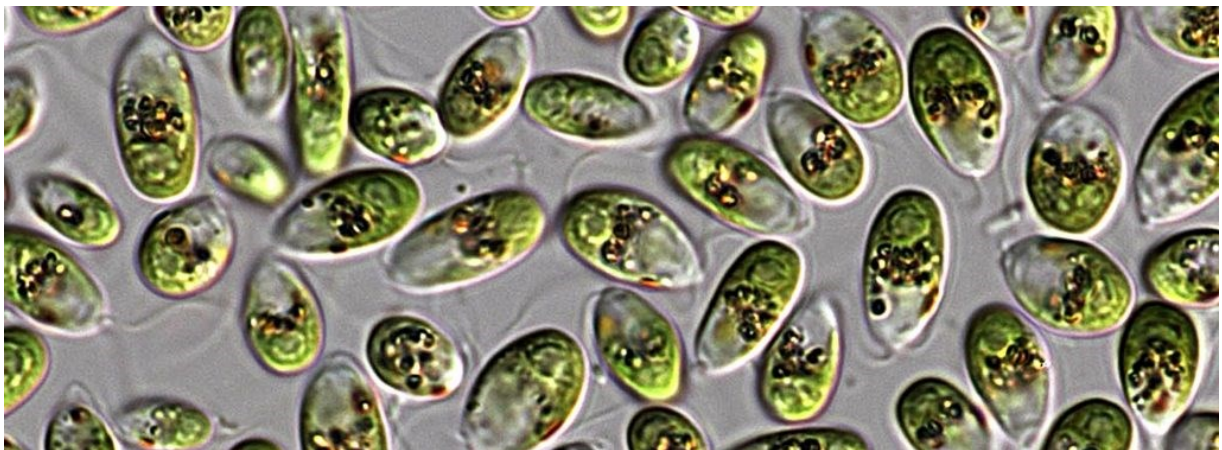




# MICROALGAS COMO CANDIDATAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS POR METILMERCURIO

Alain Sanabria Bernaras



Trabajo entregado para la obtención del grado de Master en  
Tecnología Ambiental

Modalidad: Investigación

Junio 2023

Directores:

Carlos Vílchez Lobato

Zivan Gojkovic



**D. Zivan Gojkovic**, DNI: Y2183560T y cargo Investigador, departamento y/o empresa Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (CIDERTA), Universidad de Huelva,

### **INFORMA:**

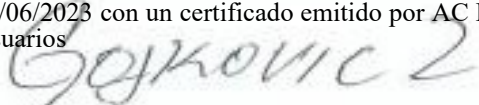
Que el trabajo titulado “MICROALGAS COMO CANDIDATAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS POR

METILMERCURIO” presentado por **D. ALAIN SANABRIA BERNARAS**, con **D.N.I.: 72607693M**, ha sido realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (CIDERTA), Universidad de Huelva, bajo mi dirección, y la co-supervisión de D. Carlos Vílchez Lobato (DNI: 29.789.868-S) autorizo su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: Investigación), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva, a 30 de junio de 2023

Fdo.: Zivan Gojkovic y Carlos Vílchez

Firmado por GOJKOVIC ZIVAN - Y2183560T el día 29/06/2023 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios



VILCHEZ  
LOBATO  
CARLOS -  
29789868S

Firmado digitalmente  
por VILCHEZ LOBATO  
CARLOS - 29789868S  
Fecha: 2023.06.29

17:59:16 +02



## RESUMEN

Las microalgas son las candidatas ideales para el diseño de técnicas de biorremediación debido a sus características fisiológicas y su capacidad para acumular metales pesados en el interior de la célula. Las especies seleccionadas han sido *C.onubensis* y *D. salina*, que cuentan con características apropiadas para la biorremediación de aguas contaminadas por MeHg, y se les ha expuesto a tres niveles de concentración de dicho compuesto durante 72 h; 15, 30 y 80 nM. Por una parte, se ha analizado mediante varias medidas la respuesta de dichas especies para cada nivel de concentración, y por otra parte se ha analizado la capacidad que tienen para acumular MeHg en el interior de la célula, lo que permite evaluar la viabilidad de *C.onubensis* y *D. salina* para ser usadas en técnicas de biorremediación. En ambos casos el crecimiento celular se ha visto afectado ante la exposición de MeHg, y se ha observado un efecto mayor a medida que la concentración de MeHg aumenta. A pesar de ello, ambas especies han sobrevivido, y, es más, han aumentado sus densidades a lo largo del tiempo. La capacidad fotosintética de *C.onubensis* se ha visto afectada solamente al exponerla a 80 nM de MeHg, y la disminución observada no ha sido demasiado significativa. En los demás niveles de exposición no se ha observado variación alguna en la capacidad fotosintética de dicha especie. *D. salina* sí se ha visto afectada a todos los niveles de exposición, y el efecto ha sido mayor a medida que aumenta la concentración de MeHg, aunque la disminución observada no ha sido demasiado significativa, y los valores se han mantenido dentro del rango en el que la fotosíntesis se realice adecuadamente. No se ha observado ningún indicio de estrés oxidativo en ninguna de las dos especies, por lo que se descarta que este efecto haya sido el causante de la disminución del crecimiento. No se ha logrado determinar el mecanismo fisiológico al que afecta el MeHg, por lo que queda pendiente para investigaciones futuras. Ambas especies han sido capaces de acumular cantidades significativas de Hg en el interior de la célula, especialmente *C.onubensis*, la cual ha alcanzado el máximo de 171  $\mu\text{g Hg/g}_{\text{DW}}$  frente a los 69  $\mu\text{g Hg/g}_{\text{DW}}$  de *D. salina*. Tanto *C.onubensis* como *D. salina* han demostrado ser capaces de no solo sobrevivir, sino seguir creciendo a la vez que bioacumulan cantidades importantes de Hg. Los resultados del presente estudio son bastante prometedores, por lo que se deberá estudiar más a fondo esta línea de investigación en futuros trabajos para poder elaborar técnicas de biorremediación a escala real.

## ABSTRACT

Microalgae are ideal candidates for the design of bioremediation techniques due to their physiological characteristics and their ability to accumulate heavy metals inside the cell. The selected species are *C. onubensis* and *D. salina*, which have suitable characteristics for the bioremediation of water contaminated with MeHg, and they have been exposed to three levels of concentration of this compound for 72 hours: 15, 30, and 80 nM. On one hand, the response of these species has been analyzed for each concentration level through various measures, and on the other hand, their capacity to accumulate MeHg inside the cell has been examined, allowing the evaluation of the viability of *C. onubensis* and *D. salina* for their use in bioremediation techniques. In both cases, cell growth has been affected by the exposure to MeHg, and a greater effect has been observed as the concentration of MeHg increases. Despite this, both species have survived and, furthermore, their densities have increased over time. The photosynthetic capacity of *C. onubensis* has only been affected when exposed to 80 nM of MeHg, and the observed decrease has not been significant. No variation in the photosynthetic capacity of this species has been observed at the other exposure levels. *D. salina* has been affected at all exposure levels, and the effect has been greater as the concentration of MeHg increases, although the observed decrease has not been significant, and the values have remained within the range in which photosynthesis occurs properly. No signs of oxidative stress have been observed in either of the two species, so it is ruled out that this effect has been the cause of the growth decrease. The physiological mechanism affected by MeHg has not been determined, so further research is needed in future investigations. Both species have been able to accumulate significant amounts of Hg inside the cell, especially *C. onubensis*, which has reached a maximum of 171  $\mu\text{g Hg/g}_{\text{DW}}$  compared to *D. salina*'s 69  $\mu\text{g Hg/g}_{\text{DW}}$ . Both *C. onubensis* and *D. salina* have demonstrated their ability to not only survive but also continue growing while bioaccumulating significant amounts of Hg. The results of this study are quite promising, so this line of research should be further explored in future work to develop real-scale bioremediation techniques.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. El papel de las microalgas en la protección del medio ambiente .....	5
1.2. Biorremediación mediante microalgas.....	7
1.3. Importancia del mercurio como contaminante .....	8
1.4. Metilmercurio, la forma orgánica más tóxica de Hg.....	9
1.5. Criterios de selección de microalgas para biorremediación .....	11
1.6. Especies seleccionadas para los ensayos .....	12
1.7. Objetivos del estudio .....	14
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Cepas y medios de cultivo.....	15
2.2. Materiales .....	15
2.3. Mantenimiento de los cultivos .....	16
2.4. Medidas tomadas .....	16
2.4.1. Densidad óptica.....	16
2.4.2. Eficiencia cuántica.....	17
2.4.3. Número de células (en ml <sup>-1</sup> usando el contador de células) .....	17
2.4.4. Número de células (en ml <sup>-1</sup> usando la cámara de Neubauer).....	18
2.4.5. Medición del pH y la microscopía óptica .....	19
2.5. Análisis de las muestras .....	19
2.5.1. Actividad de SOD .....	19
2.5.2. ICP-MS .....	20
2.6. Metodología experimental .....	20
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
3.1. Densidad óptica .....	23
3.1.1. Resultados de densidad óptica de <i>C. onubensis</i> .....	23
3.1.2. Resultados de densidad óptica de <i>D. salina</i> .....	27
3.1.3. Conclusiones sobre la densidad óptica .....	30
3.2. Número de células .....	31

