

TESIS DEFENDIDA POR  
**Gabriela Avelinda Valle Ramírez de Arellano**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. María Lucila del Carmen Lares  
Reyes  
*Co-Director del Comité*

---

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

---

Dr. Saúl Álvarez Borrego  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea  
Navarro  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera  
*Coordinador del Programa de  
Posgrado en Ecología Marina*

---

*Dr. David Hilario Covarrubias  
Rosales*  
Encargado del Despacho de la  
Dirección de Estudios de Posgrado

5 de noviembre de 2007

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



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ECOLOGÍA MARINA**

---

**UTILIZACIÓN DE MICROALGAS PARA LA REMOCIÓN DE CADMIO Y  
ZINC DE EFLUENTES DE AGUAS RESIDUALES URBANAS**

**TESIS**

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

Presenta:

**GABRIELA AVELINDA VALLE RAMÍREZ DE ARELLANO**

Ensenada, Baja California, México, noviembre del 2007.

**RESUMEN** de la tesis de **Gabriela Avelinda Valle Ramírez de Arellano**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México. Noviembre 2007.

## **UTILIZACIÓN DE MICROALGAS PARA LA REMOCIÓN DE CADMIO Y ZINC DE EFLUENTES DE AGUAS RESIDUALES URBANAS**

Resumen aprobado por:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Codirector

---

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes  
Codirector

Las aguas residuales generadas por las actividades domésticas e industriales son descargadas a los cuerpos de agua, ocasionando serios problemas de contaminación y eutrofización. Con el propósito de tener alternativas para disminuir el exceso de metales como el cadmio y zinc en aguas residuales urbanas, se evaluó la capacidad de remoción utilizando microalgas. Se realizó un ensayo de tolerancia utilizando dos especies de microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y la cianobacteria *Synechococcus* sp. Se encontró que los cultivos de las tres especies crecen a las concentraciones utilizadas de Cd ( $0.2 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de Zn ( $16 \text{ mg l}^{-1}$ ) adicionados de forma individual y combinada. No se encontraron diferencias significativas en los valores de peso seco específico por efecto de los tratamientos utilizados para cada especie. La mayor concentración de clorofila *a* en *Scenedesmus obliquus* se evaluó en el tratamiento con adición de Cd y Zn en forma combinada. La cianobacteria *Synechococcus* sp. se seleccionó como organismo de prueba para los ensayos de remoción de Cd y Zn y se tomó en consideración las características fisiológicas de esta especie para reducir la toxicidad de los metales.

Al mantener cultivos de *Synechococcus* sp. en bajas y altas concentraciones de Cd (1 y  $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) y Zn ( $50$  y  $75 \text{ mg l}^{-1}$ ), se encontró que esta especie puede crecer en las dos concentraciones de Cd y a las bajas concentraciones de Zn. Sin embargo, con adición de  $75 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn el cultivo de *Synechococcus* sp. presentó mortandad.

En los cultivos de *Synechococcus* sp., tanto en bajas como en altas concentraciones no se encontraron diferencias significativas en los valores de peso seco específico; sólo se encontraron diferencias significativas entre los valores de clorofila *a* al mantenerla en los distintos tratamientos con Cd y Zn.

*Synechococcus* sp. removió la misma cantidad de Cd ( $10 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$ ) cuando se expuso tanto a bajas ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) como a altas ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y  $75 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) concentraciones de los dos metales, cuando éstos fueron adicionados de forma combinada. Esta remoción correspondió a un 75 y 48% de la cantidad adicionada en la exposición baja y alta, respectivamente. Sin embargo, cuando el Cd fue adicionado en forma individual la cantidad removida se encontró en relación directa con la concentración de exposición ( $9$  y  $15 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$ ; baja y alta, respectivamente). Estas remociones

correspondieron al 64 y 70% de la cantidad adicionada en la exposición baja y alta, respectivamente.

La remoción de Zn por *Synechococcus* sp. estuvo en relación directa con el grado de exposición al metal, tanto cuando fue adicionado en forma individual (48 y 69  $\mu\text{g } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$ ; baja y alta, respectivamente) como cuando fue adicionado en forma combinada (50 y 68  $\mu\text{g } 10^{-6} \text{ cél}^{-1}$ ; baja y alta, respectivamente). Las cantidades de Zn removidas en ambos casos no fueron significativamente diferentes. Estas remociones correspondieron al 99% de la cantidad adicionada en exposición baja y a alrededor del 90% cuando la exposición fue alta. Puede concluirse que *Synechococcus* sp. remueve casi el 100% del Zn adicionado, si la concentración a la que está expuesto no es letal.

Este trabajo muestra que *Synechococcus* sp. puede remover eficientemente Cd y Zn del medio de cultivo, por lo que esta cianobacteria posee el potencial para ser utilizada en técnicas de biorremediación para la remoción de metales en efluentes provenientes de aguas residuales.

**Palabras clave:** Remoción, cadmio, zinc, crecimiento, microalgas, cianobacterias.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Gabriela Avelinda Valle Ramírez de Arellano**, as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Marine Ecology. Ensenada, Baja California, México. November 2007.

## **USE OF MICROALGAE TO THE REMOVAL OF CADMIUM AND ZINC FROM URBAN WASTE WATERS EFFLUENTS**

Domestic and industrial wastewaters are discharged in water bodies, producing contamination and eutrophication problems. With the aim to obtain alternatives to decrease the excess of heavy metals cadmium and zinc in wastewater, an assay with two microalgae species *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and the cyanobacteria *Synechococcus* sp. was performed. The three species were grown at two different Cd ( $0.2 \text{ mg l}^{-1}$ ) and Zn ( $16 \text{ mg l}^{-1}$ ) concentrations used individually and mixed. Non significant differences were obtained on specific dry weight by treatment and species effect. The higher chlorophyll *a* concentration to *Scenedesmus obliquus* was obtained with the mixed addition of Cd and Zn. The cyanobacteria *Synechococcus* sp. was selected for the Cd and Zn removal assays, additionally the physiological characteristics of this species to decrease the toxic effect of metals was considered.

When *Synechococcus* sp. cultures were maintained at low and high concentrations of Cd ( $1$  and  $2 \text{ mg l}^{-1}$ ) and Zn ( $50$  and  $75 \text{ mg l}^{-1}$ ), was found that this species can growth at the two Cd and the lower Zn concentrations. However, with  $75 \text{ mg l}^{-1}$  of Zn added to the *Synechococcus* sp. cultures a high mortality was detected.

Non significant differences were obtained on specific dry weight of *Synechococcus* sp. cultured with low and high concentrations; only significant differences in chlorophyll *a* due to the treatments with Cd and Zn were detected.

*Synechococcus* sp. removed the same concentration of Cd ( $10 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cell}^{-1}$ ) at a low ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd and  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) and high ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd and  $75 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) concentrations of both metals individually or mixed treatments. The removal efficiency corresponded to 75 and 48% of the concentrations at the low and high Cd and Zn concentrations. However, when cadmium was added individually, the removal was directly related with the time exposure ( $9$  and  $15 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cell}^{-1}$ ; low and high, respectively). This removal efficiency corresponded to 64 and 70% of the concentration added to the low and high Cd and Zn concentrations, respectively.

The *Synechococcus* sp. Zn removal was directly related to the heavy metal time exposure, when it was added individually ( $48$  and  $69 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cell}^{-1}$ ; low and high, respectively) or mixed ( $50$  and  $68 \mu\text{g } 10^{-6} \text{ cell}^{-1}$ ; low and high, respectively). The concentrations removed for both cases were non significant different. The Zn removal corresponded to a 99% of the concentration added at a low time exposure and nearly 90%, when the exposure was high. We concluded that *Synechococcus* sp. can removed nearly 100% of Zn added, at a non lethal concentrations exposure.

This research shows that *Synechococcus* sp. can efficiently remove Cd and Zn in the culture media, this cyanobacteria have potential to be used in heavy metals waste waters bioremediation.

**Key words:** Removal, cadmium, zinc, growth, microalgae, cyanobacteriae.

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Hipótesis</b>	<b>10</b>
<b>I.2 Objetivo general</b>	<b>10</b>
<b>I.3Objetivos particulares</b>	<b>10</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
<b>II.1 Mantenimiento de las cepas</b>	<b>11</b>
<b>II.2 Curva de crecimiento</b>	<b>12</b>
<b>II.3 Selección de la especie de prueba</b>	<b>12</b>
<b>II.3.1 Primer experimento preliminar</b>	<b>12</b>
<b>II.3.2 Segundo experimento preliminar</b>	<b>14</b>
<b>II.3.3 Tercer experimento preliminar</b>	<b>14</b>
<b>II.3.4 Cuarto experimento preliminar (bioensayo de tolerancia)</b>	<b>14</b>
<b>II.4. Bioensayos de tolerancia y remoción de Cd y Zn</b>	<b>16</b>
<b>II.4. 1. Ensayo con bajas concentraciones (1 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn)</b>	<b>17</b>
<b>II.4. 2. Ensayo con altas concentraciones (2 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn)</b>	<b>17</b>
<b>II.5. Análisis estadístico</b>	<b>18</b>
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>III.1. Selección de la especie</b>	<b>19</b>
<b>Adecuación de las condiciones de cultivo</b>	<b>19</b>
<b>Crecimiento</b>	<b>20</b>
<b>Peso seco específico</b>	<b>26</b>
<b>Clorofila <i>a</i></b>	<b>28</b>
<b>III.2. Bioensayos de tolerancia y remoción de Cd y Zn</b>	<b>31</b>
<b>Crecimiento</b>	<b>31</b>
<b>Peso seco específico</b>	<b>36</b>
<b>Clorofila <i>a</i></b>	<b>37</b>
<b>Remoción de metales</b>	<b>39</b>
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>IV.1. Acondicionamiento del medio de cultivo</b>	<b>46</b>
<b>IV.2. Selección de la especie</b>	<b>50</b>

<b>CONTENIDO (Continuación)</b>	<b>Página</b>
<b>IV.3. Ensayo de tolerancia y remoción de metales</b>	<b>55</b>
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES</b>	<b>64</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd (▲), 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn (×) y las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (◆) y, sin adición de metales (■).	22
2	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de <i>Scenedesmus obliquus</i> con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd (▲), 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn (×) y las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (◆), y sin adición de metales (■).	23
3	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd (▲), 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn (×) y las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (◆), y sin adición de metales (■).	24
4	Valores promedio del peso seco específico para los cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican ± 1 error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; α = 0.05).	27
5	Valores promedio de peso seco específico para los cultivos de <i>Scenedesmus obliquus</i> con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican ± 1 error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; α = 0.05).	27
6	Valores promedio de peso seco específico para los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican ± 1 error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; α = 0.05).	28



## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
7	Valores promedio de clorofila <i>a</i> para los cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican ± 1 error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; α = 0.05).	29
8	Valores promedio de clorofila <i>a</i> para los cultivos de <i>Scenedesmus obliquus</i> con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican ± 1 error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; α = 0.05; a > b > c > d).	30
9	Valores promedio de clorofila <i>a</i> para los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican ± 1 error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; α = 0.05).	30
10	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de concentraciones bajas de metales: 1 mg l <sup>-1</sup> de Cd (■), 50 mg l <sup>-1</sup> de Zn (×), las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (▲) y sin adición de metales (◆).	32
11	Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de concentraciones altas de metales: 2 mg l <sup>-1</sup> de Cd (■), 75 mg l <sup>-1</sup> de Zn (✖), 75 mg l <sup>-1</sup> de Zn + NaHCO <sub>3</sub> (×), las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (▲) y sin adición de metales (◆).	33
12	Valores promedio de peso seco específico para los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de bajas concentraciones de metales: 1 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 50 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd), y sin adición de metales (Control). Las barras indican ± 1 error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; α = 0.05).	36

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
13	Valores promedio de peso seco específico para los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de altas concentraciones de metales: 2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 75 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ).	37
14	Valores promedio de clorofila <i>a</i> para los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de bajas concentraciones de metales: 1 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 50 mg l <sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; $a > b$ ).	38
15	Valores promedio de clorofila <i>a</i> expresados para los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con adición de cadmio a una concentración de 2 mg l <sup>-1</sup> y sin adición de metales (Control). Las barras indican $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; $a > b$ ).	39
16	Valores promedio de los porcentajes de remoción de cadmio (calculados a partir de las concentraciones en solución) de los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. a los cuales se les adicionaron: 1 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 1 mg l <sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l <sup>-1</sup> de Zn, y sin adición de metales (Control). Las barras indican $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , $a > b$ ).	42
17	Valores promedio de cadmio (normalizados por millón de células) en los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. expuestos a bajas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y la concentración final (Gris) de Cd. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , $a > b > c$ ).	42

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
18	Valores promedio de los porcentajes de remoción de zinc (calculados a partir de las concentraciones en solución) de los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. a los cuales se les adicionaron: 50 mg l <sup>-1</sup> de Zn, 1 mg l <sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l <sup>-1</sup> de Zn, y sin adición de metales (Control). Las barras indican $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , a > b).	43
19	Valores promedio de zinc en los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. expuestos a bajas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y la concentración final (Gris) de Zn. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , a > b).	43
20	Valores promedio de los porcentajes de remoción de cadmio (calculados a partir de las concentraciones en solución) de los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. a los cuales se les adicionaron: 2 mg l <sup>-1</sup> de Cd, 2 mg l <sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l <sup>-1</sup> de Cd, y sin adición de metales (Control). Las barras indican $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , a > b).	44
21	Valores promedio de cadmio en los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. expuestos a altas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y la concentración final (Gris) de Cd. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , a > b > c).	44
22	Valores promedio de los porcentajes de remoción de zinc de los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. a los cuales se les adicionaron: 75 mg l <sup>-1</sup> de Zn, 75 mg l <sup>-1</sup> de Zn + NaHCO <sub>3</sub> , 2 mg l <sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l <sup>-1</sup> de Zn y sin adición de metales (Control). Las barras representan $\pm 1$ error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , a > b).	45

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	LISTA DE FIGURAS (Continuación)	Página
23	<p>Valores promedio de zinc en los cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. expuestos a altas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y la concentración final (Gris) de Zn. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan <math>\pm 1</math> error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey; <math>\alpha = 0.05</math>, <math>a &gt; b</math>).</p>	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Valores promedio de la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) evaluada con densidad óptica (A) y por número de células (B) para cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO) y <i>Synechococcus</i> sp. (SYX), sin adición de metales (Control) y con adición de cadmio (Cd: 0.2 mg l <sup>-1</sup> ), zinc (Zn: 16 mg l <sup>-1</sup> ) y los dos metales juntos (Zn + Cd). Entre paréntesis se presenta la desviación estándar, las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; a > b).	25
II	Valores de probabilidad determinados con una ANOVA de una vía para determinar si había diferencias significativas entre el peso seco específico de los distintos tratamientos con los metales cadmio, zinc y el control, utilizando los valores de número de células obtenidos para los cultivos de dos especie de microalgas y la cianobacteria.	26
III	Valores promedio de la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) evaluada con densidad óptica y por número de células para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp., sin adición de metales (Control) y con adición de bajas (A: 1 mg l <sup>-1</sup> Cd y 50 mg l <sup>-1</sup> ) y altas concentraciones (A: 2 mg l <sup>-1</sup> Cd y 75 mg l <sup>-1</sup> ) de los metales cadmio y zinc y los dos metales juntos (Zn + Cd). Entre paréntesis se presenta la desviación estándar las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; a > b > c > d).	35
IV	Valores de la concentración de inóculo utilizados para realizar bioensayos de remoción de cadmio, zinc y otros metales (Cu) utilizando microalgas.	49
V	Efecto del cadmio y zinc en la respuesta fisiológica de microalgas y cianobacterias.	52
VI	Valores promedio de tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i> para el experimento de tolerancia con 0.2 mg l <sup>-1</sup> y 16 mg l <sup>-1</sup>	53

## **UTILIZACIÓN DE MICROALGAS PARA LA REMOCIÓN DE CADMIO Y ZINC DE EFLUENTES DE AGUAS RESIDUALES URBANAS**

### **I. INTRODUCCIÓN**

El medio marino es uno de los ambientes más expuestos a los contaminantes, debido a que es ahí donde llegan las descargas de aguas residuales provenientes de las actividades industriales y domésticas. Para poder descargarlas al mar, se les aplica una serie de tratamientos (Oswald, 1988) los cuales constan de los siguientes procesos:

- Tratamiento primario o sistema de tratamiento fisicoquímico. Este primer tratamiento consiste en técnicas de sedimentación y floculación, para remover las partículas sólidas.
- Tratamiento secundario. Este tratamiento se utiliza para bajar la carga orgánica de compuestos orgánicos solubles, utilizando lodos activados.
- Tratamiento terciario. Todos los compuestos orgánicos solubles, productos de la oxidación, son removidos mediante métodos físicos, químicos o biológicos.
- Tratamiento cuaternario. Este tratamiento consiste en utilizar la coagulación química y filtración por carbón activado, para degradar los compuestos orgánicos refractarios e inorgánicos tóxicos.
- Tratamiento quinario. Mediante ósmosis inversa, electrodiálisis y destilación solar se eliminan las sales inorgánicas, compuestos orgánicos residuales y metales pesados.

Las NOM (Norma Oficial Mexicana) que se aplican al cuidado del ambiente en México, son normas cuya aplicación está a cargo de la Secretaría del Medio Ambiente y

Recursos Naturales (SEMARNAT), y en las cuales se establecen los valores máximos de algunas de las variables como concentración de material orgánico, detergentes, metales traza, entre otros, permitidos para poderse descargar al mar. Para los metales traza los valores permitidos por la NOM-001-ECOL-1996 para descargas son entre otros,  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  para cadmio (Cd) y  $10 \text{ mg l}^{-1}$  para zinc (Zn).

Debido al crecimiento de la población, muchas veces las plantas de tratamiento reciben más agua para tratar que la que el sistema puede soportar. Por tal motivo se han tenido que buscar técnicas alternativas complementarias a los tratamientos tradicionales. Por lo anterior, se tiene la necesidad de desarrollar y ampliar sistemas de depuración de los efluentes de las aguas residuales e impulsar la búsqueda de nuevas especies potencialmente depuradoras.

En el caso de remoción de metales pesados, los métodos convencionales resultan costosos e ineficientes cuando la concentración de metales no es muy alta (10 a 50 ppm), por lo que el uso de sistemas biológicos para la eliminación de metales pesados a partir de soluciones diluidas tiene la capacidad de hacerlo a menor costo (Wase y Forster, 1997).

Algunos organismos procariontes y eucariontes han desarrollado diversas estrategias para disminuir el efecto tóxico de los metales a formas inocuas. Entre las estrategias de las microalgas se encuentran evitar el paso de los iones a través de la pared celular por medio de secreción de sustancias que producen uniones específicas con los iones metálicos del medio. El resultado de esta estrategia es formar complejos quelados que pueden quedar en el exterior de la pared celular o en compartimientos específicos en el interior de la célula. Un mecanismo común de detoxificación intracelular en microalgas es

la formación de péptidos o proteínas *e.g.* malato, citrato, polifosfato son algunos de los compuestos reportados como agentes quelantes intracelulares (Kaplan, 2005).

Debido a que las microalgas presentan adaptaciones y mecanismos de tolerancia, pudiendo ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, ofrecen una alternativa o ayuda a las técnicas convencionales para la eliminación y/o recuperación de metales (Cañizares-Villanueva, 2000).

Las microalgas, las cuales componen un grupo muy diversificado de microorganismos fotosintéticos, que varían en tamaño y forma, existen en casi todos los hábitats tanto marinos como dulceacuícolas.

