biosorption of Cd, Ni, and Zn with Mixtures of Different Types of Algae. *Environmental Engineering Science.* 25 (7): 999-1008.
- Romeram E. Gonzáles F., Ballester A., Blázquez M.L. y Muñoz J.A. 2008. Biosorption of Cd, Ni, and Zn with Mixtures of Different Types of Algae. *Environmental Engineering Science.* 25: 999- 1008.
- Scarano G. y E. Morelli. 2002. Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure. *BioMetals* 15: 145-151.
- Singh A., S. K. Mehta y J. P. Gaur. 2007. Removal of heavy metals from aqueous solution by common freshwater filamentous algae *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1115-1120.
- Soldo D., R. Hari, L. Sigg y R. Behra . 2005. Tolerance of *Oocystis nephrocytioides* to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper . *Aquatic Toxicol.* 71: 307-317.
- Ston J. y A. Kosakowska. 2002. Phytoplankton pigments designation-an application of RP-HPLC in qualitative and quantitative analysis. *Journal of Applied Phycology.* 14: 205-210.
- Travieso L. R., O. Cañizares, R., Borja, F., Benítez, A. R. Domínguez, R. Dupeyrón y V. Valiente. 1999. Heavy Metal Removal by Microalgae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:144-151.
- Trevors J. G. Stratton y G. Gadd. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can J Microbiol* 32(6): 447-464.

- Vasak, M. 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19: 13-17.
- Volesky, B. 1990. *Biosorption of Heavy Metals*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 396p.
- Volesky, B. 2000. Biosorption of heavy metals: Methodology example of uranium removal. En: *Treatment of Wastewaters Containing Heavy Metal Compounds*, Kornmuller, A., ed. TU Berlin, Germany. 17-37p.
- Volpi G. A., Arizzi Novelli A, Losso C, Ghetti PF. 2003. Sea urchin toxicity bioassays for sediment quality assessment in the Lagoon of Venice (Italy). *Chem Ecol.* 19:99- 111.
- Wilde E. W. y J.R.Benemann .1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotech. Adv.* 11: 781-812.
- Zamora-Castro J., Paniagua-Michel J. y Ledezma-Cervantes. 2007. A novel Approach for Bioremediation of Coastal Marine Waste Effluent Based on Artificial Microbial Mats. *Marine Biotechnology.* 10: 181-189.