3.2.1. Resultados de crecimiento de <i>C. onubensis</i> .....	31
3.2.2. Resultados de crecimiento de <i>D. salina</i> .....	34
3.2.3. Conclusiones sobre el crecimiento .....	36
3.3. Eficiencia cuántica .....	37
3.3.1. Resultados de Qy de <i>C. onubensis</i> .....	37
3.3.2. Resultados de Qy de <i>D. salina</i> .....	38
3.3.3. Conclusiones sobre Qy .....	39
3.4. SOD .....	40
3.4.1. Resultados de SOD de <i>C. onubensis</i> .....	40
3.4.2. Resultados de SOD de <i>D. salina</i> .....	41
3.4.3. Conclusiones sobre los resultados de la actividad de la enzima SOD ....	41
3.5. ICP-MS .....	41
3.5.1. Resultados ICP-MS de <i>C.onubensis</i> .....	43
3.5.2. Resultados ICP-MS de <i>D. salina</i> .....	44
3.5.3. Conclusiones sobre los resultados de ICP- MS .....	45
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES FINALES .....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	48



# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

## **1.1. El papel de las microalgas en la protección del medio ambiente**

Las microalgas son organismos microscópicos, mayoritariamente unicelulares y fotoautótrofos oxigénicos, aunque también pueden crecer como mixótrofas o heterótrofas (López Rosales, 2017). Su tamaño varía según la especie desde 1  $\mu\text{m}$  hasta 30  $\mu\text{m}$ , y pueden observarse tanto en forma de células individuales como en asociaciones, bien en forma de filamentos, cenobios y colonias o en simbiosis con otras especies (López Rosales, 2017; Mobin et al., 2019). Se encuentran presentes mayoritariamente en agua salina, en agua dulce y en estuarios, aunque son capaces de vivir en todo tipo de hábitats; Se han descrito especies terrestres en terrenos húmedos, en la nieve, en desiertos, en la corteza de los árboles, en la madera e incluso en el aire, entre otros (Básaca Loya, 2006; Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022; López Rosales, 2017; Toimil García, 2021).

Todas las especies de microalgas tienen en común que contienen clorofila a además de otros pigmentos fotosintéticos similares, mediante los cuales realizan fotosíntesis oxigénica (López Rosales, 2017). Dicho proceso les permite fijar  $\text{CO}_2$  mediante el uso de luz solar y agua, transformándolo en biomasa rica en macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) y micronutrientes (carotenoides, ácidos fenólicos, vitaminas y minerales), excretando oxígeno en el proceso (Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022; Wong et al., 2022). Su eficiencia fotosintética es mayor que la de los demás organismos fotosintéticos, siendo esta de 0,5 % en el caso de las plantas terrestres frente al 3 - 5 % en las microalgas (López Rosales, 2017; Tredici, 2010).

Los microorganismos marinos como el fitoplancton realizan la mitad del secuestro o fijación de  $\text{CO}_2$  mundial, a la vez que generan la mitad del  $\text{O}_2$ , y eso que solo equivalen a un 1 % de la biomasa global de las plantas (Cavicchioli et al., 2019). Por ello juegan un papel clave tanto en la regulación de los ciclos bio-geoquímicos del planeta, sobre todo en el del carbono, como en el ecosistema mundial y el cambio climático (Cavicchioli et al., 2019; Ighalo et al., 2022). Su gran capacidad para fijar  $\text{CO}_2$  puede ser muy útil en un futuro, habilitando el diseño de sistemas de captura de  $\text{CO}_2$  basados en microalgas, ya que necesitan mucho menos espacio y recursos además de fijar el  $\text{CO}_2$  con una eficiencia entre 10 y 50 veces superior frente a los demás organismos fotosintéticos (Even et al., 2022; Ighalo et al., 2022; López Rosales, 2017).

En los ecosistemas acuáticos existen dos principales grupos de microalgas; las planctónicas, que se encuentran flotando en el agua y las bentónicas que se encuentran adheridas a las rocas del fondo en aguas dulces y a los corales en ambientes marinos (Ayala Montaña, 2016). El plancton es la asociación entre microalgas, bacterias, hongos y algunos animales pequeños, y juega un papel clave en los ecosistemas marinos, ya que es la base de la cadena alimenticia marina. En mares y océanos viven gran cantidad de microalgas planctónicas, responsables del

90 % de la fotosíntesis total de la tierra, convirtiéndolas en las mayores productoras primarias del planeta (Básaca Loya, 2006).

Las microalgas fueron unas de las primeras formas de vida que habitaron los océanos del planeta tierra hace 3000 millones de años, siendo las cianobacterias los primeros organismos fotosintéticos y las responsables del aumento de los niveles de oxígeno en la atmosfera primigenia (Ayala Montaña, 2016; Sehgal et al., 2019; Wong et al., 2022). Aunque no se sepa a ciencia cierta, según varios autores se estima que en la actualidad existen entre 200.000 y 800.000 especies de las cuales en torno a 50.000 han sido descritas en la actualidad (Eltanahy & Torky, 2021; Mobin et al., 2019; Wong et al., 2022). Su diversificación está relacionada con el origen y la evolución de la célula eucariota, las cuales se crearon a partir de distintos procesos endosimbióticos (Bhattacharya & Medlin, 1998).

El término microalga se usa para englobar un grupo de organismos pertenecientes a diferentes linajes evolutivos, es decir, no tienen ancestro común, pero comparten características ecológicas debido a que los procesos endosimbióticos que derivaron en cada uno de los grupos fueron parecidos. Forman un grupo polifilético que integran los dominios procariota y eucariota, por lo que dicho término carece de sentido taxonómico y se usa por conveniencia (Bhattacharya & Medlin, 1998; López Rosales, 2017).

La gran diversidad de las microalgas les ha proporcionado la capacidad de adaptarse a todo tipo de situaciones, permitiéndoles vivir en todo tipo de hábitats, incluso en las condiciones fisicoquímicas más extremas (López Rosales, 2017; Sadava et al., 2011). Las especies extremófilas crecen bajo condiciones que las demás especies no soportan, y por ello tienen una menor competencia interespecífica, lo que facilita la producción de cultivos puros en laboratorio (Bermejo et al., 2018). Los bio-productos son sustancias fisiológicamente activas con propiedades funcionales en el cuerpo humano, como por ejemplo carotenoides, ficocianinas, polifenoles, ácidos grasos, vitaminas, polisacáridos y proteínas, entre otros (Wong et al., 2022). La producción de estos compuestos varía entre especies e incluso dentro de la misma especie, ya que depende de varios factores tanto ambientales como fisiológicos. Ciertos compuestos bioactivos de las microalgas tienen un gran interés comercial, y hay evidencias científicas de que las microalgas son una alternativa viable frente a la síntesis química de ciertos compuestos (Sadava et al., 2011; Wong et al., 2022).