*Chlorella vulgaris* es una Chlorophyta de forma esférica, unicelular, eucariota y presenta clorofila *a* y *b*. Se puede encontrar en medios marinos y de agua dulce, debido a que su pared celular se encuentra compuesta por una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido úrico. Esta microalga es capaz de incorporar grandes cantidades de metales ( $\text{Cr}^{+2,+3,+6}$ ,  $\text{Fe}^{+2,+3}$ ,  $\text{Cu}^{+1,+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2,+4}$  y  $\text{Hg}^{+1,+2}$ ) por medio de absorción y acumulación (Graham y Wilcox, 2000).

*Scenedesmus obliquus* al igual que *Chlorella vulgaris*, son microalgas de agua dulce que forman colonias de hasta 16 células. Las células son eucariotas generalmente cilíndricas y tienen en cada extremo una espina dorsal hasta de 200  $\mu\text{m}$  de longitud (Graham y Wilcox, 2000).

*Synechococcus* sp., a diferencia de las dos anteriores, son células procariontes. Al ser una cianobacteria tiene versatilidad metabólica y ecofisiológica, lo cual le permite



adaptarse a condiciones extremas de luz, temperatura, salinidad y nutrientes (Graham y Wilcox, 2000).

Las microalgas son consideradas con gran potencial de uso en la remoción de nutrientes (*e.g.* metales traza) por su alta capacidad de acumulación de metales, además de que presentan sensibilidad ante diversos materiales de prueba, sus requerimientos nutricionales son conocidos, poseen una alta tasa de crecimiento que permite conocer en pocos días la densidad y el efecto causado por el agente tóxico y su manipulación es relativamente sencilla en laboratorio (Cañizares-Villanueva y Casas-Campillo, 1991).

Las microalgas son muy sensitivas a la toxicidad de los metales y algunas especies son utilizadas como sensores biológicos para detectar efectos tóxicos potenciales de metales pesados. Los efectos tóxicos en microalgas pueden ser causados por diversos mecanismos: a) bloqueo de grupos funcionales de moléculas biológicamente importantes como enzimas en el sistema de transporte de nutrientes esenciales y de iones, b) desplazo o sustitución de iones metálicos esenciales de biomoléculas y unidades funcionales celulares. Lo anterior puede resultar en modificación e inactivación de enzimas o disrupción de la integridad de la membrana celular (Kaplan, 2005).

El proceso de bioabsorción de metales por microalgas es generalmente un proceso de dos fases que implican una adsorción extracelular (*e.g.* polisacáridos y mucílago), además de componentes celulares (*e.g.* grupos carboxy e hidroxí y sulfatos). Este proceso no metabólico y rápido que ocurre en células vivas y no vivas, depende de parámetros como: el pH, especies químicas del metal, tipo de alga y la concentración de biomasa. La segunda fase de absorción es la acumulación dentro de la célula, este es un proceso lento que implica transporte activo a través de la membrana y proteínas de unión en sitios

intracelulares. Este proceso es dependiente del metabolismo y es inhibido por bajas temperaturas, ausencia de aporte de energía y sólo ocurre en células vivas (Kaplan, 2005).

El estudio científico de las microalgas comenzó en 1890, cuando el microbiólogo holandés Biejelinck estableció cultivos puros de una microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*. Más tarde en 1919, se obtuvieron cultivos densos de *Chlorella* sp. en el laboratorio y se introdujo la idea de utilizar estos cultivos como una herramienta de trabajo en el estudio de la fotosíntesis.

La cantidad de nutrientes que contienen las aguas residuales favorecen el crecimiento de microalgas, esto permitió que en 1940 se estudiara la posibilidad de usar microalgas para purificar aguas residuales. Así también, Oswald (1957) comenzó a utilizar el concepto de producción masiva de microalgas para el tratamiento de aguas residuales. Los desarrollos tecnológicos para la producción masiva de microalgas han sido significativos en todo el mundo, ya que esto ha permitido que se utilicen en la remoción de desechos de aguas residuales, tales como nutrientes y metales, entre otros.

La presencia de ciertos nutrientes (*e.g.* metales traza), influyen en la productividad y en la composición de las comunidades algales. Los metales traza tienen un papel importante en la fisiología de las algas, ya que sirven de cofactores enzimáticos. Sin embargo, a elevadas concentraciones son tóxicos y pueden alterar procesos metabólicos, cuando el metal que es específico para la enzima es desplazado por otro metal que no posee los atributos químicos necesarios para su buen funcionamiento (Sunda, 1998).

En algunos casos dos o más metales que compiten por el mismo sitio funcional tienen los atributos químicos necesarios para llevar a cabo la actividad enzimática, como en el caso del cadmio y el zinc, los cuales son similares químicamente, ya que pertenecen al

mismo grupo dentro de la tabla periódica (Grupo IIB), esto permite que cuando el zinc es limitante pueda ser sustituido por el cadmio; sin embargo, puede afectar la fisiología de algunas microalgas (Sunda, 1998). Price y Morel (1990) indicaron que la sustitución del zinc por el cadmio no afecta el crecimiento de algunas microalgas, sin embargo el desarrollo de las células no es óptimo. El cadmio puede ser utilizado por algunas especies de fitoplancton como un nutriente cuando las concentraciones de Zn son moderadamente limitantes (Lee y Morel, 1995) pero en altas concentraciones es considerado uno de los elementos más tóxicos.

La emisión global del cadmio hacia el ambiente proviene en su mayor parte de fuentes antropogénicas, estando asociado a la extracción del Zn y a desechos de las industrias de plásticos, pinturas, aleaciones metálicas y otras operaciones industriales. El cadmio ha sido reconocido como un agente peligroso de contaminación ambiental y es acumulado por el fitoplancton. En el mar se encuentra en concentraciones de  $0.04 \mu\text{g l}^{-1}$  y el 78% se encuentra en forma orgánica (Maeda y Sakaguchi, 1990). Mientras tanto en aguas residuales el cadmio se puede encontrar en concentraciones de  $0.6 \mu\text{g l}^{-1}$  (Racourds, 1994).

En la literatura del área se menciona que las especies que acumulan cadmio son: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella regularis*, *Scenedesmus bijuga*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas angulosa* y *Scenedesmus choreloides* (Maeda y Sakaguchi, 1990). Nagano *et al.* (1977) reportaron que *Chlorella ellipsoidea* puede acumular cadmio con un coeficiente de concentración alrededor de 166. Así también, *Chaetomorpha brychagona* y *Enteromorpha crinita* acumulan altas concentraciones de zinc, proveniente de aguas contaminadas (Maeda y Sakaguchi, 1990).

El zinc es un elemento esencial para el desarrollo de muchas clases de organismos vegetales y animales. El zinc es una sustancia muy común que se encuentra naturalmente y muchos alimentos contienen concentraciones de este metal. El agua potable también contiene algunas cantidades de zinc, la cual puede ser mayor cuando es almacenada en tanques de metal. Las fuentes industriales o los reservorios para residuos tóxicos pueden ser la causa del zinc en el agua potable llegando a niveles que causan problemas de salud pública (Maeda y Sakaguchi, 1990). Mientras tanto en aguas residuales el zinc se puede encontrar en concentraciones de  $38 \mu\text{g l}^{-1}$  (Raco-Rands, 1994).

En el mar se pueden encontrar alrededor de 3.9 a  $4.9 \mu\text{g l}^{-1}$  y cerca del 37% del zinc se encuentra como material orgánico disuelto (Maeda y Sakaguchi, 1990). Además de estudiar la acumulación y tolerancia del Cd y el Zn por microalgas también se han expuesto microalgas a otros elementos como arsénico, aluminio, cromo, cobre, oro, plomo, mercurio, selenio y uranio.

Maeda y Sakaguchi (1990) indicaron que algunas algas acumulan altos niveles de elementos tóxicos. *Chlorella vulgaris* acumula altos niveles de arsénico, así como otros metales y es debido a que tiene mecanismos de detoxificación por medio de los cuales transforma el metal que está acumulando. Este grupo de algas podría ser utilizado para controlar las concentraciones de arsénico en aguas naturales y en aguas de desecho industrial. Otros géneros de microalgas de agua dulce (*Chlorella* sp. y *Oscillatoria* sp.) y agua de mar (*Phaeodactylum* sp. y *Skeletonema* sp.), acumularon arsénico de una solución acuosa con  $1\text{-}30 \text{ mg l}^{-1}$  de arsénico, con un factor de concentración de 240-2800 y 710-2900 respectivamente (Lunde, 1973).

Algunas microalgas como: *Eucheuma striatum*, *Euchena spinosum* y *Stigeoclonium tenue*, absorben plomo de forma eficiente a través de la pared celular (Silverberg, 1975). En tanto que las microalgas que acumulan cantidades significativas de mercurio son: *Carteria* sp., *Dunaliella tertiolecta* y *Nitzschia closterium* (Nagano *et al.*, 1975).

Sakaguchi *et al.* (1978) demostraron que algunas especies de microalgas, entre las que se encuentran *Chlorella regularis*, *Chlamydomonas* sp. y *Scenedesmus* sp., pueden absorber uranio. Edgington *et al.* (1970) examinó la acumulación de uranio en 20 especies de microalgas, encontrando que las que tienen mayor factor de concentración de este metal son: *Dictyoca divaricata*, *Halimeda opuntia* y *Penicillus capitatus*. Greene *et al.* (1986) encontraron que las células de *Chlorella vulgaris* acumulan cantidades significativas de uranio(VI).

*Chlamydomonas* sp. aclimatada en altas concentraciones de cromo, muestra una gran habilidad para remover este metal (Ryder, 1979). También, *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus obliquus* pueden acumular cromo proveniente de aguas residuales ( $50 \mu\text{g l}^{-1}$ ) con un factor de acumulación de 320 y 230, respectivamente (Becker, 1983).

Nakajima *et al.* (1981) indicaron que varias microalgas verdes pueden acumular cobre, debido a que presentan tolerancia a este ión metálico (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas angulosa* y *Scenedesmus bijuga*).

Se tienen antecedentes de que se pueden utilizar microalgas para remover molibdeno de sistemas acuosos (Sakaguchi *et al.*, 1981). Especies como *Scenedesmus chlorelloides*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella regularis*, *Scenedesmus bijuga*, *Chlamydomonas angulosa* y *Scenedesmus obliquus*, resultaron ser eficientes para la acumulación de molibdeno.

Alrededor de 15 especies pertenecientes a 6 fila (*Chlorophyceae*, *Cryptophyceae*, *Xanthophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae* y *Prasinophyceae*) acumulan aluminio del agua de mar artificial (Madena *et al.*, 1985).

La microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris* tiene una alta afinidad con el oro, por lo que esta microalga puede acumular tanto oro(I) como oro(III) de soluciones acuosas (Maeda y Sakaguchi, 1990).

## **I.1 HIPÓTESIS**

Las microalgas pueden remover altas concentraciones de los metales cadmio y zinc similares a las encontradas en los efluentes provenientes de aguas residuales urbanas.

## **I.2 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la tolerancia y capacidad de remoción de cadmio y zinc utilizando cultivos de dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*) y de una especie de cianobacteria (*Synechococcus* sp.).

## **I.3 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la tasa de crecimiento de dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*) y una cianobacteria (*Synechococcus* sp.), al ser mantenidas con distintas concentraciones de los metales cadmio y zinc.
- Evaluar la remoción de los metales cadmio y zinc por la cepa de microalga o cianobacteria seleccionada y mantenida en forma libre en el medio.

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.1. Mantenimiento de los cultivos**

Los cultivos de las microalgas y cianobacteria se realizaron en sistema estático o sin recambio de medio de cultivo, y se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 125 ml a los cuales se les agregaron 100 ml de medio de cultivo f (Guillard y Ryther, 1962). El medio f contiene: nitratos  $150 \text{ mg l}^{-1}$ , fosfatos  $10 \text{ mg l}^{-1}$ , silicatos  $60 \text{ mg l}^{-1}$ , vitaminas y metales traza.

Para inocular las microalgas, se limpió el área de trabajo con alcohol al 70% para evitar cualquier contaminación y la transferencia se realizó mediante pipetas Pasteur previamente lavadas y esterilizadas, todas las transferencias se realizaron junto a un mechero. Se tomó una muestra de la cepa de las microalgas con una pipeta Pasteur. La punta de ésta se esterilizó nuevamente con la flama del mechero antes de introducirla a la cepa. La boca de los recipientes inoculados se acercó a la flama del mechero para eliminar la introducción de otros organismos antes de colocarle su tapón respectivo.

Los recipientes se rotularon con el género y la especie del organismo, y la fecha de inoculación. Una vez terminada la inoculación, las cepas nuevas se mantuvieron en una cámara climática en condiciones controladas de luz y temperatura, favorables para el crecimiento de la microalga y la cianobacteria.

Se realizaron transferencias de los cultivos de forma rutinaria a nuevo medio de cultivo, dependiendo de la tasa de crecimiento que tuvo cada especie (cada 7 a 15 días).



## **II.2. Curva de Crecimiento**

Para caracterizar el crecimiento de cada especie, se mantuvieron cultivos monoespecíficos, no axénicos y por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio de cultivo utilizando el doble (2f) de la concentración descrita por Guillard y Ryther (1962). Para determinar la cantidad de inóculo se realizaron conteos de células, utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Nikon ND2). Con base en la cantidad de células evaluadas para cada especie, se adicionó como inóculo el 10% de la biomasa total. Diariamente se midió el aumento de biomasa celular mediante la evaluación de la densidad óptica (DO) utilizando un espectrofotómetro (HACH DR/4000 UV) a una longitud de onda de 550 nm.

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura controlada de  $20 \pm 1$  °C y con iluminación constante de  $166 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provista por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvania F40CW).

## **II.3. Selección de la especie**

### **II.3.1. Primer experimento preliminar**

Se realizaron cultivos monoespecíficos y no axénicos de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* y de la cianobacteria *Synechococcus* sp. Para evaluar el efecto de los metales a estudiar en cada especie, se realizaron 3 tratamientos y un control mantenidos por triplicado en tubos de ensaye de 11 ml de capacidad, a los cuales se les adicionaron:

1. Control: 9 ml de medio de cultivo f y 1 ml de inóculo.

2. Primer tratamiento: 7 ml de medio de cultivo f, 1 ml de inóculo, 1 ml de Cd y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 0.2 mg l<sup>-1</sup> y 10 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.
3. Segundo tratamiento: 7 ml de medio de cultivo f, 1 ml de inóculo, 1 ml de Cd y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 1 mg l<sup>-1</sup> y 15 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.
4. Tercer tratamiento: 7 ml de medio de cultivo f, 1 ml de inóculo, 1 ml de Cd y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 1.5 mg l<sup>-1</sup> y 25 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para obtener las concentraciones de los metales Cd y Zn, cantidades apropiadas de CdCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> fueron disueltas en agua destilada. En estos ensayos no se realizó un control del pH del medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura controlada de 20 ± 1 °C y con iluminación constante de 166 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provista por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvania F40CW).

Diariamente se determinó indirectamente la cantidad de biomasa en cada condición experimental por medio de mediciones de la DO a una longitud de onda de 550 nm utilizando un espectrofotómetro marca HACH (DR/4000 UV). Además, se evaluó la cantidad de células por medio de conteos directos utilizando un hematocitómetro y un microscopio compuesto (Nikon ND2).

### **II.3.2. Segundo experimento preliminar**

Se realizaron cultivos monoespecíficos y por triplicado de las tres especies utilizadas en el primer experimento preliminar y con las mismas condiciones experimentales descritas. La única diferencia para este experimento fue que se centrifugaron 30 ml de cultivo en fase exponencial para cada especie durante 5 minutos a 4000 rpm (2465 g). Este procedimiento se realizó para así poder tener una mayor biomasa que fue utilizada como inóculo en los ensayos. Debido al estrés que pudo generar el proceso de centrifugado, las células se dejaron aclimatar durante 3 días.

### **II.3.3. Tercer experimento preliminar**

Se realizaron cultivos monoespecíficos y por triplicado de las tres especies utilizadas en el primer experimento preliminar y con las mismas condiciones experimentales descritas. Las diferencias para este experimento fueron: un incremento en la cantidad de biomasa utilizada como inóculo en los ensayos y la regulación del pH del medio de cultivo entre 7 y 8 adicionando bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) en una proporción de  $16.8 \text{ mg l}^{-1}$  (Stein, 1973).

### **II.3.4. Cuarto experimento preliminar (bioensayo de tolerancia)**

Se realizaron cultivos monoespecíficos y no axénicos de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* y de la cianobacteria *Synechococcus* sp. Para estos ensayos se adicionó el doble de la concentración de nutrientes en el medio de cultivo f (2f) (Guillard y Ryther, 1962).

Para evaluar el efecto de los metales a estudiar en cada especie, se realizaron 3 tratamientos (a los cuales se les adicionaron los metales al cuarto día) y un control que fueron mantenidos por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, a los cuales se les adicionaron:

- 1 Control: 100 ml de medio de cultivo 2f y 10% de inóculo.
- 2 Primer tratamiento: 99 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo, 1 ml de Cd para obtener una concentración final en el medio de cultivo de  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$ .
- 3 Segundo tratamiento: 98 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo, 1 ml de Cd y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  y  $16 \text{ mg l}^{-1}$  respectivamente.
- 4 Tercer tratamiento: 99 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de  $16 \text{ mg l}^{-1}$ .

Las concentraciones requeridas de los metales Cd y Zn se obtuvieron a partir de la disolución de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$  en agua destilada. En estos ensayos se realizó un control de pH del medio de cultivo (7.8 a 8.0). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura controlada de  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y con iluminación constante de  $166 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  provista por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvania F40CW).

Diariamente se determinó indirectamente la cantidad de biomasa en cada condición experimental por medio de mediciones de la DO a una longitud de onda de 550 nm utilizando un espectrofotómetro marca HACH (DR/4000 UV). Además se evaluó la cantidad de células por medio de conteos directos como ya fue descrito en la sección II.3.1.

Con base en los valores de DO y conteos de células se calculó la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) utilizando la ecuación propuesta por Guillard (1975):

$$\mu = \frac{\log_2(N_1/N_0)}{t_1 - t_0}$$

En donde:

$N_1$  = número de células o densidad óptica al tiempo final

$N_0$  = número de células o densidad óptica al tiempo inicial

$t_1$  = tiempo final

$t_0$  = tiempo inicial.

Además, se evaluó la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) según descrito por Nieves *et al.* (2005).

Para cada tratamiento se evaluó el contenido de clorofila *a* como un indicador indirecto del crecimiento utilizando la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984). Además, para evaluar el aumento de biomasa de las cepas, se midió el peso seco de un volumen conocido de microalgas (peso específico) según la técnica descrita por Sorokin (1973).

#### **II.4. Bioensayos de tolerancia y remoción de Cd y Zn**

Para evaluar la capacidad de remoción de metales de la especie seleccionada, se realizaron 2 ensayos en cultivos monoespecíficos y no axénicos. En el primer ensayo se utilizaron concentraciones bajas de cadmio y zinc ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  y  $50 \text{ mg l}^{-1}$ , respectivamente) y en el segundo ensayo se utilizaron concentraciones altas de cadmio y zinc ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  y  $75 \text{ mg l}^{-1}$ , respectivamente). Estos ensayos se mantuvieron para cada caso por triplicado en matraces Erlenmeyer de 150 ml de capacidad y con 125 ml de medio de cultivo y a los cuales se les adicionaron:

**II.4. 1. Ensayo con bajas concentraciones (1 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn)**

1. Control: 100 ml de medio de cultivo 2f y 10% de inóculo.
2. Primer tratamiento: 124 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo y 1 ml de Cd para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 1 mg l<sup>-1</sup>.
3. Segundo tratamiento: 123 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo, 1 ml de Cd y 1ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 1mg l<sup>-1</sup> y 50 mg l<sup>-1</sup> respectivamente.
4. Tercer tratamiento: 124 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo y 1 ml Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 50 mg l<sup>-1</sup>.