Por ello, la investigación científica de las microalgas tiene un gran interés tanto científico como comercial. Esto se debe a sus características de rápido crecimiento y alta productividad, ya que poseen una mayor superficie específica frente a otras alternativas (López Rosales, 2017; Sehgal et al., 2019). Además, cuentan con varias cualidades muy interesantes; Las células se duplican en un periodo de 1 a 10 días dependiendo de la especie, tienen un alto contenido proteico que varía entre 15 - 52 % del peso seco, producen varios metabolitos de interés (cuya productividad puede

aumentarse mediante el sometimiento de los cultivos a condiciones de estrés) y se necesita relativamente poco espacio para su cultivo (García Romeral et al., 2017; López Rosales, 2017; Romero Cruz, 2017; Sehgal et al., 2019)

En los últimos años las investigaciones relacionadas con estos microorganismos se han ampliado. Numerosos datos sobre la composición y el metabolismo de algunas especies de microalgas han desvelado diversas aplicaciones terapéuticas, industriales y ambientales, entre otras. Dichos organismos presentan un gran potencial especialmente en los ámbitos mencionados, aunque las investigaciones al respecto se encuentran todavía en un punto de desarrollo muy prematuro (Wong et al., 2022).

## **1.2. Biorremediación mediante microalgas**

Las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos que bioacumulan metales son varias, pero la biorremediación es la de mayor interés para la investigación actual. Consiste en la eliminación de los metales pesados presentes en ambientes contaminados mediante el uso de organismos, en el caso del presente estudio, con microalgas (Romero Cruz, 2017). Se consideran tecnologías limpias ya que tienen un bajo coste y menores requerimientos energéticos, y sobre todo menor impacto ambiental que las técnicas alternativas. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados no pueden degradarse completamente mediante química, por lo que hay que recurrir a la inmovilización o a la reducción de su toxicidad, bien cambiando el estado de oxidación o cambiando la especie química (Romero Cruz, 2017).

Los microorganismos tienen distintos mecanismos de defensa ante la presencia de metales pesados (Boening, 1999);

- Bombeo fuera de la célula
- Reducción enzimática a formas elementales menos tóxicas
- Quelación por polímeros enzimáticos
- Ligación a la pared celular
- Precipitación de los complejos inorgánicos insolubles en la superficie celular
- Bio-metilación y posterior transporte a través de la membrana celular por difusión

Estos mecanismos permiten a las microalgas diseñar diferentes estrategias ante la presencia de metales tóxicos. Los ejemplos más importantes de estos mecanismos son los siguientes; El primero, la excreción al medio de sustancias que reduzcan la toxicidad del compuesto o impidan la interacción con la célula, el segundo evitar que el compuesto pase al interior de la célula mediante su adsorción en el exterior, y por último, la acumulación intracelular.

Los mecanismos de acumulación intracelular son de interés para la elaboración de técnicas de biorremediación, ya que habilita la acumulación de los contaminantes en el interior de la célula del microorganismo seleccionado, para su posterior eliminación del medio con mayor facilidad. Para poder acumular compuestos tóxicos en el interior de la célula es necesario poseer algún tipo de mecanismo de tolerancia para sobrevivir ante los efectos dañinos. El más común es la unión a los ligandos intracelulares, mayoritariamente fitoquelatinas y grupos de sulfhidrilos, formando complejos metálicos acumulables (Folgar et al., 2009).

Se ha observado que algunas especies de microalgas tienen una gran capacidad de incorporación y posterior acumulación intracelular para distintos metales pesados, lo que provoca que su concentración dentro de la célula sea mayor que en exterior (Folgar et al., 2009). Esta característica que en un principio es negativa, ya que facilita la transferencia de mercurio a los niveles más altos de la cadena alimentaria, puede ser la clave para el diseño de nuevas técnicas de biorremediación.

### **1.3. Importancia del mercurio como contaminante**

El mercurio (Hg) pertenece al grupo de los metales pesados junto con el arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr) y manganeso (Mn). Dichos elementos presentan una alta toxicidad para todo tipo de organismos, y por ello constituyen un gran peligro para la salud humana y el medio ambiente. El Hg a presión y temperatura ambiente es el único metal líquido, y forma sales en dos estados iónicos; Hg (I) y Hg (II). Se encuentra de forma natural en el medio ambiente, emitiéndose a la atmósfera en las erupciones volcánicas y en la evaporación de los océanos, pero la forma más común en la que se encuentra es formando parte de la composición de distintos minerales, en la que se mantiene estable y no presenta riesgos significativos (Lavoie et al., 2013; Marnane, 2018). El problema viene cuando se usan estos minerales en las distintas actividades humanas como la metalurgia, la quema de combustibles o la fabricación de cemento, ya que la manipulación de los minerales que contienen Hg deriva en la emisión de grandes cantidades de dicho elemento al medio ambiente (Lavoie et al., 2013). Esto ha provocado que los niveles de Hg actuales sean un 500 % superiores en la atmósfera y un 200 % en los océanos respecto a los niveles naturales (Marnane, 2018). El Hg elemental es el único metal líquido capaz de convertirse en vapor poco soluble en el agua bajo condiciones de temperatura y presión atmosférica comunes. Dicho vapor tiene una gran capacidad de dispersión en la atmósfera debido a su larga vida media, lo que posibilita su transporte desde las fuentes de emisión terrestres hasta puntos muy lejanos, de hecho, la mitad de Hg existente en Europa viene de fuera del continente (Boening, 1999; Thera et al., 2022). Otra fuente importante de Hg para el ecosistema marino es la de origen fluvial, que tiene origen en los vertidos industriales que contaminan los ríos con una gran variedad de contaminantes (Li et al., 2022).

El Hg que se encuentra en la atmósfera, al entrar en contacto con las partículas en suspensión crea enlaces y se adhiere a ellas, de forma en la que acaba depositándose en los sedimentos del fondo marino temporalmente, para después pasar al medio acuático por el efecto de las corrientes marinas y la acción de los microorganismos (Siedlewicz et al., 2020). De esta manera, el Hg llega desde las emisiones terrestres hasta los sedimentos del medio marino, y al transferirse al agua se transforma en distintos compuestos orgánicos muy tóxicos y biodisponibles. Dichos compuestos son ingeridos por todo tipo de organismos, transfiriéndose así a través de todos los eslabones de la cadena alimenticia (Siedlewicz et al., 2020). El Hg ingerido persiste en el cuerpo y es bioacumulable, por lo que los organismos más grandes suelen tener mayores cantidades de dicho elemento. Esto sucede debido a que su dieta se basa en la ingesta de una gran cantidad de organismos más pequeños, que ya han ingerido Hg previamente. Por ello el consumo de organismos marinos grandes como el atún o el pez espada puede llegar a suponer un problema de salud en la población humana y en distintas especies animales, debido a que tienden a acumular mayores cantidades de dicho compuesto (Siedlewicz et al., 2020).

La legislación respecto a los límites de Hg varía según la jurisdicción y la matriz ambiental considerada. En el convenio de Minamata sobre el mercurio no se establecen límites ambientales específicos, pero obliga a controlar y reducir las emisiones y liberaciones de Hg a nivel global. La OMS (Organización Mundial de la Salud) recomienda los siguientes valores de Hg; 6 µg/L en agua potable, 1 µg/m<sup>3</sup> en aire a largo plazo (media anual) y una ingesta de 2 µg/kg de peso corporal por día (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2021).

La Directiva 2008/105/CE de la Unión Europea establece normas de calidad ambiental del agua para proteger a los organismos y ecosistemas acuáticos, y pone un límite de 20 µg/kg de peso húmedo para la biota y 0,07 µg/l para aguas superficiales (Comisión Europea, 2008). Por otra parte, la Directiva 2009/161/UE establece un límite de 0,02 mg/m<sup>3</sup> en aire, para una media ponderada de 8 horas de trabajo (Comisión Europea, 2009). La UE también dispone de varios reglamentos relacionados con el Hg, el más destacable el Reglamento (CE) n.º 2023/915 que en el punto 3.3 del anexo I establece límites máximos de Hg para diferentes tipos de alimentos, por ejemplo, de 1 mg/kg para pescado (Comisión Europea, 2023).

En España el Real Decreto 3/2023 establece como límite para el agua potable una concentración de 1 µg/l (Ministerio de la Presidencia, 2023).

#### **1.4. Metilmercurio, la forma orgánica más tóxica de Hg**

El mercurio inorgánico divalente (Hg<sup>2+</sup>) se transforma en metilmercurio (MeHg) en los sedimentos y en masas de agua, debido a la acción de distintos microorganismos anaeróbicos como por ejemplo las bacterias reductoras de hierro, las sulfato-reductoras y las metanogénicas (Quiroga-Flores et al., 2021; Ulus et al., 2022). La

acción microbiana es la principal responsable de la metilación de Hg en los ecosistemas marinos, aunque también puede darse por la vía fotoquímica en aguas poco profundas (Li et al., 2022). Esta forma orgánica del Hg es muy tóxica para humanos y animales, y tiene una alta capacidad de bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica marina, pudiendo llegar a tener una concentración de entre 4 y 7 órdenes de magnitud mayor en los peces en comparación con la del medio acuático en el que se encuentran (Siedlewicz et al., 2020; Skrobonja et al., 2019; Wu et al., 2019).

Cuando el MeHg entra en el cuerpo, el ciclo enterohepático no es capaz de expulsarlo, por lo que queda retenido en el organismo aumentando sustancialmente la media-vida de dicho compuesto (Boening, 1999). Las propiedades hidrofóbicas del MeHg le permiten pasar la barrera sangre-cerebro y también la de la placenta, e interactúa directamente tanto con componentes celulares como nucleares, provocando grandes efectos neurotóxicos en el cerebro y en el sistema nervioso, dañando los riñones y provocando daños irreparables a los fetos (Boening, 1999; Liem-Nguyen et al., 2020).

Los compuestos de Hg tienen un efecto de toxicidad aguda en los microorganismos, el cual se puede medir mediante la fotosíntesis o la tasa de crecimiento. Basándose en estos criterios, el NOEL (Nivel de No Observación de Efectos) para el Hg inorgánico es entre 1 - 50 µg/l, y de 10 a 100 veces menor para el MeHg, dependiendo del tipo y especie de microorganismo, las condiciones experimentales y la densidad de las células de cultivo (Boening, 1999).

El ion de metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) tiene una gran afinidad por los ligandos de base blanda, en especial por los compuestos sulfúricos orgánicos e inorgánicos como los sulfuros y los tioles. La presencia de dichos compuestos provoca la especiación del MeHg, otorgándole propiedades hidrofóbicas y aumentando su biodisponibilidad (Liem-Nguyen et al., 2020; Skrobonja et al., 2019). Por ejemplo, se ha observado que el complejo MeHg-cisteína se comporta como un nutriente móvil que se transporta activamente al endosperma de los granos de arroz, y que la concentración de tioles puede tanto incentivar como inhibir la metilación del Hg inorgánico por parte de las bacterias anaeróbicas (Liem-Nguyen et al., 2020; Skrobonja et al., 2019). También son determinantes otros varios factores ambientales en el proceso de metilación del Hg divalente, como por ejemplo la temperatura, el pH y la composición del medio (Boening, 1999).

Por otra parte, la transferencia del MeHg del medio acuático a la cadena alimenticia está influenciada por varios factores ambientales, entre ellos uno de los que cobra mayor importancia es la bioconcentración en los organismos base de la cadena, como pueden ser las microalgas (Lavoie et al., 2013; Skrobonja et al., 2019). Se ha demostrado que la transferencia de MeHg del medio líquido a los microorganismos es un paso crucial para la posterior bioacumulación en organismos superiores, y determinará en gran medida la bioconcentración en estos (Skrobonja et al., 2019).

En el estudio de Wu et al. (2019) analizaron varios ecosistemas marinos en los que los niveles de MeHg en el medio marino se encontraban entre 0,02 y 1,94 ng/l, y analizaron las concentraciones a distintos niveles de la cadena trófica; En los microorganismos se observaron niveles entre 1,70 y 410 ng/g, mientras que en el siguiente nivel de la cadena, en el zooplancton, se observaron niveles aún mayores de entre 2,70 a 2600 ng/g. El último nivel de medición fue el de los peces planctívoros, donde las concentraciones aumentaron hasta valores entre 24,1 y 3400 ng/g. También analizaron las tasas de transferencia directa desde el agua a cada uno de los 3 niveles. Se observaron tasas similares para los dos niveles inferiores, pero mucho más bajas en el caso de los peces. Con ello Wu et al. (2019) concluyó que la concentración en los niveles inferiores fue el factor más influyente en la bioconcentración de los organismos superiores, ya que a pesar de que la tasa de transferencia directa desde el agua a los peces resultó ser mucho menor, las concentraciones que acumularon fueron muy superiores (Wu et al., 2019).

### **1.5. Criterios de selección de microalgas para biorremediación**

Para determinar la viabilidad de una especie de microalga candidata para la biorremediación, se han de analizar las cinéticas de absorción ante distintos compuestos. Estos análisis determinan como responde cada especie ante la presencia del compuesto de interés, en este caso el Hg; si lo expulsa, lo inmoviliza en la parte exterior de la célula o lo acumula en el interior. Las estrategias usadas y la cantidad de Hg que toleran y son capaces de retener varían en cada especie y depende de las condiciones ambientales, conocimientos de los cuales en la actualidad se dispone de muy poca información.

Por ello, es de interés investigar la cinética de absorción de las potenciales especies candidatas, ya que si se descubriera alguna especie con la capacidad de remover el Hg del medio acuático eficientemente, se podría diseñar una solución para un gran problema ambiental de los ecosistemas acuáticos. Además dichos conocimientos podrían abrir la puerta indirectamente al diseño de técnicas similares para otros contaminantes.

Como se ha comentado anteriormente, el factor más importante para que el Hg llegue a los niveles más altos de la cadena alimentaria no es la presencia de Hg en el agua, sino en los niveles más bajos de esta. Por ello, el análisis del agua puede dar una falsa idea del estado de contaminación, por lo que es más efectivo analizar los niveles intracelulares de los microorganismos como las microalgas. La pared celular y la membrana citoplasmática de las microalgas son las únicas barreras que las separan del impacto del medio, y su diversidad y distribución se ha relacionado en varias ocasiones con el tipo y concentración de iones metálicos en el medio. Además, su amplia distribución en áreas contaminadas, su rol primario en la cadena alimenticia y su tendencia a acumular metales posibilita su uso como bioindicadores (Kaamouch et al., 2022).

Dicho esto, las especies de microalgas con gran capacidad de bioacumulación podrían usarse también como bioindicadores de la calidad del agua con mayor fiabilidad que las técnicas actuales, basadas en las mediciones del medio acuático, ya que son más sensibles y reaccionan más rápidamente que otros organismos a los cambios ambientales (Zhu et al., 2019).