**II.4. 2. Ensayo con altas concentraciones (2 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn)**

1. Control: 125 ml de medio de cultivo 2f y 10% de inóculo.
2. Primer tratamiento: 124 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo y 1 ml de Cd para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 2 mg l<sup>-1</sup>.
3. Segundo tratamiento: 123 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo, 1 ml de Cd y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 2 mg l<sup>-1</sup> y 75 mg l<sup>-1</sup> respectivamente.
4. Tercer tratamiento: 124 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 75 mg l<sup>-1</sup>.
5. Cuarto tratamiento: 124 ml de medio de cultivo 2f, 10% de inóculo y 1 ml de Zn para obtener una concentración final en el medio de cultivo de 75 mg l<sup>-1</sup> y se adicionó bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) en una proporción de 16.8 mg l<sup>-1</sup>.

Los matraces se colocaron en condiciones controladas de luz ( $166 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y temperatura ( $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Se realizaron muestreos diarios de las cepas para medir la DO y el número de células como se describió en la sección II.3.1 y se monitoreó, además, la temperatura y el pH. El día 10 se evaluó el peso específico, la concentración de clorofila *a* y las concentraciones de Cd y Zn en el medio para cada situación experimental.

Las concentraciones de Cd y Zn se midieron utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica de flama SpectrAA 220 marca Varian del Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California.

## **II.5. Análisis estadístico**

Para evaluar el efecto del Cd y el Zn en la tasa de crecimiento de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y de *Synechococcus* sp., así como la capacidad de remoción de cadmio y zinc por las microalgas/cianobacteria, se utilizó un análisis de varianza de una vía. Para cada caso se utilizó estadística paramétrica (ANOVA) o no paramétrica (Kruskal-Wallis), en dependencia de que los datos cumplieran con las hipótesis que fundamentan las pruebas paramétricas (normalidad y homogeneidad de varianzas) (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984).

En estos análisis estadísticos se utilizó un nivel de significancia de 0.05 y los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA<sup>®</sup> versión 6 (StatSoft, Inc., 2002).

### **III. RESULTADOS**

#### **III.1. Selección de la especie**

##### **Adecuación de las condiciones de cultivo**

Con base en los tres experimentos preliminares se logró tener las condiciones adecuadas para el mantenimiento de los cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp.

Durante el primer experimento preliminar se encontró que por adición de los metales Cd y Zn el pH del medio disminuyó a valores entre 4 y 5, afectando negativamente el crecimiento de los cultivos por lo que no se obtuvo un incremento en la biomasa medida por medio de la densidad óptica o del número de células en los tratamientos.

En el segundo ensayo preliminar se realizó un ajuste del pH del medio que permitió que éste se mantuviera entre valores de 7.8 y 8.0, sin embargo se utilizó una baja concentración de células de cada especie de microalga por lo que no se encontró un incremento significativo en el crecimiento de los cultivos.

En el tercer experimento preliminar se aumentó la cantidad inicial de biomasa, sin embargo no se encontró un crecimiento significativo de los cultivos, ya que se continuó utilizando tubos de ensayo de 11 ml lo cual pudo haber afectado el balance de los carbonatos y con ello el crecimiento de las células dado que el espacio de interfase entre el agua y el aire era muy pequeño.

En el cuarto experimento se logró la estandarización de los procedimientos para el mantenimiento de los cultivos de las tres especies, las condiciones adecuadas fueron: mantener el pH del medio de cultivo en valores promedio de  $8.0 \pm 0.3$ , utilizar recipientes de volúmenes mayores (125 ml) para tener un espacio para la interfase aire-agua que



favoreciera el intercambio de gases. Se incrementó, además, la cantidad de células utilizadas como inóculo a valores del 10% de la densidad de células mantenidas en la fase exponencial para cada especie y se aumentó la cantidad de nutrientes del medio de cultivo al doble (2f) del descrito por Guillard y Ryther (1962). Para los ensayos se utilizó una temperatura ambiental promedio de  $20 \pm 1$  °C e iluminación continua de  $166 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **Crecimiento**

El crecimiento de *Chlorella vulgaris* cultivada con distintas concentraciones de cadmio y zinc, no mostró diferencias significativas al ser evaluada por densidad óptica ( $P = 0.551$ ) ni por número de células ( $P = 0.760$ ) (Figura 1).

En *Scenedesmus obliquus* se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.012$ ) en el crecimiento evaluado como densidad óptica, entre las cepas a las cuales se les adicionaron cadmio y zinc solos, siendo estos tratamientos en los que se obtuvo un mayor crecimiento. Sin embargo, no existió diferencia significativa ( $P = 0.364$ ) al evaluar el crecimiento con base en el número de células entre los distintos tratamientos (Figura 2).

Para *Synechococcus* sp., no se encontró diferencia significativa en el crecimiento obtenido como densidad óptica ( $P = 0.997$ ) ni por número de células ( $P = 0.807$ ), mantenida con las distintas concentraciones de cadmio y zinc (Figura 3).

En las curvas de crecimiento evaluadas por número de células para *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp. se presentó una fase de acondicionamiento de 2 días al medio de cultivo. Se observó una fase exponencial de crecimiento hasta el día 12 para los cultivos de las tres especies, excepto para los cultivos

de *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp. en donde se presentó fase exponencial al día 8 para los cultivos con adición de Cd (Figuras 1, 2 y 3).

Los valores de la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) para *Chlorella vulgaris* evaluados mediante densidad óptica resultaron significativamente menores ( $P = 0.003$ , Tabla I A) con la adición de cadmio solo. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.090$ , Tabla I B) en la  $\Sigma\mu$  evaluada por medio del número de células, mantenidas con las distintas concentraciones de cadmio y zinc.

En el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.447$ , Tabla I A) en la tasa de crecimiento acumulado evaluado mediante densidad óptica ni por número de células ( $P = 0.250$ , Tabla I B) por efecto de los tratamientos con cadmio y zinc.

En los cultivos de *Synechococcus* sp. no se encontró diferencia significativa en la tasa de crecimiento acumulado evaluado por densidad óptica ( $P = 0.695$ , Tabla I A), ni por el número de células ( $P = 0.031$ , Tabla I B) al mantener a *Synechococcus* sp. en los distintos tratamientos con cadmio y zinc.

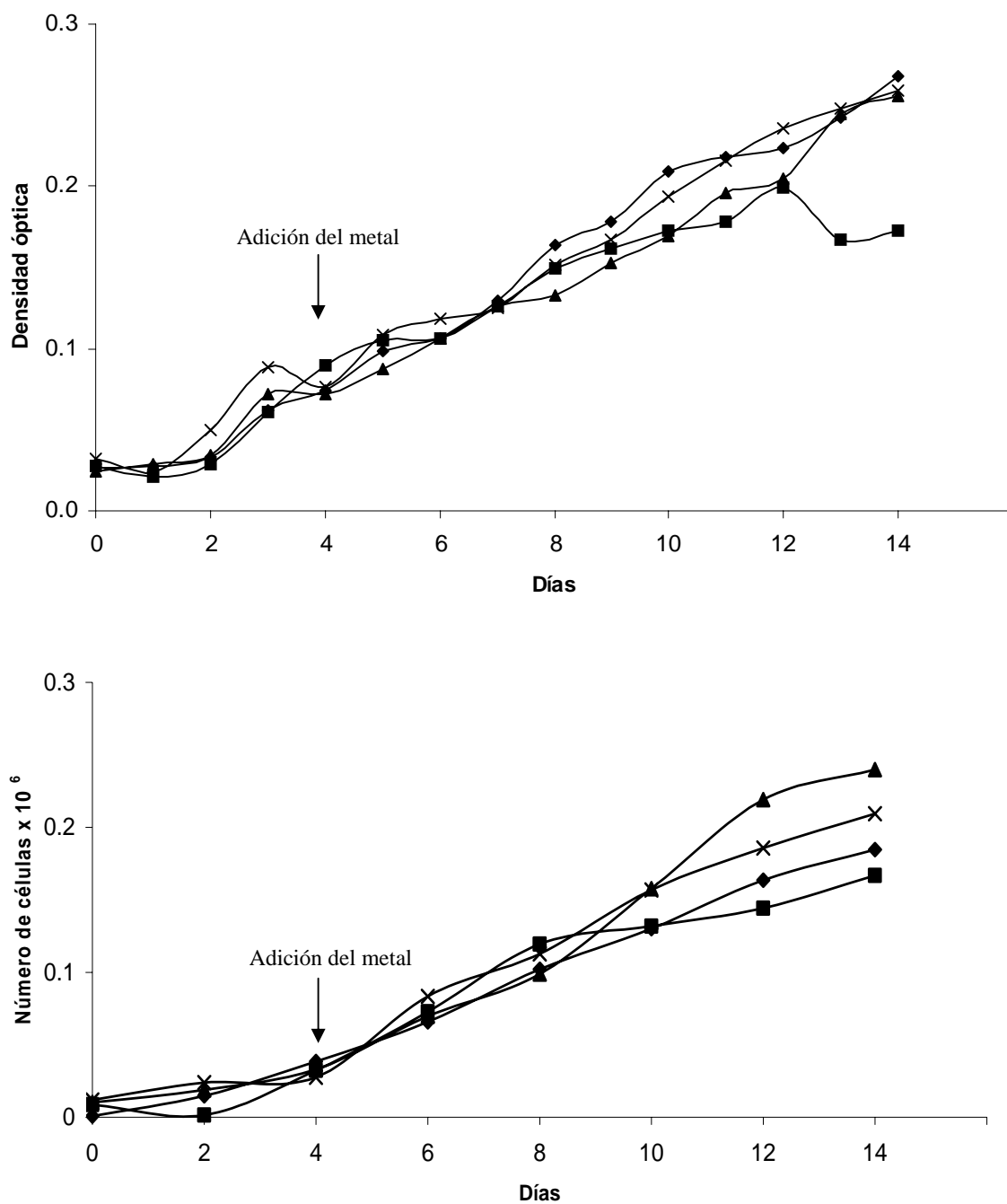


Figura 1. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de *Chlorella vulgaris* con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l<sup>-1</sup> de Cd (▲), 16 mg l<sup>-1</sup> de Zn (×), las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (◆) y sin adición de metales (■).

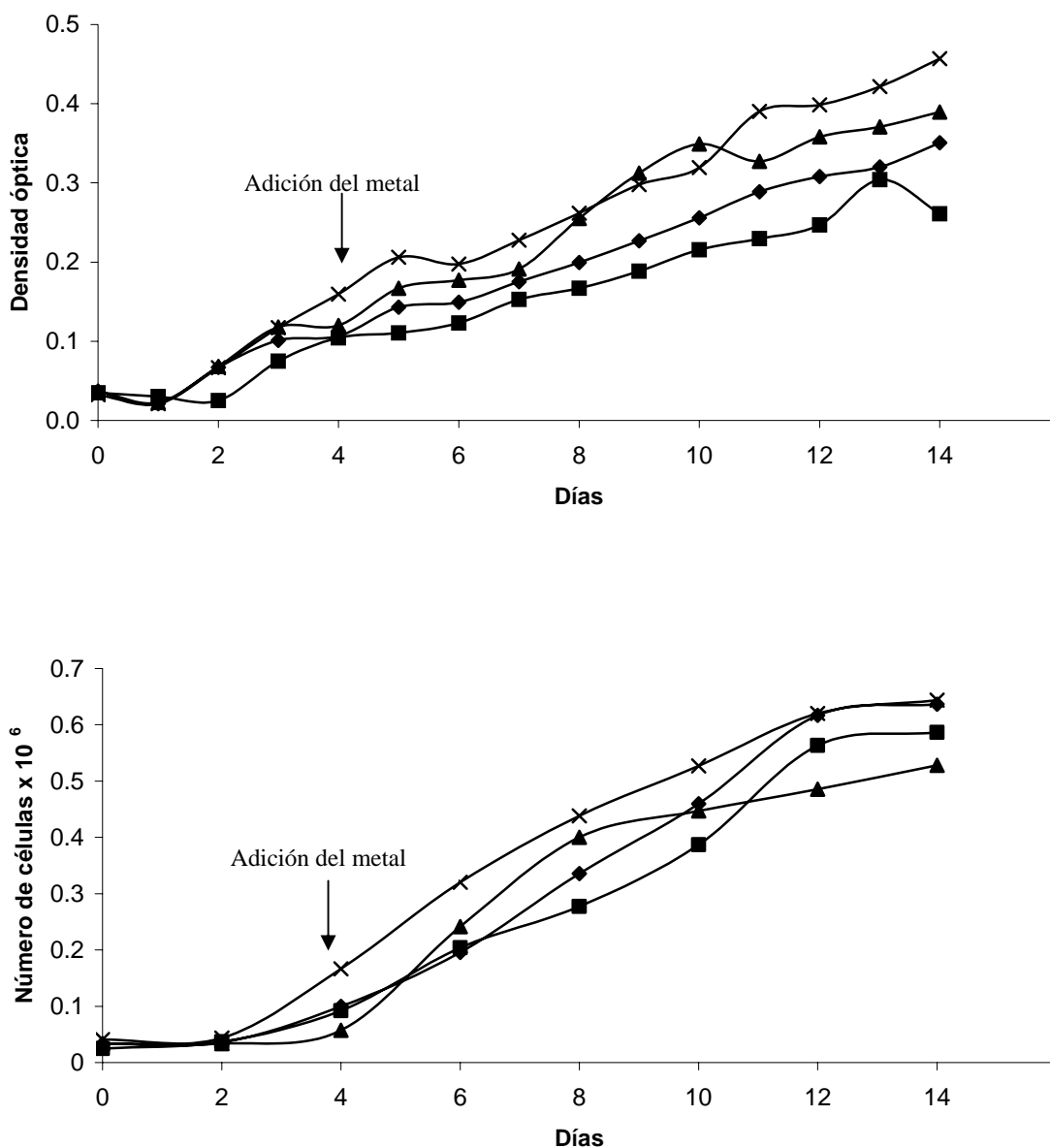


Figura 2. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de *Scenedesmus obliquus* con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l<sup>-1</sup> de Cd (▲), 16 mg l<sup>-1</sup> de Zn (×), las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (◆) y sin adición de metales (■).

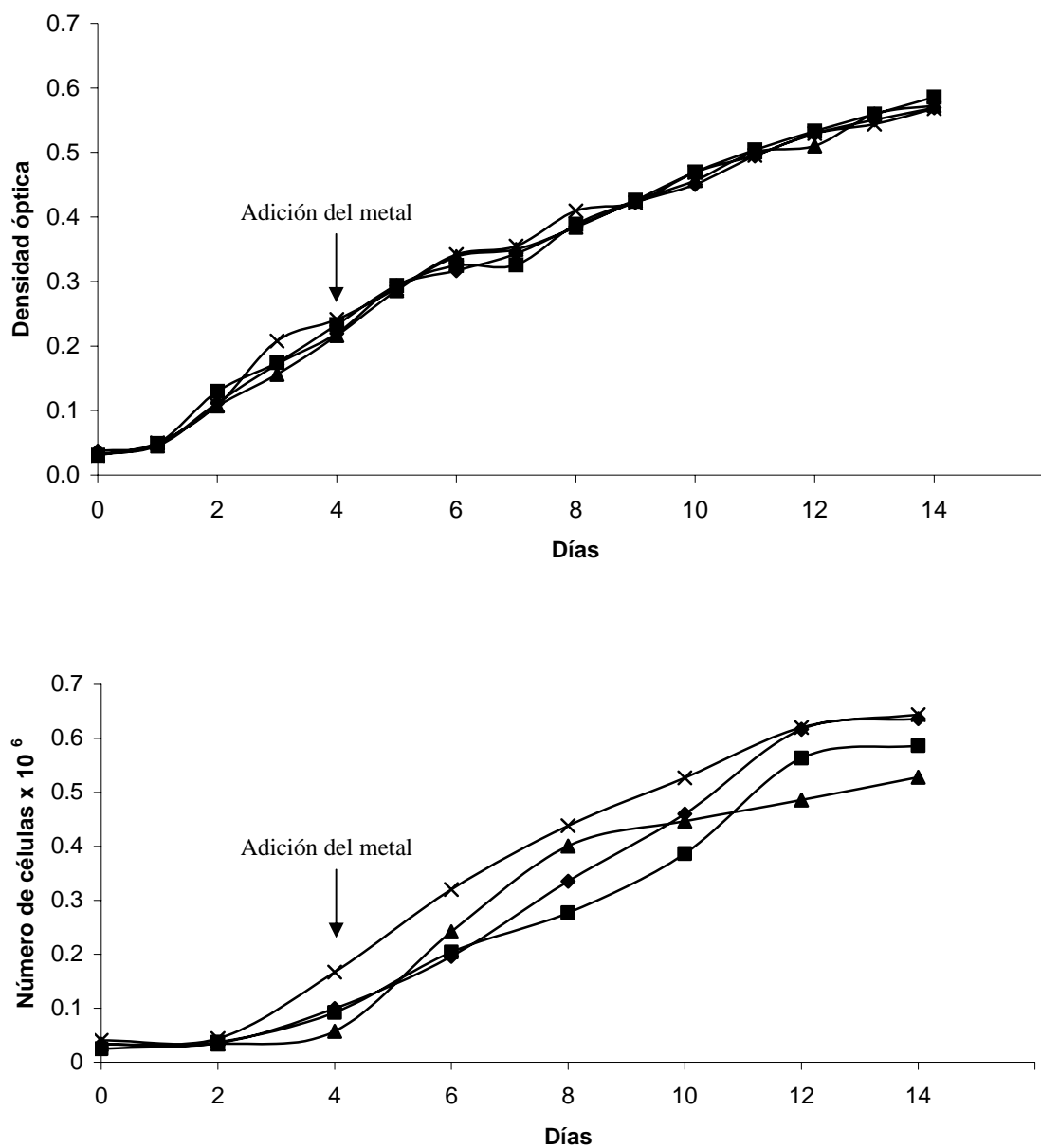


Figura 3. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l<sup>-1</sup> de Cd (▲), 16 mg l<sup>-1</sup> de Zn (×), las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (◆) y sin adición de metales (■).

Tabla I. Valores promedio de la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) evaluada con densidad óptica (A) y por número de células (B) para cultivos de *Chlorella vulgaris* (CLV), *Scenedesmus obliquus* (SCO) y *Synechococcus* sp. (SYX), sin adición de metales (Control) y con adición de cadmio ( $0.2 \text{ mg l}^{-1}$ ), zinc ( $16 \text{ mg l}^{-1}$ ) y los dos metales juntos (Zn + Cd). Entre paréntesis se presenta la desviación estándar. Las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ ).