Al elegir las especies candidatas para dicho estudio hay que aplicar varios criterios que puedan indicar de antemano que la especie posee las características necesarias;

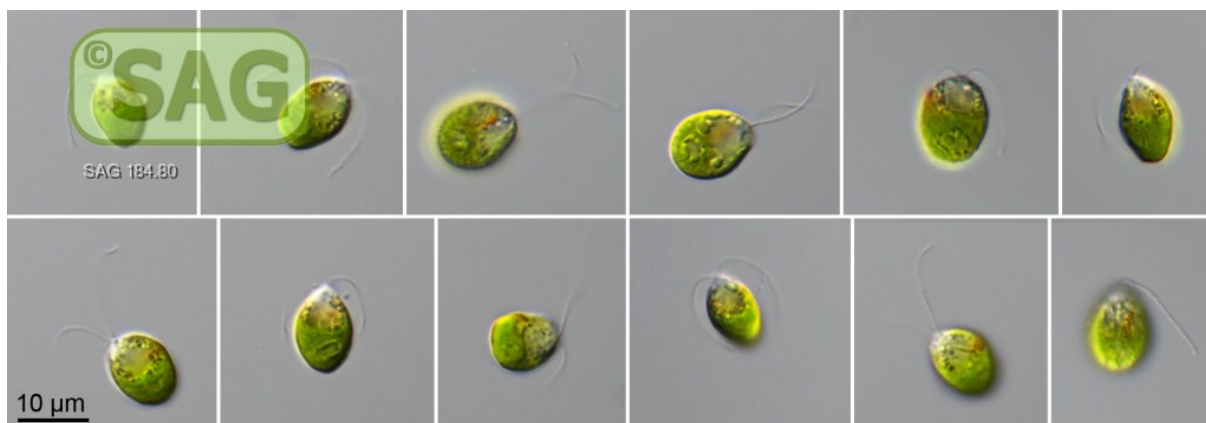
- Que habiten ambientes con altas concentraciones de metales pesados, lo que indica que posee mecanismos de defensa ante estos.
- Investigaciones previas que demuestren su capacidad de tolerancia o bioacumulación para otro tipo de metales, o que sus características funcionales o morfológicas tengan características adecuadas para ello.
- Las especies extremófilas sufren estrés constantemente, por lo que suelen contar con mecanismos de defensa poco comunes que otras especies no poseen, y además suelen tener una menor competencia, lo que facilita su aislamiento experimental.

## **1.6. Especies seleccionadas para los ensayos**

En este trabajo se ha analizado la cinética de absorción del MeHg para dos especies de microalgas extremófilas presentes en las masas acuáticas de la comunidad autónoma de Andalucía; *Dunaliella salina* y *Coccomyxa onubensis*.

*D. salina* (ver **imagen 1**) es una especie de microalga verde unicelular marina que pertenece a la división Chlorophyta. Es habitual encontrarla en las aguas poco profundas de las marismas onubenses y vive en ambientes extremadamente salinos con concentraciones de NaCl de más de 3 M (Bermejo et al., 2018; Zepeda Lupio, 2017). Las células tienen una morfología elipsoide y simétrica, con una longitud de 5 a 18  $\mu\text{m}$  y carece de pared celular rígida. Posee un único cloroplasto donde almacena los carotenoides en forma de glóbulos lipídicos, lo que le da a la célula un color rojizo-anaranjado, y cuenta con dos flagelos de igual longitud (Zepeda Lupio, 2017). Al no tener pared celular rígida, la célula queda expuesta a la presión osmótica del medio, por lo que para sobrevivir a ambientes de alta salinidad acumula altas concentraciones de glicerol, manteniendo así tanto el equilibrio osmótico como la actividad enzimática. Esto es posible gracias a que sintetiza grandes cantidades de glicerol a partir del almidón, y que su membrana celular tiene una baja permeabilidad ante dicho compuesto (García Jiménez, 1994).

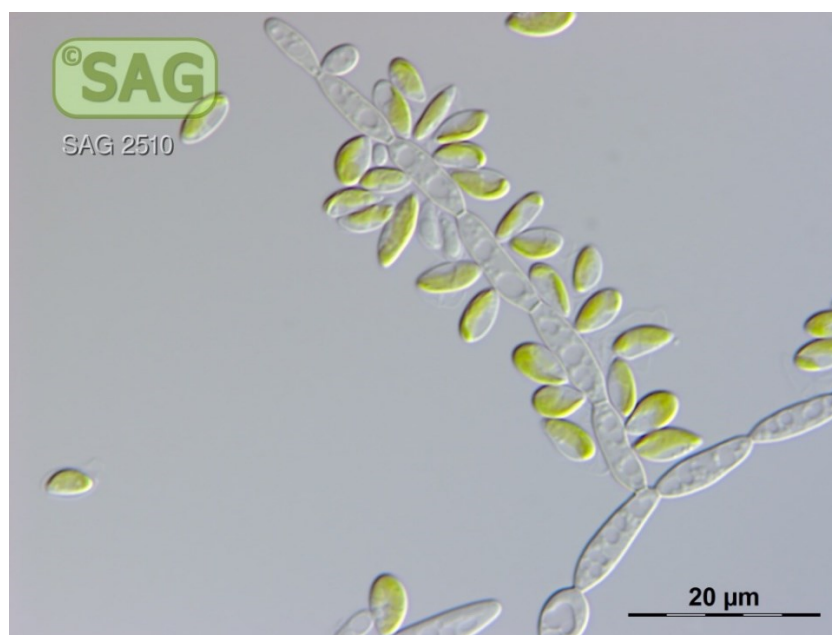




**Imagen 1.** Células de *D. salina* bajo microscopio (T. Darienko, 2018).

Esta especie se considera una de las más importantes a nivel comercial debido a su alta capacidad productiva y los compuestos activos que genera, sobre todo el  $\beta$ -caroteno, por lo que se usa en la acuicultura, en la industria alimenticia y en la cosmética (El-Baz et al., 2019; Kaamoush et al., 2022). También es usada como bioindicador para diferentes contaminantes ambientales, y hay estudios que respaldan su capacidad de tratamiento eficiente de aguas contaminadas por cadmio (El-Baz et al., 2019; Zhu et al., 2019, 2021). Estos antecedentes corroboran su validez para la biorremediación, y la convierten en una buena candidata para investigar la utilidad que tiene para el tratamiento de otros tipos de contaminantes, ya que se sabe que cuenta con mecanismos de defensa de interés y eficientes ante la exposición de metales pesados (Zhu et al., 2019, 2021).

Por otra parte, la otra especie seleccionada es una cepa de *C. onubensis* (ver **imagen 2**), una especie dulceacuícola que pertenece a la división Chlorophyta, autóctona de la provincia de Huelva. (Navarro et al., 2020; Romero Cruz, 2017).



**Imagen 2.** Células de *C. onubensis* bajo microscopio (M. Lorenz, 2016)

En cuanto a la morfología de esta especie, se trata de una microalga unicelular elipsoide de unos 3  $\mu\text{m}$  de longitud, y a diferencia de *D. salina* tiene pared celular. Contiene un único cloroplasto en la mitad de la célula, y en el citoplasma se pueden observar depósitos electrodensos que sirven para acumular metales (Toimil García, 2021).

Rio Tinto se encuentra en la faja pirítica ibérica, por lo que sus aguas son muy ácidas de forma natural, aunque su composición está también influenciada en gran medida por la presencia minera en la zona (Romero Cruz, 2017). Su crecimiento se desarrolla en condiciones limitantes de carbono reducido, debido a la baja presencia de materia orgánica y la baja solubilidad del  $\text{CO}_2$  a pH ácido. Por ello, *C. onubensis* debe vivir a escasos centímetros de la superficie para tener mayor disponibilidad de  $\text{CO}_2$ , lo que supone altas cantidades de irradiación PAR y UV (Romero Cruz, 2017). El entorno presenta altas concentraciones de metales pesados como hierro, cobre, níquel, zinc, cadmio, plomo, manganeso, cromo, arsénico y aluminio, y valores de pH muy bajos entre 1,7 - 3,1 (Bermejo et al., 2018; Romero Cruz, 2017; Vaquero et al., 2012). Estos metales se encuentran en formas químicas solubles debido al bajo pH ambiental. El estrés oxidativo derivado de la presencia de altas concentraciones de dichos elementos genera especies reactivas de oxígeno, y *C. onubensis* cuenta con mecanismos de defensa antioxidantes ante estos (Vaquero et al., 2012). Por todo lo anterior, *C. onubensis* posee unas características idóneas para el presente estudio.

## **1.7. Objetivos del estudio**

Dicho esto, el objetivo de este trabajo ha sido analizar las cinéticas de absorción y la distribución de MeHg en los cultivos de dos especies de microalgas extremófilas como son *C. onubensis* y *D. salina*. Con ello se pretende determinar la capacidad de tolerancia y bioacumulación de estas dos especies ante dicho compuesto.