<b>A</b>				
Clave de la especie	Control	Cd	Zn + Cd	Zn
CLV	0.56 (0.07)a	0.29 (0.07)b	0.54 (0.07)a	0.54 (0.02)a
SCO	0.37 (0.19)a	0.50(0.09)a	0.45 (0.01)a	0.51 (0.03)a
SYX	0.41 (0.41)a	0.40 (0.04)a	0.37 (0.02)a	0.42 (0.05)a

<b>B</b>				
Clave de la especie	Control	Cd	Zn + Cd	Zn
CLV	4.375 (0.078)a	4.247 (0.270)a	4.534 (0.210)a	3.935 (0.174)a
SCO	4.256 (0.058)a	4.565 (0.091)a	3.968 (0.115)a	3.973 (0.028)a
SYX	2.676 (0.089)a	2.447 (0.167)a	3.855 (1.704)a	2.562 (0.092)a

### **Peso seco específico**

En los cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp., no se encontraron diferencias significativas entre los valores de peso seco (Tabla II) al mantenerlos con distintas concentraciones de cadmio y zinc (Figuras 4, 5 y 6).

Tabla II. Valores de probabilidad determinados con un ANOVA de una vía para determinar si había diferencias significativas entre el peso seco específico (mg por millón de células) de los distintos tratamientos con los metales cadmio, zinc y el control, para los cultivos de las tres especies utilizadas.

<b>Clave de la especie</b>	<b>Probabilidad</b>
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.479
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.898
<i>Synechococcus</i> sp.	0.752

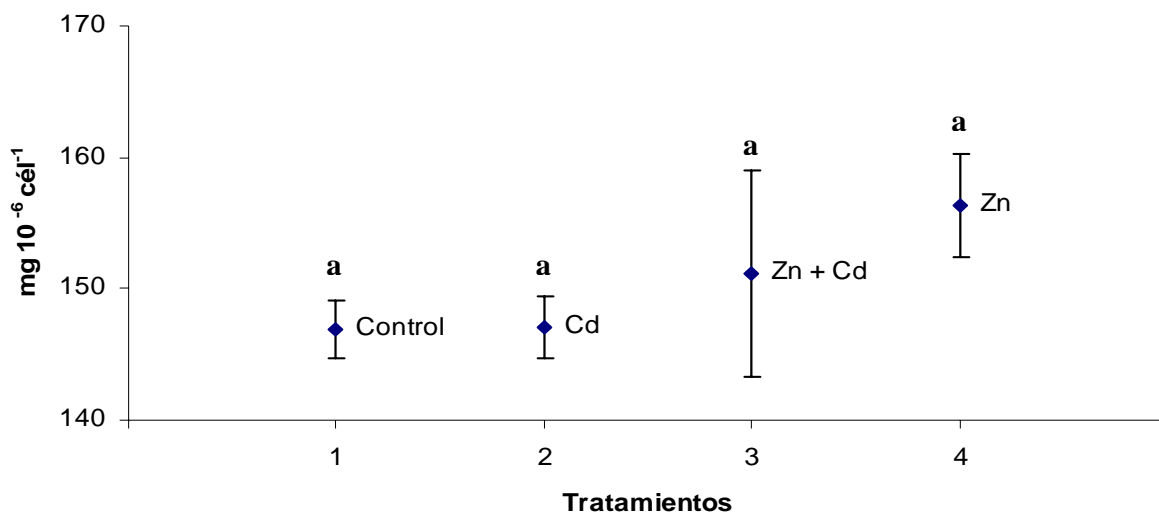


Figura 4. Valores promedio del peso seco específico para los cultivos de *Chlorella vulgaris* con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l<sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ).

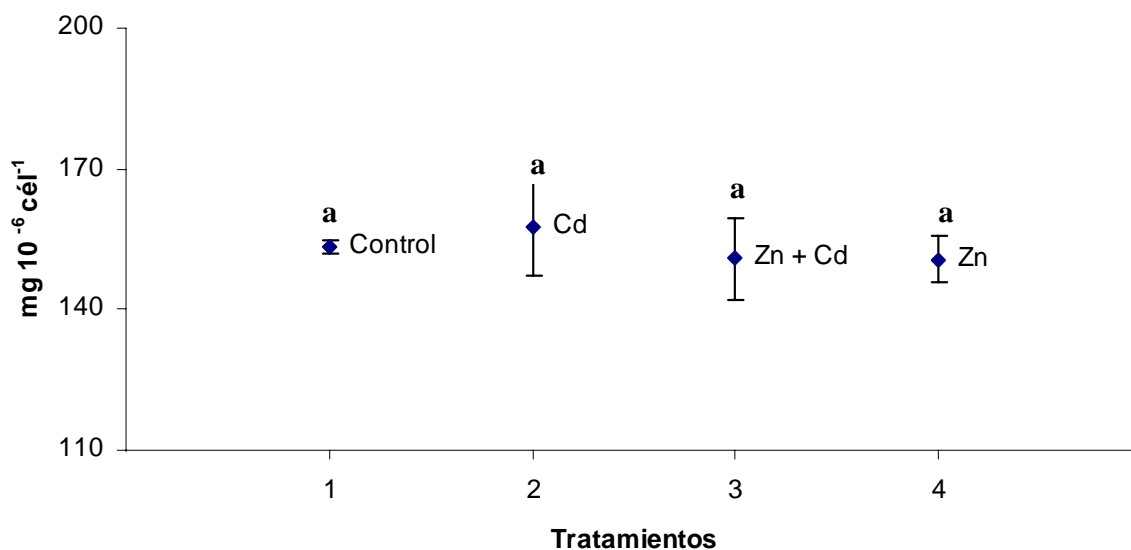


Figura 5. Valores promedio del peso seco específico para los cultivos de *Scenedesmus obliquus* con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l<sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ).



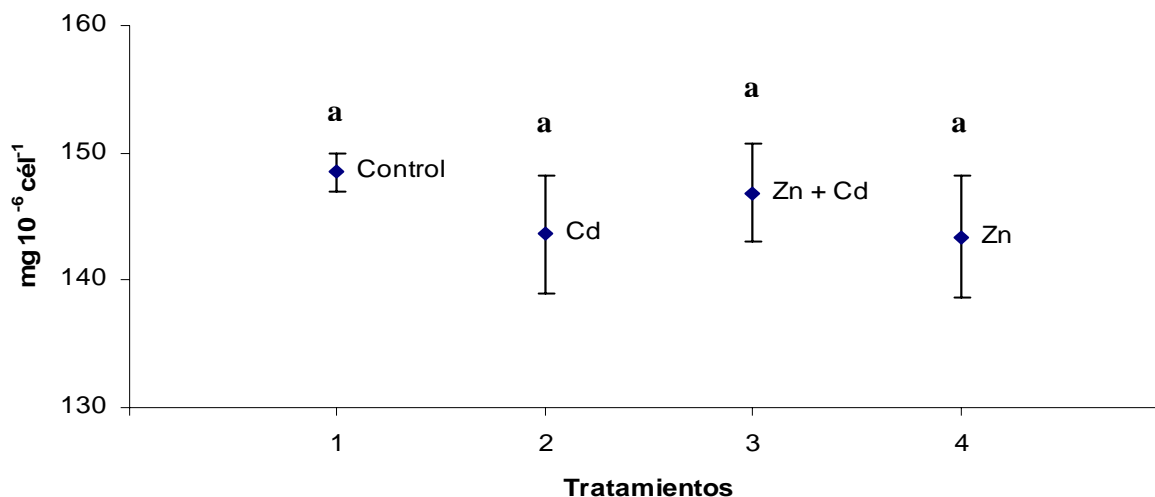


Figura 6. Valores promedio del peso seco específico para los cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de distintas concentraciones de metales: 0.2 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 16 mg l<sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ).

### Clorofila *a*

Para *Chlorella vulgaris* no se evaluaron diferencias significativas entre los valores de clorofila *a* ( $P = 0.162$ ) al mantener los cultivos con distintas concentraciones de cadmio y zinc (Figura 7).

Sin embargo, para *Scenedesmus obliquus* sí se encontraron diferencias significativas entre los valores de clorofila *a* ( $P = 0.000$ ), al mantenerla en los distintos tratamientos con cadmio y zinc (Figura 8). La mayor concentración de clorofila *a* se observó en el tratamiento al cual se le adicionaron Cd y Zn juntos con respecto a los tratamientos a los cuales se les agregaron Zn y Cd solos y el control.

*Synechococcus* sp. no presentó diferencias significativas entre los valores de clorofila *a* ( $P = 0.314$ ), al ser mantenida en los diferentes tratamientos con cadmio y zinc (Figura 9).

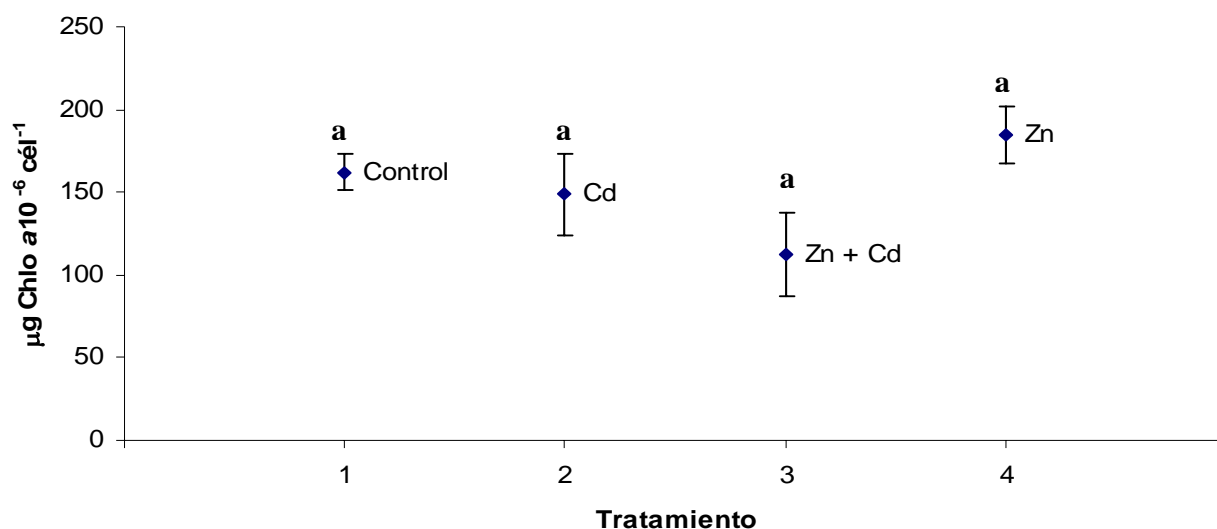


Figura 7. Valores promedio de clorofila *a* para cultivos de *Chlorella vulgaris* con adición de distintas concentraciones de metales:  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd,  $16 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ).

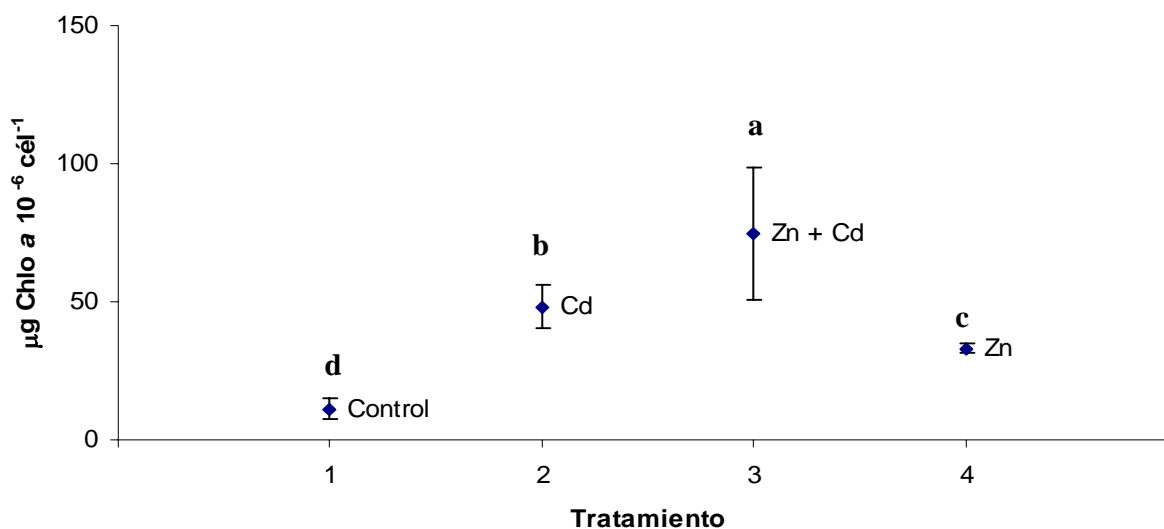


Figura 8. Valores promedio de clorofila *a* para los cultivos de *Scenedesmus obliquus* con adición de distintas concentraciones de metales:  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd,  $16 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ).

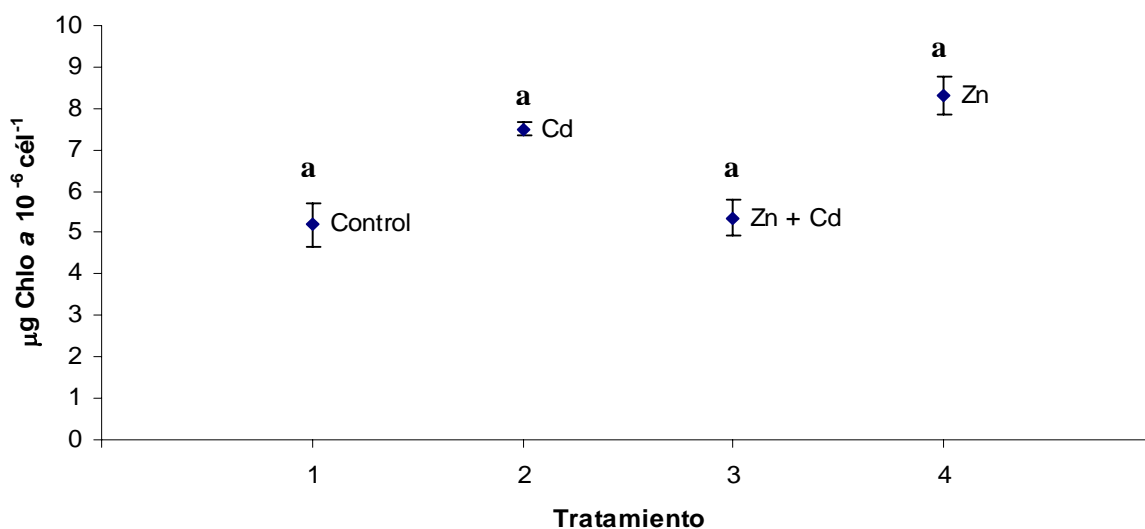


Figura 9. Valores promedio de clorofila *a* para los cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de distintas concentraciones de metales:  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd,  $16 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ).

### III.2. Bioensayos de tolerancia y remoción de Cd y Zn

#### Crecimiento

En el ensayo de tolerancia y remoción con bajas concentraciones de Cd y Zn, no se encontró diferencia significativa en el crecimiento de *Synechococcus* sp. evaluado como densidad óptica ( $P = 0.089$ ). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas al evaluar el crecimiento por medio del número de células ( $P = 0.009$ ) (Figura 10). Las diferencias en el crecimiento de *Synechococcus* sp. se encontraron entre los tratamientos a los que se adicionó de forma individual cadmio, zinc y el control. El tratamiento que presentó mayor crecimiento evaluado como número de células y densidad óptica fue sin adición de metales, respecto al obtenido con la adición de los dos metales juntos y en forma individual.

El ensayo de tolerancia y remoción con altas concentraciones de Cd y Zn, mostró diferencia significativa en el crecimiento de *Synechococcus* sp. evaluado tanto por densidad óptica ( $P = 0.000$ ), como por el número de células ( $P = 0.000$ ) (Figura 11) entre los distintos tratamientos con cadmio y zinc. En el tratamiento con adición de Zn y sin  $\text{NaHCO}_3$  se encontró que a partir del día 4 de cultivo el crecimiento decreció y el pH del medio de cultivo se mantuvo entre valores de 4 y 5. El tratamiento al que se adicionaron Zn +  $\text{NaHCO}_3$  no presentó decremento en el crecimiento y el pH del medio de cultivo se mantuvo entre valores de 7 y 8.

El tratamiento que presentó mayor crecimiento evaluado como número de células y densidad óptica fue sin adición de metales, respecto al obtenido con la adición de los dos metales juntos y en forma individual (Figura 11).

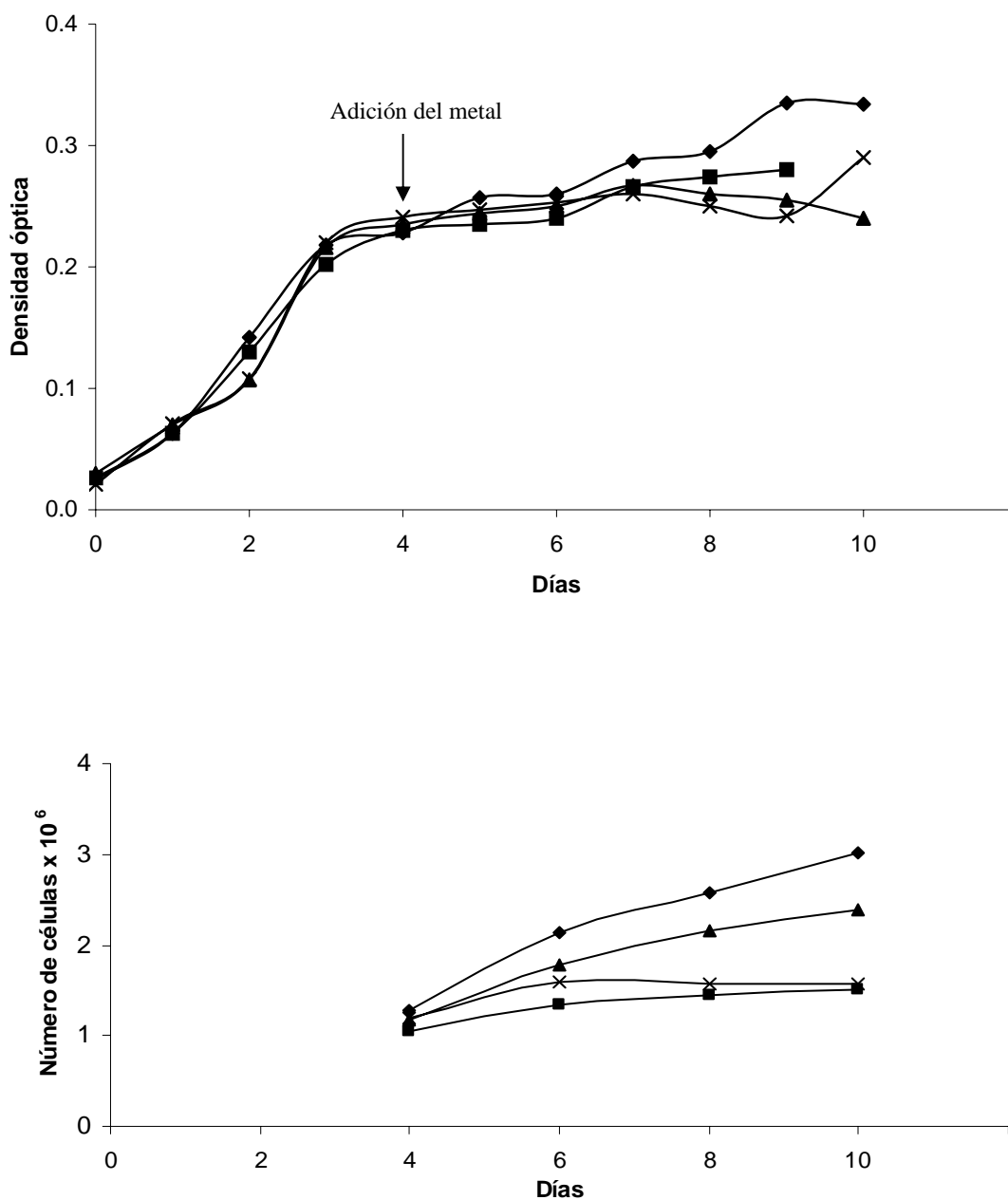


Figura 10. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de concentraciones bajas de metales: 1 mg l<sup>-1</sup> de Cd (■), 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn (×), las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (▲) y sin adición de metales (◆).

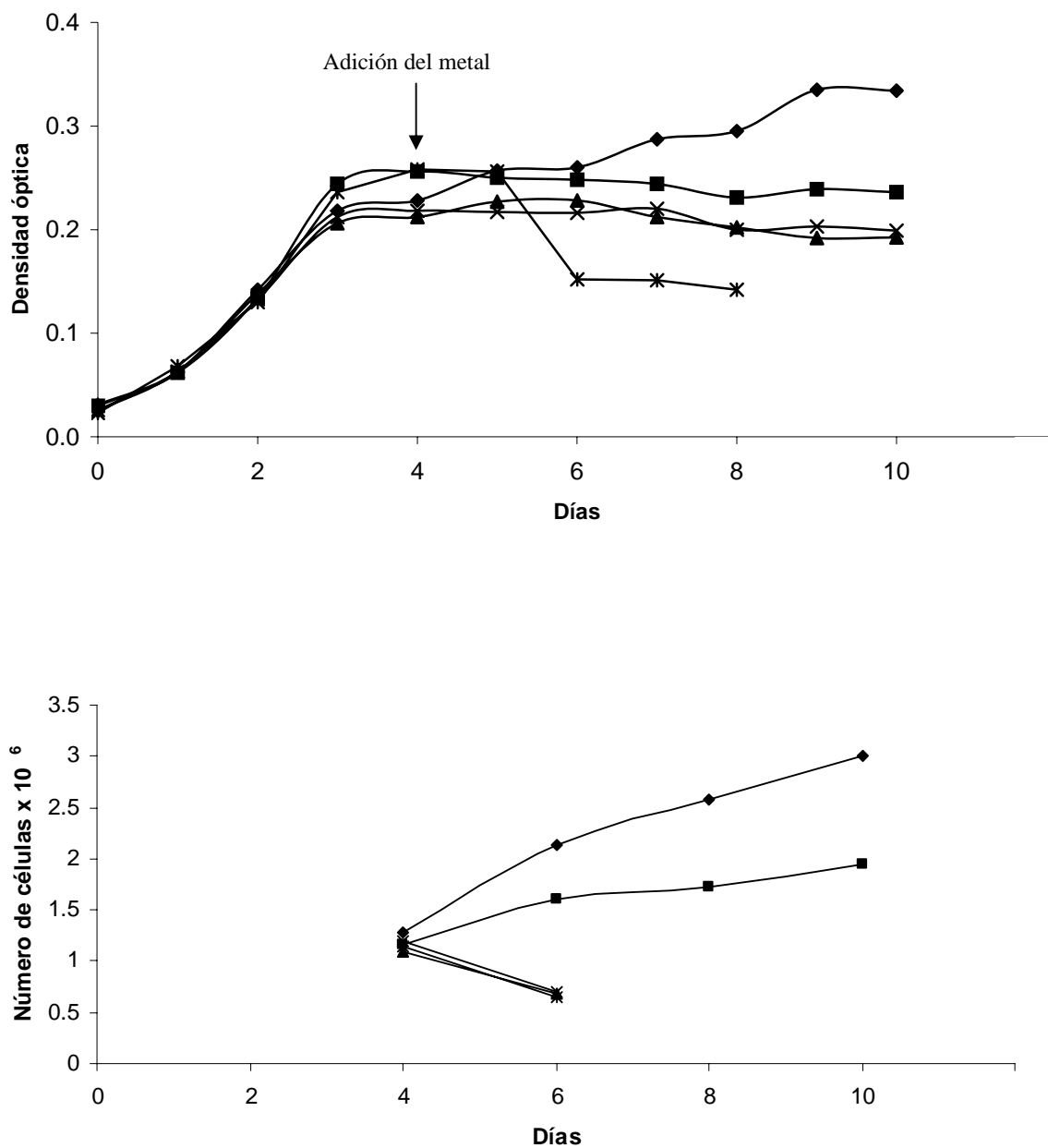


Figura 11. Valores promedio de la densidad óptica y del número de células para cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de concentraciones altas de metales: 2 mg l<sup>-1</sup> de Cd (■), 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn (✱), 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn + NaHCO<sub>3</sub> (✕), las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) (▲) y sin adición de metales (◆).

La tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) mostró diferencias significativas al ser evaluada tanto mediante densidad óptica ( $P = 0.003$ , Tabla III A) como por medio del número de células ( $P = 0.002$ , Tabla III B) para los cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos con altas y bajas concentraciones de cadmio y zinc. En el ensayo con bajas concentraciones de los metales, la mayor tasa de crecimiento al ser evaluada por densidad óptica fue para los cultivos a los cuales se les adicionó Zn únicamente y sin adición de metales. Sin embargo, al evaluarla por número de células la mayor tasa de crecimiento se obtuvo en los cultivos a los cuales no se les adicionaron metales y en los que se adicionaron cadmio y zinc juntos.

En el ensayo con altas concentraciones de metales se encontró que al evaluar la tasa de crecimiento por densidad óptica (Tabla III A) ésta fue menor sólo cuando se adicionaron Cd y Zn juntos. Al evaluar la tasa de crecimiento acumulada por número de células (Tabla III B), se encontró que ésta fue mayor en los cultivos de *Synechococcus* sp. a los cuales no se les adicionaron metales, respecto a los valores obtenidos en los demás tratamientos. En los cultivos a los que se les adicionaron Zn y Zn + NaHCO<sub>3</sub> se encontró un decremento en el crecimiento (Tabla III B).

Tabla III. Valores promedio de la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) evaluada con densidad óptica (A) y por número de células (B) para cultivos de *Synechococcus* sp., sin adición de metales (Control) y con adición de bajas ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  Cd y  $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) y altas concentraciones ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  Cd y  $75 \text{ mg l}^{-1}$ ) de los metales cadmio y zinc y los dos metales juntos (Zn + Cd). Entre paréntesis se presenta la desviación estándar. Las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b > c > d$ ).

**A**

Exposición al metal	Control	Cd	Zn + Cd	Zn
Baja	1.12 (0.07)a	1.03 (0.03)b	0.88 (0.01)b	1.16 (0.04)a
Alta	0.99 (0.01)a	0.92 (0.08)a	0.78 (0.01)b	0.89 (0.03)a

**B**

Exposición al metal	Control	Cd	Zn + Cd	Zn	Zn + NaHCO <sub>3</sub>
Baja	1.5 (0.10)a	0.65 (0.03)b	1.26 (0.10)a	0.19 (0.04)b	-----
Alta	1.5 (0.10)a	0.74 (0.02)b	-0.74 (0.04)b	-1.90 (0.90)c	-0.81(0.06)d

----- No evaluado



### Peso seco específico

En *Synechococcus* sp. no se encontraron diferencias significativas entre los valores de peso seco específico de los diferentes tratamientos realizados para evaluar la tolerancia y remoción con bajas ( $P = 0.100$ ) y altas ( $P = 0.643$ ) concentraciones de Cd y Zn (Figuras 12 y 13).

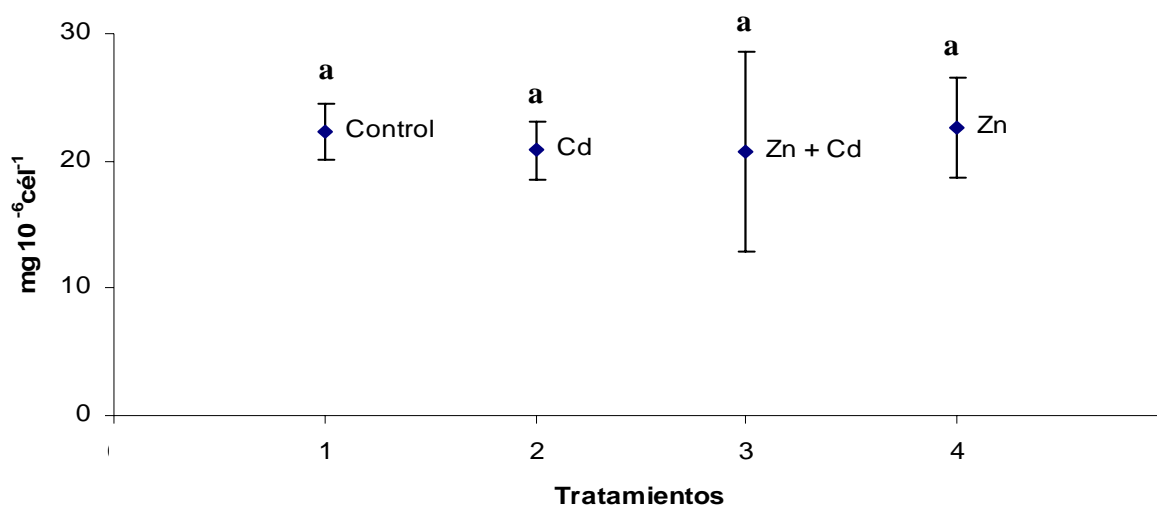


Figura 12. Valores promedio de peso seco específico para los cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de bajas concentraciones de metales: 1 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd), y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ).

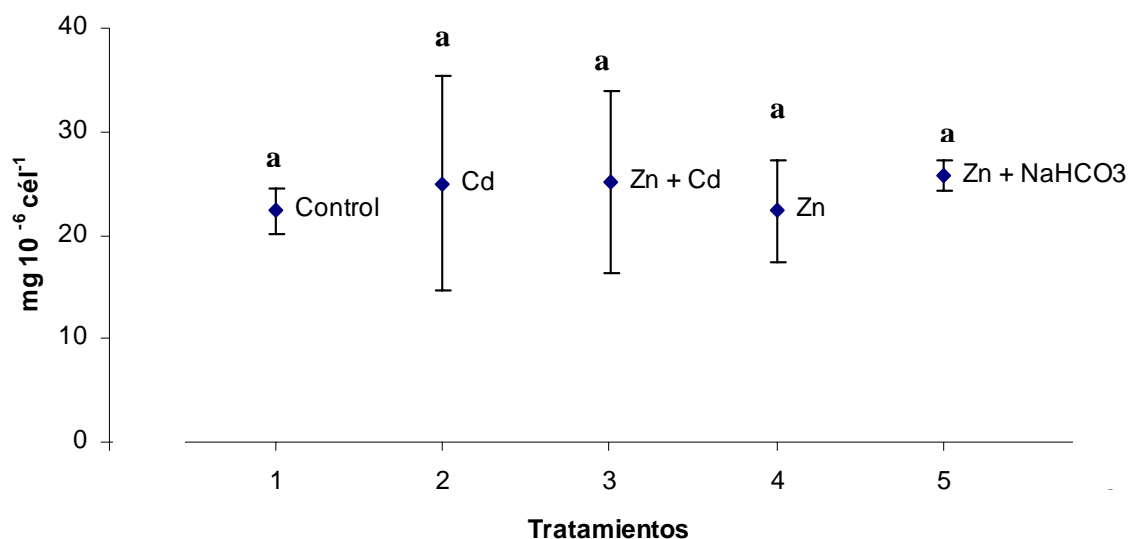


Figura 13. Valores promedio de peso seco específico para los cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de altas concentraciones de metales: 2 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ).

### Clorofila *a*

Se encontraron diferencias significativas entre los valores de clorofila *a* ( $P = 0.000$ ) de los diferentes tratamientos realizados para evaluar la tolerancia y remoción de *Synechococcus* sp. con bajas concentraciones de Cd y Zn (Figura 14). El mayor contenido de clorofila *a* fue para el tratamiento al que se adicionó Cd únicamente con respecto al resto de los tratamientos.

En el ensayo de tolerancia y remoción de *Synechococcus* sp. con altas concentraciones de Cd y Zn, se obtuvieron diferencias significativas en los valores de clorofila *a* ( $P = 0.000$ ) (Figura 15) entre el control y el tratamiento al cual se le adicionó cadmio solo. El mayor contenido de clorofila *a* evaluado fue en los cultivos a los que no se

les adicionaron metales y menor en los tratamientos en los cuales se adicionó únicamente cadmio (Figura 15).

En los cultivos a los cuales se adicionaron Zn y Zn + Cd no se pudo determinar la concentración de clorofila *a*, debido a que las células de *Synechococcus* sp. no sobrevivieron más allá del sexto día.

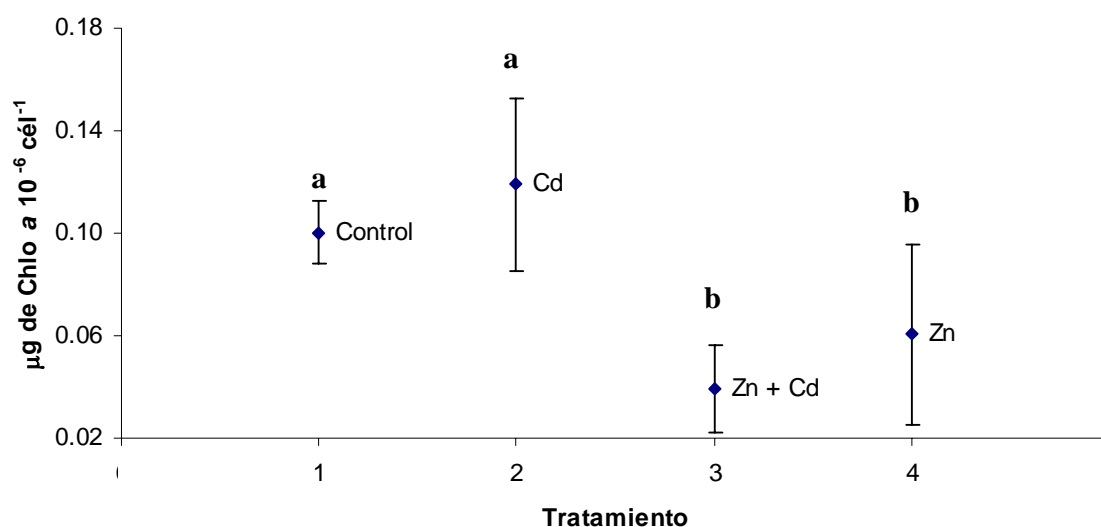


Figura 14. Valores promedio de clorofila *a* para los cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de bajas concentraciones de metales: 1 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn, las concentraciones de los dos metales juntos (Zn + Cd) y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ ).

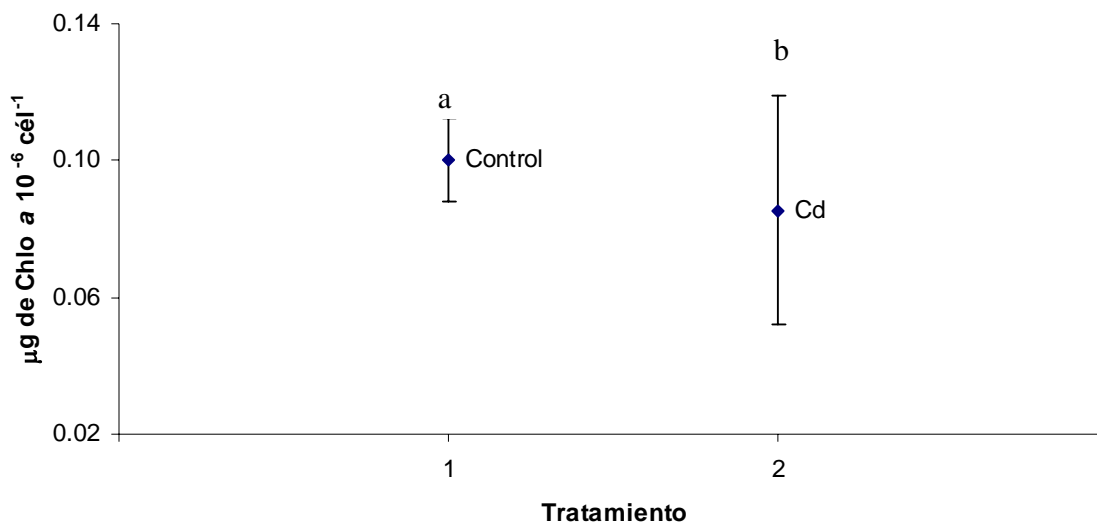


Figura 15. Valores promedio de clorofila *a* para los cultivos de *Synechococcus* sp. con adición de cadmio a una concentración de 2 mg l<sup>-1</sup> y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a > b$ ).

### Remoción de metales

En el ensayo de tolerancia y remoción con bajas concentraciones de Cd y Zn, la remoción del cadmio que se encontraba en solución en el medio de cultivo por *Synechococcus* sp. fue de 45% (0.45 mg l<sup>-1</sup> de Cd) en el tratamiento en el que sólo se adicionó Cd y 41% (0.41 mg l<sup>-1</sup> de Cd) en el que se adicionaron Zn + Cd (Figura 16). Entre estos tratamientos no se encontraron diferencias significativas, sin embargo la remoción fue significativamente ( $P = 0.001$ ) mayor con respecto a los cultivos a los cuales no se les adicionaron metales. Al normalizar los microgramos de Cd removidos por millón de células se encontró una remoción de 9 µg de Cd x 10<sup>-6</sup> células que en porcentaje representa un 64% de remoción en el tratamiento en el que únicamente se adicionó cadmio. En el

tratamiento en el que se adicionaron Zn + Cd se removieron  $10 \mu\text{g}$  de Cd x  $10^{-6}$  células que corresponde a un 75% (Figuras 17). Esta remoción fue significativamente mayor ( $P = 0.001$ ) a la correspondiente al Cd solo y a la del control (Figura 17).

En cuanto a la remoción de Zn en solución, en el tratamiento con bajas concentraciones de metales, se encontró que *Synechococcus* sp. removió 78% de zinc ( $39 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) en los cultivos en los que se adicionó únicamente este metal y 80% ( $40 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) en los cultivos en los que se adicionaron Zn + Cd. Entre estos tratamientos no se encontraron diferencias significativas, sin embargo la remoción fue significativamente ( $P = 0.001$ ) mayor con respecto al control (Figura 18). Al normalizar los miligramos de Zn removidos por millón de células se encontró una remoción de  $48 \text{ mg de Zn x } 10^{-6}$  células que en porcentaje representa un 99% en los cultivos a los cuales se les adicionó únicamente zinc. En los tratamientos a los cuales se les adicionaron Zn + Cd *Synechococcus* sp. removió  $50 \text{ mg de Zn x } 10^{-6}$  células que corresponde a un 99%. La remoción en estos tratamientos fue significativamente diferente ( $P = 0.001$ ) y mayor con respecto a los cultivos a los cuales no se les adicionaron metales (Figura 19).

En el ensayo de tolerancia y remoción con exposición a altas concentraciones de Cd y Zn, la remoción del cadmio que se encontraba en solución en el medio de cultivo por *Synechococcus* sp. fue de 69% ( $1.4 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd) en el tratamiento en el que sólo se adicionó Cd y de 49% ( $0.98 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd) en el que se adicionaron Zn + Cd (Figura 20). La remoción del tratamiento en el cual se adicionó Cd únicamente fue significativamente mayor ( $P = 0.000$ ) al que se adicionó en forma combinada con el Zn y al control ( $P = 0.000$ ).