Para ello, las dos especies se exponen a diferentes concentraciones nanomolares de MeHg y se analiza la distribución de dicho elemento en tres niveles; en el medio líquido, ligado al exterior de la célula y en el interior de la misma. Siguiendo esta estrategia se han tomado muestras a lo largo del tiempo, y se han monitorizado los cultivos para determinar la influencia del MeHg en los parámetros de crecimiento de cada una de las dos especies.

El objetivo de dicha investigación es observar cómo actúan estas dos especies ante diferentes concentraciones de MeHg, si son capaces de tolerarlo y si son capaces de eliminarlo eficientemente del medio. Mediante estas observaciones se determina si dichas especies pueden ser candidatas viables para ser utilizadas como bioindicadores ambientales y en futuras técnicas de biorremediación de aguas contaminadas por MeHg.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Cepas y medios de cultivo**

Las cepas que se han usado para la realización de los experimentos se tratan de cultivos pertenecientes las instalaciones del CIDERTA. *C. onubensis* ACVV1 fue aislada de muestras recogidas en las aguas de Rio Tinto, en la provincia andaluza de Huelva (Fuentes et al., 2016) y *D. salina* CCAP 19/30 fue adquirida de la colección de cepas del instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del CSIC (La Cartuja, Sevilla). Los respectivos medios de cultivo fueron inoculados de manera estéril con inóculos del 5 % de cada especie en Erlenmeyers de 1 L de volumen. Todos los recipientes de vidrio utilizados en los experimentos fueron previamente lavados con 50 % HNO<sub>3</sub>, esterilizados y tapados para evitar cualquier tipo de contaminación.

Para el cultivo de cada una de las dos especies se ha seleccionado el medio más apropiado, para garantizar un crecimiento óptimo y evitar someterlos a cualquier tipo de estrés. En el caso de *C. onubensis* se ha utilizado un medio acuoso K9 (Silverman' & Lundgren, 1959), y para *D. salina* un medio F2 Guillard f/2 en agua del mar (R. L. Guillard & H. Ryther, 1962)

Ambos medios de cultivo se han creado en el laboratorio a partir de diferentes preparados, mezclándolos en distintas proporciones para conseguir las concentraciones deseadas, y ambos carecen de sales de Zn y Cu, para evitar la competencia con el Hg en las zonas de transporte activo de las células, y tampoco tienen Na<sub>2</sub>EDTA para evitar la quelación del Hg (Skrobonja et al., 2019).

### **2.2. Materiales**

Todo material de vidrio usado para la realización de las actividades en el laboratorio es previamente lavado con una solución de 50 % HNO<sub>3</sub> Suprapur® durante 24 h, para eliminar cualquier tipo de impureza que contengan dichos materiales y evitar interferencias en los resultados. Debido a que los análisis son sumamente sensibles con concentraciones de nM, cualquier factor puede influir en los análisis, y por ello es importante evitar cualquier tipo de interferencia. Después de haber dejado el material 24 h en ácido, se deja otras 24 h con agua miliQ para eliminar cualquier rastro de ácido. Por último, se deja secar, y el material ya es apto para su uso en el laboratorio.

Respecto al MeHg, se usa un preparado comercial con una concentración de 1000 ppm (Sigma Aldrich standard solution 1000 ppm MeHg chloride), con una masa molar de 251,08 g/mol. Para la exposición de los cultivos a diferentes concentraciones de dicho compuesto (15, 30 y 80 nM de MeHg), se añade el volumen correspondiente a cada experimento directamente desde el preparado comercial. Debido a su peligrosidad se evita su manipulación para diluciones o cualquier otro tipo de actividad, y todo material contaminado con MeHg se deshecha en contenedores especiales y específicos para dicho compuesto.

## **2.3. Mantenimiento de los cultivos**

La inoculación consiste en agregar el inóculo de gran densidad ( $OD_{750\text{ nm}} \geq 1,0$ ) en un 5 % del volumen total del nuevo medio de cultivo, consiguiendo así un cultivo fresco diluido de baja densidad, que se deja crecer hasta la densidad deseada. Una vez realizada la inoculación, se trasladan los cultivos a la sala de cultivos, que cuenta con una temperatura controlada de 25 °C, condiciones de humedad apropiadas y luz LED para proporcionar la intensidad de luz necesaria ( $100 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ ). Los cultivos se mantienen con aireación y agitación constante mediante un tubo que introduce 1 L/L/min de aire con 1 % de  $\text{CO}_2$  y un electroimán giratorio situado dentro del Erlenmeyer. Aquí se dejan crecer hasta que consiguen la densidad de células deseada de unos 4 - 5 millones de células (Skrobonja et al., 2019). Cada día se saca una muestra de cada cultivo para tomar diferentes medidas (pH, OD, Qy y número de células), para asegurarse de que las microalgas crecen adecuadamente y no existe contaminación biológica (mediante microscopía óptica). Al conseguir la densidad celular deseada, se procede a realizar los experimentos de exposición de MeHg.

Tanto en el periodo de crecimiento de los cultivos como durante la realización de los experimentos se cogen muestras todos los días y se les toma diferentes medidas. Con ello se determina cualquier tipo de influencia en su crecimiento y se realiza un seguimiento temporal de los cambios que se van realizando en ellos, tanto naturalmente como al exponerlos a MeHg. Estas medidas se tratan de la densidad óptica (DO), eficiencia cuántica (Qy) mediante la técnica PAM (pulse amplitude modulated fluorometry), número de células mediante el contador de células Beckman Coulter Multisizer 4e y Neubauer Chamber, pH y microscopía óptica.

## **2.4. Medidas tomadas**

### **2.4.1. Densidad óptica**

La medición de la densidad óptica se realiza utilizando el espectrofotómetro Evolution 201 UV-VIS Spectrophotometer, Thermo Scientific, que mide la cantidad de luz absorbida o transmitida por una muestra en diferentes longitudes de onda. En el caso de las microalgas, las mediciones de densidad óptica se realizan en el rango de longitud de onda visible, que abarca aproximadamente desde 400 a 700 nm. Las microalgas suelen absorber la luz en este rango para llevar a cabo la fotosíntesis, y en este caso las medidas se han tomado a 3 longitudes de onda distintas; a 530 nm para determinar la cantidad de carotenoides, a 680 nm la clorofila y a 750 nm el total de biomasa.

Se basa en el principio de Lambert-Beer el cual establece una relación matemática entre la absorbancia de una muestra, la concentración de una sustancia absorbente y la longitud del camino óptico de la luz a través de la muestra. Cuando la luz pasa a través de una solución, parte de ella es absorbida por la sustancia presente en la

solución, cuanto mayor sea la concentración de la sustancia absorbente, mayor será la cantidad de luz absorbida.

Para llevar a cabo la medición de densidad óptica, se prepara una suspensión de microalgas en un medio de cultivo, y se coloca en una celda de cuarzo o plástico transparente que se introduce en el espectrofotómetro. Se registra la absorbancia o transmitancia de la muestra a diferentes longitudes de onda, y se compara con una muestra de referencia con una concentración conocida.

A partir de las mediciones de densidad óptica, se pueden obtener datos cuantitativos sobre la concentración de células microalgales en la suspensión, lo que sirve para monitorear el crecimiento del cultivo y su respuesta ante la exposición a MeHg.

#### 2.4.2. Eficiencia cuántica

La medida de eficiencia cuántica o  $Q_y$  sirve para determinar la eficiencia con la que los pigmentos fotosintéticos convierten la energía de la luz en energía química, en este caso en biomasa, determinando el número de fotones absorbidos por las microalgas. La eficiencia cuántica se mide mediante la técnica de fluorimetría de Modulación de Amplitud de Pulso o Pulse Amplitude Modulation (PAM), que mide la fluorescencia emitida por la microalga al exponerla a un breve haz de luz. Para ello se usa el modelo Aquapen AP100 (PSI Photosystem Instruments, Czech Republic).