Al normalizar los microgramos de Cd removidos por millón de células se encontró una remoción de  $15 \mu\text{g}$  de Cd x  $10^{-6}$  células que en porcentaje representa un 70% de remoción en los tratamientos a los que únicamente se adicionó Cd y de  $10 \mu\text{g}$  de Cd x  $10^{-6}$  células que corresponde a un 48% en los cultivos a los cuales se adicionaron Zn + Cd. Esta remoción fue significativamente menor ( $P = 0.001$ ) con respecto al tratamiento al cual se le adicionó Cd solo y mayor con respecto a los cultivos a los cuales no se les adicionaron metales (Figura 21).

En el caso del Zn que se encontraba en solución, *Synechococcus* sp. removió 96% ( $72 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) en el tratamiento en el que sólo se adicionó Zn, 93% ( $70 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) en el que se adicionaron Zn + Cd y 96% ( $72 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) en el tratamiento al cual se le adicionaron Zn +  $\text{NaHCO}_3$  (Figura 22). Entre estos tratamientos no se encontraron diferencias significativas, sin embargo la remoción fue significativamente ( $P = 0.001$ ) mayor con respecto a los cultivos a los cuales no se les adicionaron metales (Figura 22).

Al normalizar los miligramos de Zn removidos por millón de células se encontró una remoción de  $69 \text{ mg}$  de Zn x  $10^{-6}$  células en los cultivos a lo que se adicionó únicamente Zn y Zn +  $\text{NaHCO}_3$  que en porcentaje representa un 92% de remoción (Figura 23). En los cultivos a los cuales se les adicionaron Zn + Cd la remoción fue de  $68 \text{ mg}$  de Cd x  $10^{-6}$  células que corresponde a un 87% de remoción. Esta remoción no fue significativamente diferente con respecto a los tratamientos a los que se les adicionó Zn únicamente. Sin embargo, sí fue significativamente ( $P = 0.001$ ) mayor respecto a los cultivos a los cuales no se les adicionaron metales (Figura 23).

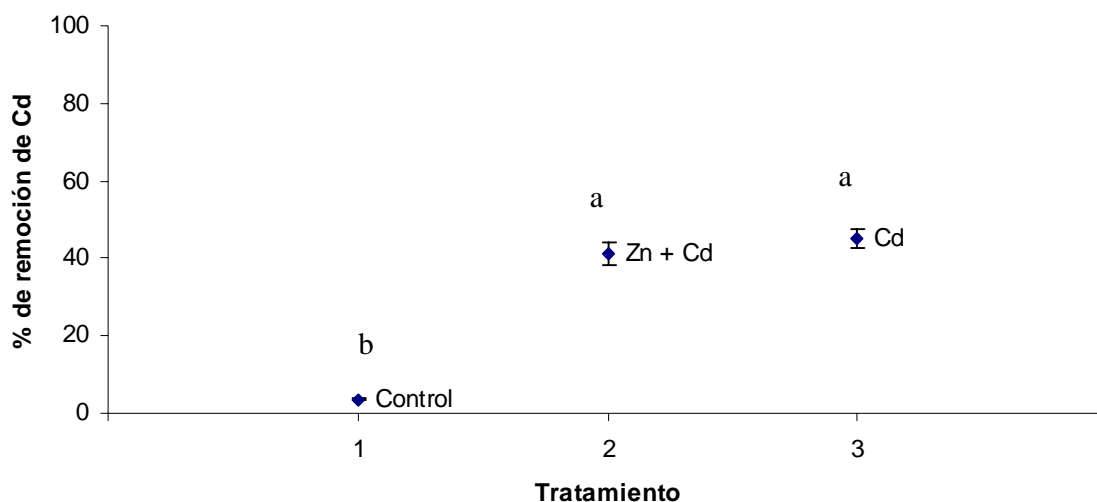


Figura 16. Valores promedio de los porcentajes de remoción de cadmio (calculados a partir de las concentraciones en solución) de los cultivos de *Synechococcus* sp. a los cuales se les adicionaron: 1 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 1 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn, y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ , a > b).

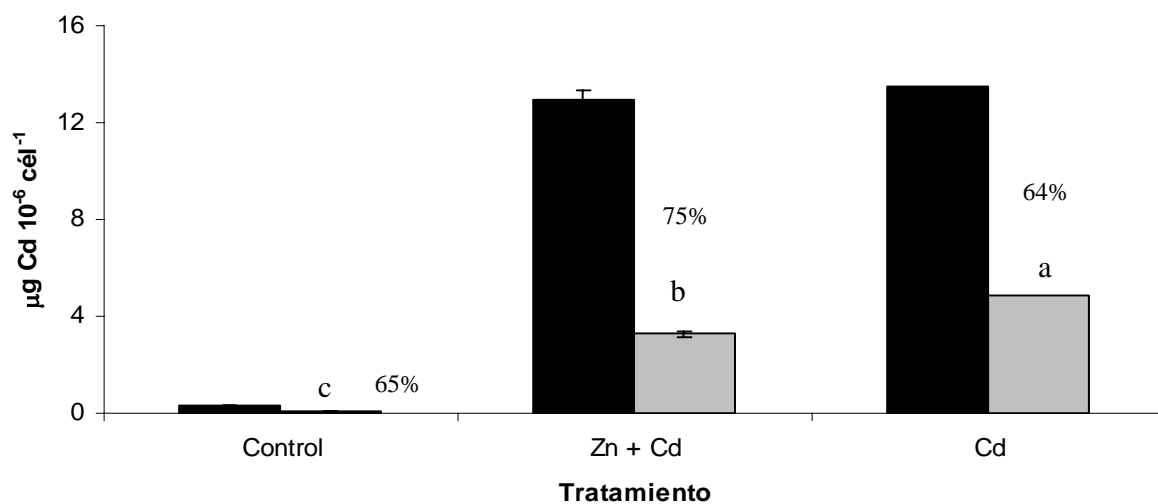


Figura 17. Valores promedio de cadmio (normalizados por millón de células) en los cultivos de *Synechococcus* sp. expuestos a bajas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y final (Gris) de Cd. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ , a > b > c).

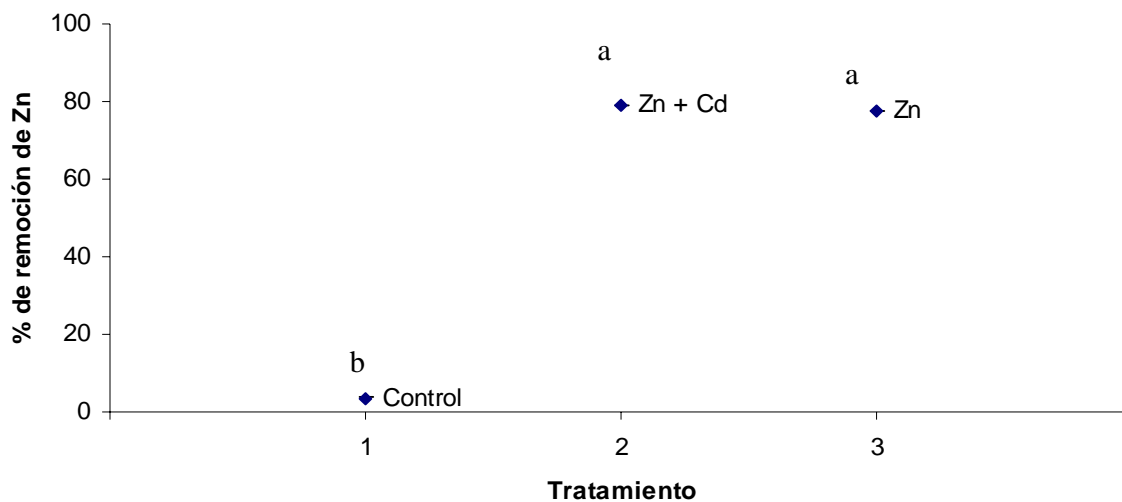


Figura 18. Valores promedio de los porcentajes de remoción de zinc (calculados a partir de las concentraciones en solución) de los cultivos de *Synechococcus* sp. a los cuales se les adicionaron: 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn, 1 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn, y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

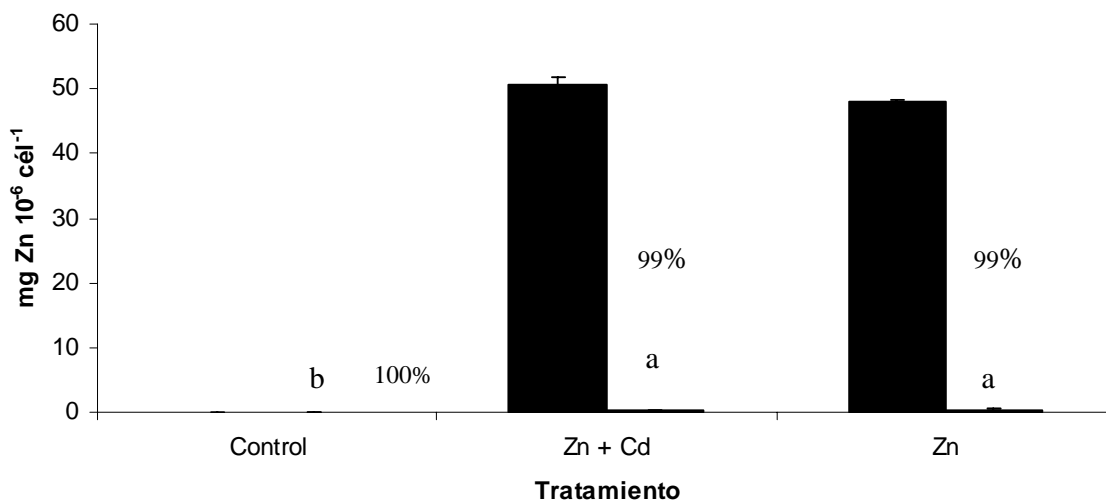


Figura 19. Valores promedio de zinc en los cultivos de *Synechococcus* sp. expuestos a bajas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y final (Gris) de Zn. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).



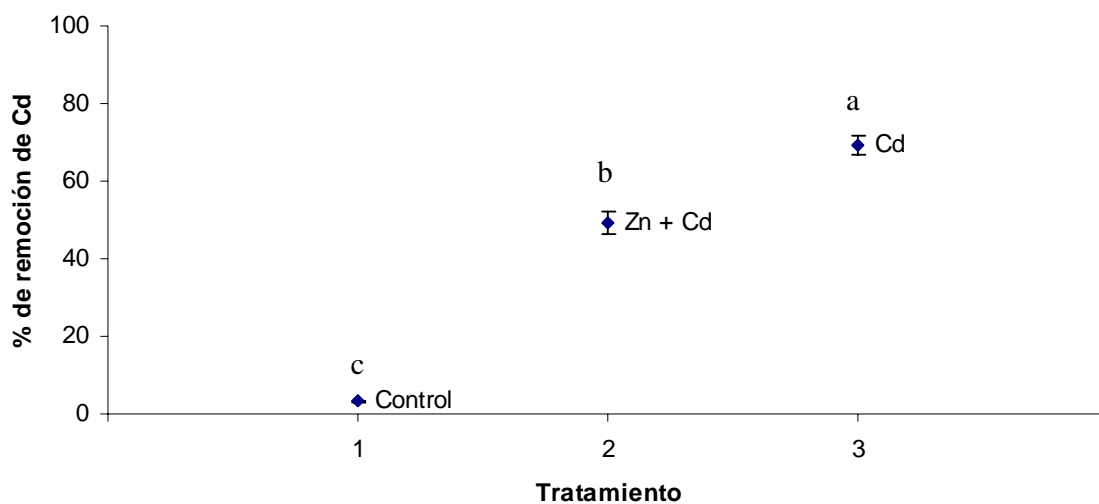


Figura 20. Valores promedio de los porcentajes de remoción de cadmio (calculados a partir de las concentraciones en solución) de los cultivos de *Synechococcus* sp. a los cuales se les adicionaron: 2 mg l<sup>-1</sup> de Cd, 2 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn, y sin adición de metales (Control). Las barras indican  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ , a > b > c).

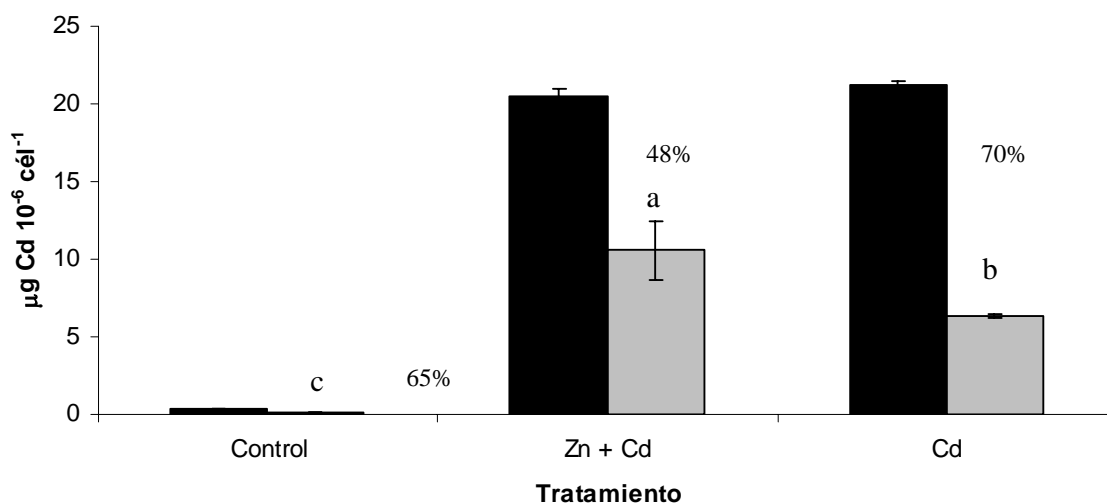


Figura 21. Valores promedio de cadmio en los cultivos de *Synechococcus* sp. expuestos a altas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y final (Gris) de Cd. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ , a > b).

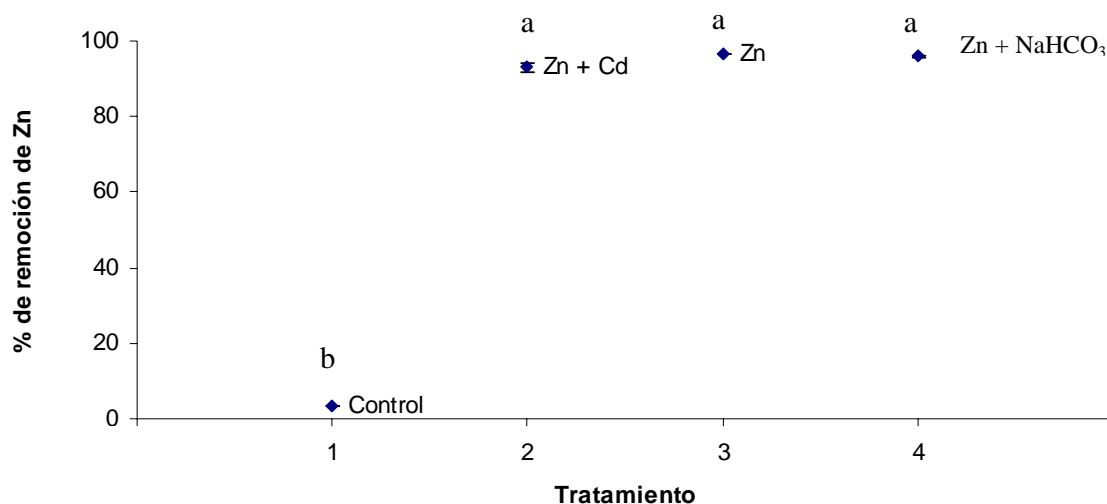


Figura 22. Valores promedio de los porcentajes de remoción de zinc de los cultivos de *Synechococcus* sp. a los cuales se les adicionaron: 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn, 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn + NaHCO<sub>3</sub>, 2 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn y sin adición de metales (Control). Las barras representan  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ , a > b).

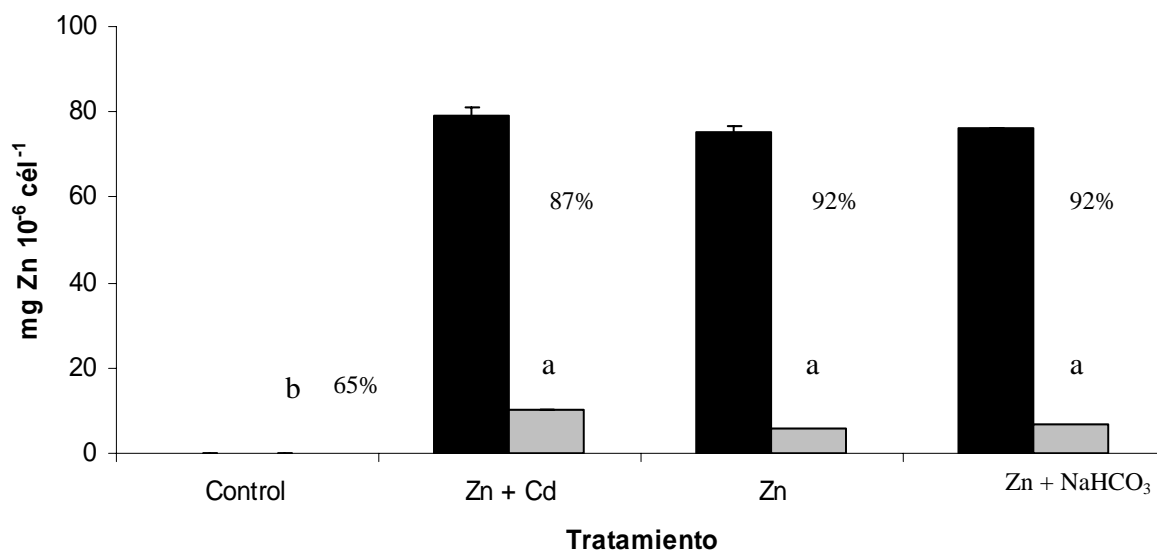


Figura 23. Valores promedio de zinc en los cultivos de *Synechococcus* sp. expuestos a altas concentraciones de este metal. Las columnas representan la concentración inicial (Negro) y final (Gris) de Zn. Los valores en porcentaje indican la remoción. Las barras representan  $\pm 1$  error estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas entre las concentraciones finales de los tratamientos (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ , a > b).

## IV. DISCUSIÓN

Algunas especies de microalgas presentan diversas adaptaciones genéticas y fisiológicas para sobrevivir y reproducirse en hábitats contaminados por metales, permitiéndoles tener la capacidad de tolerar y bioacumular metales en el medio en que se encuentran. Estas adaptaciones dependen de la especie de microalga, del tiempo de exposición y de la concentración de los metales (Salazar-González, 2006).

### IV.1. Acondicionamiento del medio de cultivo

Durante la fase experimental fue necesario establecer un protocolo para el mantenimiento de los cultivos de microalgas y la adición del cadmio y zinc debido a que por la adición de las soluciones concentradas de cadmio y zinc se evaluó una disminución de pH del medio de cultivo (8 a 4-5). En trabajos relacionados con tolerancia y remoción de metales utilizando microalgas, no se indica un efecto secundario por la adición de las soluciones concentradas de cadmio y zinc al medio de cultivo. Sin embargo, debido a que el pH es una variable que determina el crecimiento de cultivos microalgales (Andersen, 2005), fue necesario ajustar los valores de pH del medio de cultivo siguiendo las recomendaciones descritas por Stein (1973). Lo anterior permitió obtener crecimiento en los cultivos de las tres especies utilizadas en este trabajo.

La cantidad de inóculo utilizada para un cultivo de microalgas es otra variable que determina la tasa de crecimiento de un cultivo y la duración de las distintas fases de la curva de crecimiento (Tabla IV). Las concentraciones de inóculos recomendadas para iniciar un cultivo microalgal corresponden a valores de 1 al 10% (v/v), algunas especies como *Synechococcus* sp. llegan a requerir inóculos de hasta el 25% (v/v) (Lorenz *et al.*,

2005). Los resultados obtenidos por otros autores acerca de la concentración de inóculo, muestran que es de gran importancia la densidad inicial de un cultivo que será utilizado para ensayos de tolerancia y remoción de metales, ya que la respuesta fisiológica puede variar debido al estrés ocasionado a las células, su tolerancia y el porcentaje de células vivas. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que para lograr mantener viable y en crecimiento cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp., fue necesario mantener concentraciones de inóculo del 10% (v/v).

El procedimiento de concentrar el cultivo por centrifugación para aumentar la densidad de células utilizadas como inóculo, mostró ser bueno ya que se obtuvo viabilidad y crecimiento para las tres especies. Sin embargo, este procedimiento causa una fase de aclimatación de dos a tres días, ya que con la adición de las soluciones de cadmio y zinc los cultivos declinan su crecimiento rápidamente. Esta declinación en el crecimiento puede deberse, además, a que las células al concentrarse por centrifugación y resuspenderse nuevamente en el medio de cultivo, pudieron no tener el requerimiento de nutrientes que necesitaban.

El volumen de cultivo utilizado, el espacio de la interfase aire-agua y el tipo de tapón utilizado en los cultivos, resultaron ser variables que deben ser consideradas para lograr el crecimiento de las tres especies para las condiciones experimentales mantenidas en este trabajo. Durante los ensayos preliminares no se logró crecimiento de biomasa de las tres especies estudiadas y se relacionó a la baja concentración de inóculo, el cambio de pH del medio debido a la adición de los metales y el poco espacio para la interfase aire-agua mantenido en los cultivos preliminares en los que se utilizaron tubos de ensaye. La interfase aire-agua para cultivos de microalgas está relacionada con el sistema de los

bicarbonatos y las formas de disociación en el agua, el pH del medio y en consecuencia con el crecimiento y fotosíntesis (Richmond, 1986).

Un incremento en el pH del medio repercute en la química de los metales traza de tres formas principalmente: a) la complejación de los metales ligándolos conforme el  $\text{CO}_3^{2-}$  u  $\text{OH}^-$  aumenta, b) la afinidad efectiva de los quelantes por varios metales puede aumentar como resultado de la disminución de los iones hidrógeno por el ligando y, c) la solubilidad de los metales que forman hidróxidos o carbonatos puede cambiar (Sunda *et al.*, 2005).

Tomando en consideración la experiencia obtenida con los cultivos preliminares y las variables antes mencionadas, se estableció un procedimiento para el cultivo de las tres especies de microalgas utilizadas para realizar los ensayos de tolerancia y remoción de cadmio y zinc. El procedimiento correspondió a que los cultivos de las tres especies de microalgas deben de mantenerse en recipientes con tapones que permitan la difusión de gases, regular el pH del medio a valores cercanos a 8 y adicionar las soluciones de cadmio y zinc cuando el cultivo se encuentre en la fase exponencial de crecimiento.

Además, para evitar el cambio de pH en el medio de cultivo debido a la adición de las soluciones de cadmio y zinc, en los ensayos de tolerancia y remoción con microalgas se utilizaron soluciones concentradas de cadmio y zinc para disminuir el volumen adicionado a los distintos tratamientos experimentales.

Tabla IV. Valores de la concentración de inóculo utilizados para realizar bioensayos de remoción de cadmio, zinc y otros metales (Cu) utilizando microalgas.

Especie	Concentración de células	Respuesta fisiológica	Referencia
<i>Tetraselmis chuii</i>	30 000 células ml <sup>-1</sup> de la microalga en 800 ml de medio de cultivo	Efecto tóxico de diversos metales sobre el crecimiento	Cordero <i>et al.</i> , 2005
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	155 X 10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>	Acumulación de Cu y Zn	Moreno-Garrido, 2002
<i>Chaetoceros gracilis</i>	3140 X 10 <sup>6</sup> células ml <sup>-1</sup>	Efecto del cadmio sobre el crecimiento poblacional	Vera <i>et al.</i> , 2001
<i>Chlorella saccharophila</i> , <i>Navicula incerta</i> y <i>Nitzschia closterium</i>	1 X 10 <sup>5</sup> células ml <sup>-1</sup>	Respuesta en el crecimiento	Rachlin <i>et al.</i> , 1982
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	350 μm <sup>3</sup>	Respuesta al reemplazo del Zn por el cadmio	Lee y Morel, 1995
<i>Tetraselmis maculata</i>	425 μm <sup>3</sup>	Respuesta al reemplazo del Zn por el cadmio	Lee y Morel, 1995

## IV.2. Selección de la especie

Al comparar los distintos métodos de evaluación del crecimiento con adición de cadmio ( $0.2 \text{ mg l}^{-1}$ ) y zinc ( $16 \text{ mg l}^{-1}$ ) se obtuvieron resultados similares para los cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Synechococcus* sp. Sin embargo, en los cultivos de *Scenedesmus obliquus* se evaluó diferencia en el crecimiento medido por número de células y clorofila *a* dependiendo del metal adicionado. Estas diferencias pudieron ser debidas a que los metales que se adicionaron al medio de cultivo pudieron ser utilizados por las células como nutrientes y así favorecer su crecimiento. Así también, *Scenedesmus obliquus* forma cenobios de hasta 6 células, esto permite reducir la toxicidad del metal ya que hay una menor superficie de contacto con los metales (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Barsanti y Gualtieri, 2006).

Una característica distintiva importante de los metales es que aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas, disminuir el crecimiento y afectar los procesos metabólicos (Sunda, 1998; Cañizares-Villanueva, 2000).

Algunos autores han encontrado que las microalgas, al ser mantenidas en un medio de cultivo con altas concentraciones cadmio y zinc, pueden reducir su crecimiento así como tener cambios morfológicos dependiendo de las distintas concentraciones de estos metales a las que sean cultivadas (Tabla IV). Sin embargo, en este caso concentraciones de  $0.2 \text{ mg}$

$\text{l}^{-1}$  de Cd y  $16 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn no fueron tan altas como para provocar una reducción en el crecimiento. Más aún, el crecimiento se vio incrementado.

Ilangovan *et al.* (1998) y Madena y Sakaguchi, (1990) realizaron ensayos en los que agregaron  $0.2$  y  $5 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn a las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Estos autores encontraron una disminución en el crecimiento de las células debido a las altas concentraciones tanto de cadmio como de zinc ya que el exponer las células a metales puede afectar la división celular y la tasa de crecimiento de las células (Ranchlin *et al.*, 1982). Los resultados obtenidos en los ensayos de tolerancia realizados en cultivos con *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp., indican que la adición individual o combinada de una concentración de  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de cadmio y  $16 \text{ mg l}^{-1}$  de zinc no producen inhibición en el crecimiento de las células en las tres especies. Esto podría indicar que las dos especies de microalgas y la cianobacteria tienen una mayor tolerancia a estas concentraciones de los metales mencionados.

Fierro-Reséndiz (2004) evaluó la tasa de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en condiciones de cultivo sin adición de metales. Este autor reporta mayores tasas de crecimiento que las evaluadas en este trabajo para las mismas especies de microalgas (Tabla V). Lo anterior pudo ser debido a diferencias en las condiciones experimentales, entre ellas destacan la menor intensidad de luz ( $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y una mayor temperatura ( $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), respecto a las utilizadas en este ensayo ( $166 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



Tabla V. Efecto del cadmio y zinc en la respuesta fisiológica de microalgas y cianobacterias.

Especie	Zn	Cd	Cd + Zn	Respuesta fisiológica	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	16 mg l <sup>-1</sup>	0.2 mg l <sup>-1</sup>	0.2 mg l <sup>-1</sup> + 16 mg l <sup>-1</sup>	No disminuye el crecimiento	Este trabajo
<i>Scenedesmus obliquus</i>	16 mg l <sup>-1</sup>	0.2 mg l <sup>-1</sup>	0.2 mg l <sup>-1</sup> + 16 mg l <sup>-1</sup>	No disminuye el crecimiento	Este trabajo
<i>Synechococcus sp.</i>	16 mg l <sup>-1</sup>	0.4 mg l <sup>-1</sup>	0.2 mg l <sup>-1</sup> + 16 mg l <sup>-1</sup>	No disminuye el crecimiento	Este trabajo
<i>Synechococcus sp.</i>	50 mg l <sup>-1</sup>	1 mg l <sup>-1</sup>	1 mg l <sup>-1</sup> + 50 mg l <sup>-1</sup>	Reduce el crecimiento	Este trabajo
<i>Synechococcus sp.</i>		2 mg l <sup>-1</sup>		Reduce el crecimiento	Este trabajo
<i>Synechococcus sp.</i>	75 mg l <sup>-1</sup>		2 mg l <sup>-1</sup> + 75 mg l <sup>-1</sup>	Mortalidad del cultivo	Este trabajo
<i>Chlorella vulgaris</i>		1 mg l <sup>-1</sup>	2 mg l <sup>-1</sup> + 50 mg l <sup>-1</sup>	Reduce el crecimiento	Ilangovan <i>et al.</i> , 1998
<i>Scenedesmus acutus</i>		0.5 mg l <sup>-1</sup>	0.5 mg l <sup>-1</sup> + 50 mg l <sup>-1</sup>	Reduce el crecimiento	Madena y Sakaguchi, 1990
<i>Euglena gracilis</i>	1 mg l <sup>-1</sup>	5-100 µg l <sup>-1</sup>		Induce alteraciones morfológicas	Madena y Sakaguchi, 1990
<i>Chlorella saccharophila</i>	11 µg l <sup>-2</sup>			Reduce el crecimiento 50% a las 96 horas	Madena y Sakaguchi, 1990
<i>Nitzschia closterium</i>	2.9 µg l <sup>-2</sup>			Reduce el crecimiento 50% a las 96 horas	Madena y Sakaguchi, 1990
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	36-155 mg kg <sup>-1</sup>			Crecen en aguas residuales	Madena y Sakaguchi, 1990
<i>Scenedesmus obliquus</i>	44-95 mg kg <sup>-1</sup>			Crecen en aguas residuales	Madena y Sakaguchi, 1990
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>		0-2.5 mg l <sup>-1</sup>		Afecta el crecimiento dependiendo del pH	Gipps <i>et al.</i> , 1980

Tabla VI. Valores promedio de tasa de crecimiento ( $\mu$ ) de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* para el experimento de tolerancia con 0.2 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 16 mg l<sup>-1</sup> de Zn.

Especie	Tratamiento	Tasa de crecimiento ( $\mu$ )	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Control	0.045	En este trabajo
	Cd	0.014	En este trabajo
	Zn + Cd	0.021	En este trabajo
	Zn	0.019	En este trabajo
	Sin metales	0.275	Fierro-Reséndiz, 2004
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Control	0.014	En este trabajo
	Cd	0.021	En este trabajo
	Zn + Cd	0.011	En este trabajo
	Zn	0.018	En este trabajo
	Sin metales	0.210	Fierro-Reséndiz, 2004

La falta de diferencia en los valores de peso seco evaluados para *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp., en respuesta a la adición de distintas concentraciones de cadmio y zinc, refleja la tolerancia de estas especies a la adición de estos elementos a las concentraciones probadas.

La cantidad de clorofila *a* se utilizó como otro indicador de la respuesta en el crecimiento de las células por efecto de la adición de cadmio y zinc. Los resultados indican que *Chlorella vulgaris* y *Synechococcus* sp. no presentaron diferencias en la cantidad de clorofila *a* al mantener los cultivos con los metales cadmio y zinc, a diferencia de *Scenedesmus obliquus* que tuvo una mayor cantidad de clorofila *a* en los tratamientos con adición de metales respecto a los cultivos a los cuales no se les adicionaron metales. Este resultado puede ser otro indicador de la tolerancia a las concentraciones de metales

utilizadas en los cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp. El contenido pigmentario de algunas microalgas se puede ver influenciado entre otros factores por la irradiancia y la cantidad de nutrientes *e.g.* como el nitrógeno (Loreto *et al.*, 2003). La menor concentración de clorofila *a* evaluada para *Scenedesmus obliquus*, puede ser debida a que al momento de la toma de muestras los cultivos se encontraban en fase estacionaria y el cultivo presentó una limitación en la cantidad de nutrientes. En este caso posiblemente las células utilizaron el nitrógeno para cubrir sus requerimientos nutricionales, a diferencia de los cultivos a los cuales se les adicionaron cadmio y zinc que mostraron menor concentración de células y posiblemente una menor limitación por nutrientes.

En cuanto a los antecedentes de utilización de *Synechococcus* sp. se menciona que esta especie puede tolerar altas concentraciones de metales en el medio, *e.g.* plomo y cromo (0 a 700 mg l<sup>-1</sup>) (Li *et al.*, 1964), cobre (11.3 mg l<sup>-1</sup>) y plomo (30.4 mg l<sup>-1</sup>) (Gardea-Torredey *et al.*, 1996) y cadmio (0.11 mg l<sup>-1</sup>), cobre (6.35 mg l<sup>-1</sup>) y zinc (0.65 mg l<sup>-1</sup>) (Ybarra y Webb, 1999). Cabe hacer notar que las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron 10 a 20 veces mayores para Cd y 77 a 115 veces mayores para Zn que las utilizadas por los anteriores autores. Algunos organismos procariontes y eucariontes han desarrollado estrategias para disminuir la toxicidad de los metales a formas inocuas. Entre las estrategias de las microalgas se encuentran evitar el paso de los iones a través de la pared celular por medio de secreción de sustancias que producen uniones específicas con los iones metálicos del medio. El resultado de esta estrategia es formar complejos quelados (*e.g.* malato,

citrato, polifosfato) que pueden quedar en el exterior de la pared celular o en compartimientos específicos en el interior de la célula (Kaplan, 2005).

Los mecanismos de tolerancia de *Synechococcus* sp. están relacionados a la baja organización celular de las cianobacterias y a que tienen mecanismos para reducir la toxicidad de los metales, tales como: oxidación y reducción del metal por medio de enzimas, producción de modificaciones (grupos funcionales) de la pared celular permitiendo excluir los metales del interior de la célula, bioprecipitación y a que el metal también puede ser atrapado intracelularmente por algunas proteínas permitiendo una mayor tolerancia a las condiciones adversas del medio (Ybarra y Webb, 1999; Choudhury y Srivastava, 2001; Andrade *et al.*, 2004).

Por lo tanto, dado que *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp., presentaron tolerancia a los metales cadmio y zinc, se tomaron en consideración los antecedentes y características de *Synechococcus* sp. anteriormente descritas para seleccionarla como organismo de prueba en la siguiente fase experimental (tolerancia y remoción de metales).

### **IV.3. Ensayo de tolerancia y remoción de metales**

En este trabajo se mantuvieron cultivos de *Synechococcus* sp. en distintas concentraciones de cadmio (1 y 2 mg l<sup>-1</sup>) y zinc (50 y 75 mg l<sup>-1</sup>), para conocer la tolerancia y la capacidad de remoción al adicionar los metales de forma individual y combinados. Los resultados indicaron que *Synechococcus* sp. presentó tolerancia a las distintas concentraciones de cadmio y a las bajas concentraciones de zinc a las que fueron

mantenidas. El crecimiento de *Synechococcus* sp. disminuyó con  $75 \text{ mg l}^{-1}$  de zinc hasta llegar a producir mortandad. El pH en el medio de cultivo también decreció significativamente (4-5) a esta concentración de zinc. Kallas y Castenholz (1982) indicaron que el crecimiento óptimo de algunas cianobacterias se da a pH entre 7.5 y 10 y que la limitación en su crecimiento ocurre a pH menores a 5.5. Por lo que la disminución en el crecimiento de *Synechococcus* sp. pudo ser producida por el decremento en el pH del medio y la toxicidad del metal debido a su alta concentración. Con el fin de contrarrestar la disminución de pH del medio se utilizó bicarbonato y se logró mantener el pH entre 7 y 8, sin embargo, esto no fue suficiente para permitir el crecimiento de la cianobacteria

En los cultivos a los cuales se les adicionaron los metales cadmio y zinc solos y combinados en el tratamiento con exposición a bajas concentraciones se observó una disminución en el crecimiento a diferencia de los cultivos a los cuales no se adicionaron metales (Figura 10). Wilde *et al.* (2006) mantuvieron cultivos de *Chlorella* sp. a  $40 - 48 \text{ mg CaCO}_3 \text{ l}^{-1}$  y a distintos valores de pH (5.5 a 8) y observaron que la toxicidad del compuesto se incrementaba con pH altos (8), debido a que se reduce la competencia entre los protones y los metales por algunos sitios de la superficie celular. Esto puede indicar que el decremento del crecimiento en los cultivos con adición de metales pudo ser producto del efecto del pH (ya que este se mantuvo en niveles entre 9 y 10) debido a la actividad fotosintética (en la cual ocurre un aumento del pH), produciendo un aumento en la toxicidad del metal, o en efecto que el metal a las concentraciones estudiadas es tóxico (Sunda, 1998; Andersen, 2005; Wilde *et al.*, 2006).

Las microalgas al tener la capacidad de bioabsorber metales, podrían ser una alternativa eficiente en el tratamiento de aguas residuales (Salazar-González, 2006). Sin embargo, la eficiencia con que las microalgas remuevan metales de las aguas residuales dependerá: del tipo de efluente (doméstico, agrícola e industrial), la carga orgánica, los contaminantes que afectan la composición de la biomasa, la temperatura e intensidad luminosa, variaciones estacionales, así como la luz continua, pH, tamaño y morfología de las células, especiación del metal y temperatura (Wase y Forster, 1997).

La capacidad de remoción de *Synechococcus* sp. se evaluó mediante el porcentaje de remoción de Cd y/o Zn que se encontraba en solución en el medio y normalizando los miligramos o microgramos de cadmio y/o zinc removidos por millón de células. Al medir la remoción de cadmio por medio de porcentajes removidos del metal en solución, los resultados indicaron que *Synechococcus* sp., al mantenerlo en bajas concentraciones, remueve 45% ( $0.45 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd) y 69% ( $1.4 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd) en altas concentraciones al encontrarse únicamente cadmio en el medio de cultivo. Al adicionar los dos metales combinados se encontró una remoción de 41% ( $0.41 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd) en bajas concentraciones y 49% ( $0.98 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd) en altas concentraciones. Esto puede indicar que al adicionar una mayor cantidad de cadmio (únicamente) al medio de cultivo *Synechococcus* sp. va a remover una mayor cantidad de este metal. Sin embargo al encontrarse en combinación con el zinc la remoción de cadmio es menor, esto podría reflejar la competencia del Zn con el Cd como nutriente (Price y Morel, 1990).

Price y Morel (1990) demostraron en *Thalassiosira weissflogii* que el cadmio es utilizado como nutriente cuando el zinc se encuentra en concentraciones limitantes. Así

también se ha visto que el zinc y el cadmio al encontrarse juntos, la remoción de cadmio se mantiene en niveles relativamente constantes (Lee y Morel, 1995). Los resultados obtenidos con los ensayos de tolerancia y remoción utilizando cultivos de *Synechococcus* sp. y al normalizarlos por millón de células mostraron que la cantidad de cadmio removido tanto en bajas ( $10 \mu\text{g}$  de Cd  $\times 10^{-6}$  células) como en altas ( $10 \mu\text{g}$  de Cd  $\times 10^{-6}$  células) concentraciones fue igual al encontrarse en combinación con el zinc. Esto se debe a que el zinc no se encontraba en concentraciones limitantes. Sin embargo, al adicionar únicamente cadmio al medio de cultivo se obtuvo una remoción de  $9 \mu\text{g}$  de Cd  $\times 10^{-6}$  células en bajas concentraciones y  $15 \mu\text{g}$  de Cd  $\times 10^{-6}$  células en altas concentraciones, esto puede indicar que entre mayor sea la cantidad adicionada, *Synechococcus* sp. remueve una mayor cantidad de este metal, esto puede deberse a que el cadmio está siendo utilizado por la cianobacteria como nutriente al no encontrar Zn en el medio de cultivo.