Para determinar la eficiencia cuántica se utiliza la siguiente fórmula (Gojkovic et al., 2014):

$$Q_y = (F_m - F_0) / F_m$$

Se miden el nivel de fluorescencia cero ( $F_0$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) al ser expuesta a un haz de luz saturante.  $F_m$  es el máximo de fluorescencia emitida por la microalga cuando todos los centros de reacción del fotosistema II (PSII) están cerrados, y representa el total de la luz absorbida que está disponible para la fotosíntesis. Para asegurarse de que todos los centros de reacción están cerrados, las muestras se dejan en total oscuridad durante los 15 minutos previos a la medición.

Mediante  $Q_y$  se estima la proporción de la luz absorbida que es usada en la fotosíntesis, y en conjunto con las medidas de densidad óptica sirve para hacerse una idea sobre si el crecimiento del cultivo es correcto o está sufriendo algún tipo de estrés que inhiba la actividad fotosintética, y también sirve para reflejar la reacción de las microalgas ante la presencia de MeHg.

#### 2.4.3. Número de células (en $\text{ml}^{-1}$ usando el contador de células)

Para contar las células de la muestra con gran exactitud, se usó el modelo Beckman Coulter Multisizer 4e. Dicho aparato es un contador de partículas y células basado en el principio de impedancia eléctrica. Su funcionamiento se basa en la medición de los cambios de resistencia eléctrica generados cuando las partículas o células pasan por

una apertura en el sensor. A continuación, se describe el funcionamiento del Beckman Coulter Multisizer 4e en detalle:

- Preparación de la muestra: La muestra de partículas o células se prepara en una suspensión adecuada. Se puede utilizar un diluyente o un tampón específico para garantizar la correcta disgregación de las partículas y evitar obstrucciones en el sensor.
- Ingreso de la muestra: La suspensión de muestra se introduce en el sistema del Multisizer 4e a través de una sonda. La muestra fluye a través de un canal de flujo hacia el sensor.
- Medición de impedancia: El sensor del Multisizer 4e consta de un orificio de flujo y dos electrodos en los lados opuestos del orificio. Cuando las partículas o células pasan a través del orificio, crean una interrupción en el flujo eléctrico, lo que genera cambios en la resistencia eléctrica.
- Registro y análisis de los datos: Los cambios en la resistencia eléctrica se registran y se utilizan para determinar el tamaño y la concentración de las partículas o células presentes en la muestra. El Multisizer 4e utiliza algoritmos específicos para analizar y clasificar los datos de acuerdo con su tamaño.
- Generación de resultados: Los resultados del análisis se presentan en la interfaz del Multisizer 4e. Esto incluye información como el número total de partículas o células, su distribución de tamaño, la concentración y otros parámetros relevantes.

#### 2.4.4. Número de células (en $\text{ml}^{-1}$ usando la cámara de Neubauer)

La cámara de recuento de células de Neubauer es una técnica de laboratorio ampliamente utilizada para la estimación de la concentración de células en suspensiones microalgales. Esta técnica se basa en la microscopía y permite contar y calcular la densidad celular en una muestra de manera precisa y cuantitativa.

La cámara de Neubauer o Neubauer Chamber consiste en una placa de vidrio delgada con una cuadrícula grabada en su superficie y dos cámaras de conteo. Cada cámara de conteo tiene un área conocida y está dividida en varias áreas más pequeñas por las líneas de la cuadrícula. La cuadrícula está diseñada para tener un espesor de 0,1 mm y está compuesta por líneas y áreas cuadradas. La cámara tiene un volumen de 0,1  $\mu\text{l}$  y permite la observación de las células en el plano focal. La fórmula para calcular la densidad de células a partir del conteo en la cámara de Neubauer es la siguiente:

$$N = 0,25 \cdot 10^4 \cdot (\sum Ni) \cdot D$$

El resultado se expresa en  $10^6$  células por ml,  $\sum Ni$  es la suma total de las células contadas en la cámara de Neubauer y D es la dilución aplicada (Gojkovic et al., 2014).

#### 2.4.5. Medición del pH y la microscopía óptica

Por último, cada día se toman medidas de pH mediante un pH metro para controlar que sea el adecuado para cada especie, y se corrige si es necesario. También se toman muestras para analizarlas con microscopía óptica, para asegurarse de que los cultivos no han sufrido ningún tipo de contaminación biológica.

### 2.5. Análisis de las muestras

A parte de las medidas tomadas diariamente, también se realizaron otros tipos de análisis a las muestras tomadas de los distintos experimentos de exposición a MeHg.

#### 2.5.1. Actividad de SOD

Los cultivos expuestos a la concentración más alta de 80 nM de MeHg se analizaron mediante la técnica medición de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta es una técnica utilizada para medir la actividad de la enzima superóxido dismutasa, que es una enzima antioxidante presente en las células de las microalgas, así como en otros organismos, que juega un papel importante en la protección celular contra el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas. Las ROS, como el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), son moléculas altamente reactivas que pueden causar daños a nivel celular, provocando la oxidación de biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La SOD es una enzima clave en el sistema antioxidante de las células, ya que cataliza la dismutación del superóxido en especies menos tóxicas, como el peróxido de hidrógeno y el oxígeno molecular.

La técnica de SOD se utiliza para medir la actividad de SOD en las microalgas, como un indicador de la capacidad de las células para neutralizar el estrés oxidativo. La actividad de la enzima se mide mediante ensayos enzimáticos que implican la medición de la velocidad de dismutación del superóxido o midiendo la inhibición de la reducción de un compuesto químico específico. Mediante estos ensayos se evalúan los efectos de diferentes factores de estrés, en este caso la exposición a MeHg, en la capacidad antioxidante de las microalgas.

Esta medida es importante para entender la respuesta antioxidante de estas células frente a condiciones de estrés oxidativo, así como para evaluar la efectividad de los mecanismos de defensa antioxidante en las microalgas y su implicación en la fisiología y biología celular de estos microorganismos (Bowler et al., 1992; D. Guy et al., 1993; Del Río et al., 2006; Halliwell, 2006; McCord & Fridovich, 1969).