En el caso del zinc que se encontraba en solución, al medir el porcentaje de remoción por *Synechococcus* sp. tanto en bajas como en altas concentraciones de exposición, se encontró que esta cianobacteria remueve en ambos casos la mayor parte del zinc que se adicionó al medio de cultivo tanto solo (baja: 78% y alta: 96% ) como en combinación (baja: 80% y alta: 93%) con el cadmio. Al normalizar la cantidad de Zn removido en miligramos por millón de células se encontró que *Synechococcus* sp. removió la mayor parte del zinc que se adicionó al medio tanto en bajas (Zn:  $48 \text{ mg}$  de Zn  $\times 10^{-6}$  células y Zn + Cd:  $50 \text{ mg}$  de Zn  $\times 10^{-6}$  células, equivalente al 99% de remoción en ambos casos) como en altas (Zn y Zn +  $\text{NaHCO}_3$ :  $69 \text{ mg}$  de Zn  $\times 10^{-6}$  células y Zn + Cd:  $68 \text{ mg}$  de Zn  $\times 10^{-6}$  células, equivalente al 92 y 87% de remoción respectivamente) concentraciones.

En el caso de las bajas concentraciones, puede deberse a que este metal está siendo utilizado por dicha cianobacteria como nutriente. En los cultivos a los que se les adicionaron las altas concentraciones de Zn tanto solo como combinado se encontró una mortalidad de las células, sin embargo se observó una alta remoción de zinc. Las microalgas y cianobacterias asimilan metales por medio de dos procesos: en el primero se involucra la adsorción por la membrana celular y el segundo se relaciona con el metabolismo celular, por medio del cual la incorporación de metales suele ser lenta (Greene y Bendell, 1990). Moreno-Garrido *et al.* (1998), estudiaron la capacidad de *Nannochloropsis gaditana* para acumular cobre tanto en células vivas como no vivas y obtuvieron que en ambos casos el cobre se acumula tanto en la superficie celular como en el interior de la célula, sin embargo indican que las células vivas acumulan la mayor cantidad de cobre en la superficie celular y las muertas en el interior de la célula. Estos autores indican que esta especificidad de acumulación pudo ser debida a la incapacidad de las células muertas de desintoxicar el metal por transporte activo hacia el exterior de la célula. Así también, en la literatura del área se menciona que debido a la polaridad en las membranas de las células se ha encontrado que células no vivas de algunas especies de algas (*Kappaphycus alvarezii*) y cianobacterias como *Synechococcus* sp. pueden remover metales del medio (Cd, Co, Cu, Cr) (Kumar *et al.*, 2007).

Uno de los factores antes mencionados que pueden afectar la bioabsorción de la microalga es el pH del medio de cultivo (Wase y Forster, 1997). Li *et al.* (1964) indican que cuando el pH del medio es mayor a 3, la superficie celular en células no vivas de *Synechococcus* sp. tiene preferencia por los iones positivos y cuando el pH es menor a 3



puede ocurrir lo contrario. Tanto el cadmio como el zinc tienen un número de oxidación de  $2^+$ , por lo que debido a la carga de dichos metales y a que durante los experimentos de remoción la mayoría de los cultivos de *Synechococcus* sp. se encontraron en un pH de 8 a 9, pudo promover la remoción de ambos metales. Sin embargo, en las mayores concentraciones de zinc ( $75 \text{ mg l}^{-1}$ ) a la cual fue mantenido *Synechococcus* sp., éstas no sobrevivieron. Por lo que como ya se mencionó anteriormente, el pH del cultivo decreció a valores de 4 a 5, por lo que la remoción pudo ser debida a las cargas isoeléctricas a través de la membrana.

En el ensayo de selección de la especie se mantuvieron cultivos de *Synechococcus* sp. a una concentración de  $0.2 \text{ mg l}^{-1}$  de cadmio y  $16 \text{ mg l}^{-1}$  de zinc. A estas concentraciones no se encontró diferencia en los contenidos de clorofila *a* con adición o no de metales. Al aumentar las concentraciones a 1 y  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y Zn, respectivamente, sí hubo diferencias en los contenidos de clorofila *a* siendo éstos mayores a estas concentraciones de metales que el control. Lo anterior pudo ser debido a que los metales afectaron el metabolismo y la síntesis pigmentaria en *Synechococcus* sp. Ilangovan *et al.* (1998) indican que por efecto de las altas concentraciones de cadmio ( $1$  y  $2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd) y zinc ( $50 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn), solos y combinados se altera el fotosistema II y disminuye la producción de oxígeno en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Estos resultados aparentemente contrarios pueden deberse a las diferentes especies utilizadas. No existen trabajos que describan la relación de los pigmentos de *Synechococcus* sp. con diferentes concentraciones de metales con los que se puedan comparar los resultados del presente

trabajo. Por lo anterior es necesario realizar más estudios que determinen los procesos fisiológicos que modifica *Synechococcus* sp. por efecto de la adición de cadmio y zinc.

## V. CONCLUSIONES

El crecimiento de cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp. depende de la cantidad de inóculo y del pH del medio de cultivo.

Las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp. tuvieron buen crecimiento al mantenerse en concentraciones de 0.4 mg l<sup>-1</sup> de cadmio y de 16 mg l<sup>-1</sup> de zinc.

El peso seco específico de los cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp. no se modificó por efecto de la adición de 0.2 mg l<sup>-1</sup> de cadmio y de 16 mg l<sup>-1</sup> de zinc.

Se incrementó el contenido de clorofila *a* por efecto de la adición de 0.2 mg l<sup>-1</sup> de cadmio y 16 mg l<sup>-1</sup> de zinc en los cultivos de *Scenedesmus obliquus*. Sin embargo, el contenido de clorofila *a* no se modificó en los cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Synechococcus* sp. por efecto de la adición de 0.2 mg l<sup>-1</sup> de cadmio y 16 mg l<sup>-1</sup> de zinc.

La adición de cadmio y zinc en bajas (1 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn) y altas concentraciones (2 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn) producen una disminución en el crecimiento de *Synechococcus* sp. Las altas concentraciones de Zn son letales para la cianobacteria.

El peso seco específico de los cultivos de *Synechococcus* sp. no se modificó por efecto de la adición de cadmio y zinc en bajas (1 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 50 mg l<sup>-1</sup> de Zn) y altas concentraciones (2 mg l<sup>-1</sup> de Cd y 75 mg l<sup>-1</sup> de Zn).

La adición de cadmio y zinc en bajas ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) y altas concentraciones ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y  $75 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) producen cambios en la concentración de clorofila *a* en *Synechococcus* sp.

*Synechococcus* sp. remueve la misma cantidad de cadmio ( $10 \mu\text{g } 10^{-6}$  cél) cuando es expuesto tanto a bajas ( $1 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y  $50 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) como a altas ( $2 \text{ mg l}^{-1}$  de Cd y  $75 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn) concentraciones de los dos metales, si éstos son adicionados de forma combinada. Sin embargo, si el cadmio es adicionado en forma individual la cantidad removida se encuentra en relación directa con la concentración de exposición ( $9$  y  $15 \mu\text{g } 10^{-6}$  cél; baja y alta, respectivamente).

Por su parte, la remoción de zinc por *Synechococcus* sp. está en relación directa con el grado de exposición al metal, tanto si es adicionado en forma individual ( $48$  y  $69 \mu\text{g } 10^{-6}$  cél; baja y alta, respectivamente) como si es adicionado en forma combinada ( $50$  y  $68 \mu\text{g } 10^{-6}$  cél; baja y alta, respectivamente). Las cantidades removidas en ambos casos no son significativamente diferentes.

Por su capacidad de remoción de metales, *Synechococcus* sp. puede ser utilizada en la biorremediación de metales en efluentes provenientes de aguas residuales.

## VI. RECOMENDACIONES

Al realizar pruebas de toxicidad con microalgas y/o cianobacterias es recomendable tener una alta densidad de células y mantener las variables ambientales (pH, luz, temperatura y nutrientes) en valores adecuados para el buen crecimiento de la especie.

Las concentraciones de cadmio utilizadas no causaron un efecto negativo en el crecimiento de *Synechococcus* sp., por lo que resulta de gran interés evaluar la capacidad de remoción de esta especie al adicionar cadmio a una mayor concentración de forma individual o combinada con zinc.

Para la recuperación de metales se recomienda utilizar cultivos de microalgas en fase exponencial ya que se incrementaría la eficiencia de remoción.

Realizar ensayos de remoción de cadmio y zinc con células no vivas e inmovilizadas en distintos tipos de polímeros.

Conocer la respuesta fotosintética de cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus* sp. al mantenerse con la adición de cadmio y zinc.

Evaluar la capacidad de remoción de cadmio y zinc en cultivos de microalgas mantenidos con energía subsidiaria provista por aireación.

Evaluar la capacidad de remoción de cadmio y zinc por *Synechococcus* sp. utilizando efluentes urbanos de una planta de tratamiento.

## VII. LITERATURA CITADA

- Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Press. Amsterdam. 578 pp.
- Andrade L., Keim C.N., Farina M. y Pfeiffer W.C. 2004. Zinc Detoxification by a Cyanobacterium from a metal contaminated Bay in Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47(1):147- 152 p.
- Barsanti, L. y P. Gualtieri. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida, USA. 301 pp.
- Becker, E.W.1983. Limitations of heavy metal removal from wastewater by means of algae. *Water Research*. 17:459-466 p.
- Borowitzka, M. A. y Borowitzka L.J. 1988. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press. Primera Edición. Great Britain. 477 pp.
- Cañizarez-Villanueva, R.O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42:131-143 p.
- Cañizarez-Villanueva, R.O. y Casas-Campillo, C. 1991. El papel de las microalgas en el tratamiento terciario de aguas residuales. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN (Instituto Politécnico Nacional). Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México, Distrito Federal. 48 pp.
- Choudhury R. y Srivastava S. 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current Science*. 81(7):768-775
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., y Lodeiros, C. 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*. 53: 325-330 p.
- Edgington, D.N., Gordon, S.A. y Thommes, M.M. 1970. The concentration of radium, thorium, and uranium by tropical marine algae. *Limnology and Oceanography*. 15: 945-955 p.
- Fierro-Reséndiz, S. 2004. Utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes de efluentes de cultivos agrícolas. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 103 pp.
- Gardea-Torresdey, J.L., Arenas, J., Webb, R., Tiemann, K.J. y Gonzalez, J.H.. 1996. Uptake of metal ions from solution by inactivated cells of cyanobacteria. 48-58. En: Erickson, D.L., Tillison, S.C. Grant y J.P. McDonald (Ed.). *Proceedings of the*

Eleventh Annual EPA Conference on Hazardous Waste Research. (HSRC/WERC Joint Conference on the Environment), L.R. Albuquerque, NM.

- Graham, L.E. y Wilcox, L.E. 2000. *Algae*. Prentice Hall International, London. 420 pp.
- Geen, A.R. y Dudeney, A.W.L. 1987. Adsorption and crystallization of gold at biological surfaces. *International Symposium on Biohydrometallurgy*. 13: 305-313 p.
- Gipps, J.F. y Coller, B. A. W. 1980. Effect of physical and culture conditions on uptake of cadmium by *Chlorella pyrenoidosa*. *Australian Journal Marine Freshwater Research*. 31:747-755 p.
- Green, B., Henzl, M.T., y Darnall, D.W. 1986. Elimination of bicarbonate interference in the binding of U (VI) in waters to freeze-dried *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology Bioengineering*. 28: 764-767 p.
- Green, B. y Bendell, G.W. 1990. Algal gels or immobilized for metal recovery. *Introduction to Applied Phycology*. 137-149 pp.
- Guillard, R. L. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. 29-60. En: M.L. Smith y M.H. Chanley (Ed.). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press, New York. 338 pp.
- Guillard, R.R.L. y Ryther J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*. 8: 229-239 p.
- Ilangovan K., Cañizares-Villanueva R.O., González-Moreno S. y Voltolina D. 1998. Effect of Cadmium and Zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*. 60: 936-943 p.
- Kallas, T. y Castenholz, R. W. 1982. Internal pH and ATP-ADP pools in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. during exposure to growth-inhibiting low pH. *Journal of Bacteriology*. 149(1):229-236 p.
- Kaplan, D. 2005. Water pollution and bioremediation by microalgae. 439-447. En: Richmond, A. 2005 (Ed.). *Handbook of Microalgal Culture*. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing, Oxford. 566 pp.
- Kumar, K.S., Ganesa, K. y Subba-Rao, P.V. 2007. Heavy metal chelation by non-living biomass of three color forms of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty. *Journal of Applied Phycology*. En prensa. DOI 10.1007/s10811-007-9181-8.

- Lee J.G. y Morel, F.M.M. 1995. Replacement of zinc by cadmium in marine phytoplankton. *Marine Ecology*. 127:305-309 p.
- Li, S., Jinlan, X., Huan, H., Zhenyuan, N y Guanzhou, Q. 1964. Comparative study of biosorption of Pb (II) and Cr (VI) onto free and immobilized cells of *Synechococcus* sp. <http://www.paper.edu.cn>
- Lorenz, M., T. Friedl y Day, J.G. 2005. Perpetual maintenance of actively metabolizing microalgal cultures. En: Anderson, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Press. Amsterdam. 145-156 pp.
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J. y Moreles E. 2003. Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 in relation on nitrogen concentration and irradiance. *Gayana Botánica*. 60(2):83-89 p.
- Lunde, G. 1973. The synthesis of fat and water soluble arseno organic compounds in marine and limnetic algae. *Acta Chemistry Scandinavian*. 27(5):1586-1594 p.
- Maeda, S. y Sakaguchi, T. 1990. Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae. En: Introduction to Applied Phycology. I. Akatsuka (Ed.). SBS Academic Publishing. The Netherlands. 137-149 pp.
- Madena, S., Nakashima, S., Takeshita, T. y Higashi, S. 1985. Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae and the application to the removal of inorganic arsenic from an aqueous phase. Part 2. by *Chlorella vulgaris* isolated from arsenic-polluted environment. *Science*. 20: 153-161 p.
- Moreno-Garrido, I. 2002. Acumulación de Cu y Zn por células microalgales marinas de *Nannochloropsis gaditana*. *Ciencias Marinas* 28(1): 107-119 p.
- Moreno-Garrido, I., Blasco, J. Gonzalez-Delvalle, M. y Lubián, L.M. 1998. Differences in copper accumulation by the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana* Lubián, submitted to two different thermal treatments. *Ecotoxicology and Environmental*. 1(1): 43-47 p.
- Nagano, T., Hattori, S. Nagai, T., Ukishima, Y., Unno, C. y Honma, T. 1975. Studies on accumulation of heavy metals by *Chlorella*. I. Influence of deleterious concentration of mercury, cadmium and copper on the growth of *Chlorella*. *Journal Hygiene Chemistry*. 21: 301-306 p.
- Nagano, T., Hattori, S. Nagai, T., Ukishima, Y., Unno, C. y Honma, T. 1977. Studies on accumulation of heavy metals by *Chlorella*. II. Uptake of cadmium by *Chlorella ellipsoidea* (C-27) and its distribution in *Chlorella* cells. *Journal Hygiene Chemistry*. 23: 1-6 p.



- Nakajima, A., Horikoshi, T. y Sakaguchi, T. 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. European Journal of Applied Microbiology Biotechnology. 16: 88-91 p.
- Nieves, M., D. Voltolina y P. Piña. 2005. Growth and biomass production of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in a standard medium added with three products of zeolitic nature. Aquacultural Engineering 32:403-410 p.
- Oswald, W. J. 1957. Light conversion efficiency in photosynthetic oxygenation. IER, Series 44. Sanitary Engineering Research Laboratory. University of California. Berkeley. 127 pp
- Oswald, W.J. 1988. Microalgae and Wastewater Treatment. En: M.A. Borowitzka y Borowitzka L.J. (Eds.). Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 305-328 pp.
- Parsons, T.R., Y. Maita y Lalli, C.M. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, Oxford. 173 p.
- Price, N.M. y Morel, F.M.M. 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in marine diatom. Letters to Nature. 344:658-660 p.
- Rachlin, J.W., Warkentine, B., y Jensen, T.E. 1982. The growth responses of *Chlorella saccharophila*, *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* to selected concentrations of cadmium. Bulletin the Torrey Botanical Club. 109(2):129-135 p.
- Richmond, A. 1986. Microalgae of economic potential. En: Richmond, A. (Ed.). Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boca Raton. 199– 243 p.
- Raco-Rands. 1994. Characteristics of effluents from large municipal wastewater treatment facilities in 1994. <http://www.sccwrp.org/pubs/annrpt/94-95/art-01.html>.
- Ryder, R.A. 1979. Chromium tannery wastewater effects on algae oxidation pond and physical-chemical processes. Process Industrial Waste Conference 33: 706-737 p.
- Sakaguchi, T., Nakajima, A. y Horikoshi, T. 1981. Studies on the accumulation of heavy metals elements in biological system. Accumulation of molybdenum by green microalgae. European Journal of Applied Microbiology Biotechnology. 12:84-89 p.
- Sakaguchi, T., Horikoshi, T, y Nakajima, A. 1978. Uptake of uranium from sea water by microalgae. Journal of Fermentation Technology. 56: 561-565 p.

- Salazar-González, M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *ContactoS* 59: 64-70 p.
- Silverberg, B.A. 1975. Ultraestructura localization of lead in *Stigeoclonium tenue* (Cholophyceae, Ulotrichales) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis. *Phycologia*. 14:265-274 p.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1979. *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H. Blume Ediciones. España. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weigh, packed cell volume and optical density. En: Stein, J. R. (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement*. Cambridge University Press, New York. 321-343 pp.
- StatSoft, Inc. 2002. *Statistica for Windows [Computer program manual]*. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com.
- Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Cultura Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. 447 pp.
- Sunda, W.S., Price, N.M. y Morel, F.M.M. 2005. Trace metals ion buffers and their use in culture studies. En: Anderson, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Press. Amsterdam. 35-63 pp.
- Sunday, W.S. 1998. Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biological Oceanography*. 6:411-442 p.
- Turpin, D.H. 1991. Effect of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*. 27: 14-20 p.
- Vera, G., Tam, J., Pinto, E. y Angulo, J. 2001. Efecto del cadmio sobre el crecimiento poblacional de la diatomea marina *Chaetoceros gracilis*. *Revista de Biología de Perú*. 8(1):12-16 p.
- Wase, J. y Forster, Ch. 1997. *Biosorbents for metal ions*. Taylor & Francis. Great Britain. 238 pp.
- Wilde, K.L., Stauber, J.L., Markich, S.J., Franklin, N.M., Brown P.L. 2006. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater algae (*Chlorella* sp.). *Environmental Contamination and Toxicology*. 51:174–185 p.

Ybarra G.R. y Webb R. 1999. Effects of divalent metal cations and resistance mechanisms of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *Journal of Hazardous Substance Research*. 2:1-6 p.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.