## 2.5.2. ICP-MS

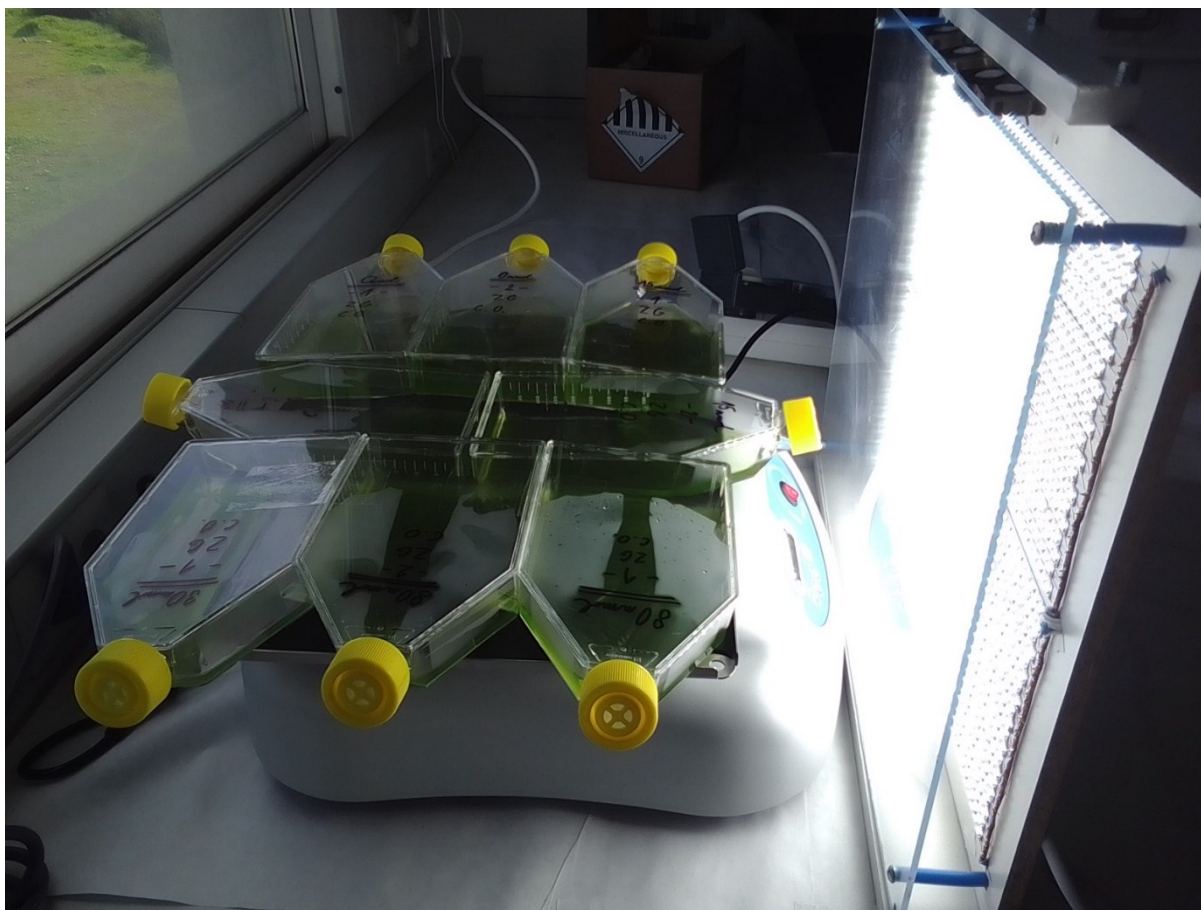
Por otra parte, todas las muestras conseguidas de cada uno de los experimentos de exposición de los cultivos ante diferentes concentraciones de MeHg se han analizado mediante la técnica de ICP-MS por los servicios centrales del Laboratorio de Investigación y Control Agroalimentario (LICAH) de la Universidad de Huelva. Esta técnica determina la concentración de MeHg en el medio, en el fluido de lavado y en la biomasa para cada uno de los experimentos, dando una idea sobre la estrategia de cada especie ante la exposición de este compuesto. La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica analítica ampliamente utilizada para el análisis de metales pesados en una gran variedad de muestras, incluyendo el ámbito de las microalgas. Esta técnica permite la determinación cuantitativa de la concentración de metales pesados en muestras con alta sensibilidad y precisión.

## 2.6. Metodología experimental

Una vez alcanzada la densidad deseada con un número de células de entre 4 y 5 millones de células por ml para cada especie de microalga, se procede a la realización de los experimentos de exposición de metilmercurio (MeHg). Para cada especie, se establecen tres niveles de exposición de MeHg y dos niveles adicionales de control, uno sin MeHg para el control biótico y otro abiótico (solo medio de cultivo con el nivel más alto de MeHg). Los niveles de exposición de MeHg fueron de 15, 30 y 80 nM. El control biótico se utiliza para conocer las tasas de crecimiento de las microalgas sin MeHg, y no deberían contener ninguna cantidad detectable de este compuesto. El control abiótico se utiliza para observar la degradación del MeHg, lo que es necesario para una correcta interpretación de los resultados globales.

Para llevar a cabo los experimentos, se realizan dos réplicas por cada especie para cada nivel de exposición, obteniendo cuatro réplicas totales por nivel de exposición. Se extraen 125 ml del cultivo puro por cada réplica, las cuales se colocan en frascos de cultivo de poliestireno (PS), con 125 ml de volumen del cultivo y una superficie iluminada de 175 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Germany). A estos frascos se les añade la concentración correspondiente de MeHg y se colocan en el área de montaje experimental (ver **Imagen 3**). Esta cuenta con un agitador orbital (Agitador Orbital PSU 20i - Bonsai Lab, España) a 115 rpm y un panel LED de luz blanca de 650  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (elaboración propia de Z. Gojkovic) con encendido y apagado programado, para proporcionar un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.





**Imagen 3.** Montaje experimental para los experimentos de exposición.

Se toman muestras cada día durante 72 h con el fotoperiodo mencionado anteriormente para su posterior tratamiento y análisis, haciendo un total de 4 tomas de muestra por cada réplica; T<sub>0</sub>, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub> y T<sub>72</sub>. Se repite el mismo procedimiento para todos los niveles de exposición, con un total de 16 réplicas repartidas en 3 experimentos de exposición y 2 de control.

Por cada toma de muestra se analiza la distribución del MeHg a tres diferentes niveles; El MeHg que se queda en el medio, el que se queda ligado al exterior de la célula y el que entra al interior de la célula. Para ello las muestras se someten a distintos tratamientos para separar dichas fases, y después de ser tratadas se obtienen las muestras finales que se analizan mediante ICP-MS, es decir, de cada toma de muestra se sacan un total de 3 muestras finales para su posterior análisis.

El tratamiento de las muestras ha sido el siguiente: se extraen muestras de 30 ml de forma estéril y se toman las respectivas medidas de OD, Qy y número de células. Después se procede a separar la biomasa del medio mediante centrifugación, durante 5 minutos a 4400 rpm, quedando separado el medio de la biomasa. El medio líquido se pasa a otro tubo que se sella con Parafilm, para asegurarse de que no se pierda nada de la muestra. Se escribe en el mismo tubo la información correspondiente a la muestra tomada, se acidifica con 2 % v/v de HCl y 2 % v/v HNO<sub>3</sub> para estabilizar el MeHg en la muestra, y finalmente se deja en una nevera a 4 °C, para evitar cualquier

tipo de degradación hasta la realización del análisis mediante ICP-MS. Esta será la muestra que indique la cantidad de MeHg que ha quedado en el medio. Después, se añaden 6 ml de agua miliQ + 20 mM de Na<sub>2</sub>EDTA al tubo que contiene la biomasa, y se mezcla con el Vortex durante 5 minutos. Finalmente, dicho tubo se centrifuga y se vuelve a separar la biomasa de la fase líquida. Al añadir este medio líquido con Na<sub>2</sub>EDTA se consigue separar el MeHg que ha quedado adherido en el exterior de las células, separando por una parte la biomasa, que servirá para analizar el MeHg intracelular, y por otro lado el medio líquido de lavado, que contendrá el MeHg que ha quedado adherido al exterior de la célula. Con esto se consiguen las tres fases que se necesitan para el análisis de la distribución del MeHg, y cada una de estas dos muestras finales se conserva de la misma manera que la primera, es decir, se sella, se apunta la información correspondiente, y se almacena en un frigorífico hasta su análisis mediante ICP-MS.

Dicho procedimiento se repite con todas las tomas de muestra, haciendo un total de 160 muestras para el análisis final mediante ICP-MS; A cada especie se le expone a tres diferentes niveles de MeHg, y en cada nivel se hacen 2 réplicas, es decir, 6 réplicas por especie, lo que hace un total de 12 réplicas. También se hace un experimento de control sin MeHg para cada especie, con 2 réplicas para cada una, es decir, un total de 4 réplicas más, y por último el control abiótico que no tiene réplica, es decir, solo MeHg con la concentración más alta de 80 nM. En total se han hecho 17 réplicas;

- De las 12 réplicas de exposición se han hecho 4 tomas de muestras a lo largo del tiempo, es decir, un total de 48 tomas. De cada una de estas 48 tomas se han sacado 3 muestras finales, es decir, un total de 144 muestras finales para el análisis de ICP-MS
- Del control abiótico no se han hecho réplicas, por lo que ha habido una única réplica de la que se han tomado 4 muestras a lo largo del tiempo, que han sido las propias muestras finales ya que no hay biomasa. En total se han sacado 4 muestras finales para el análisis mediante ICP-MS
- Finalmente, del control positivo se han hecho 4 réplicas que no han sido analizadas durante el tiempo, es decir, cada una ha tenido una única toma de muestras. Estas 4 tomas de muestra sí que han sido tratadas y de cada una de ellas se han sacado 3 muestras finales. Se han conseguido un total de 12 muestras finales para el análisis mediante ICP-MS

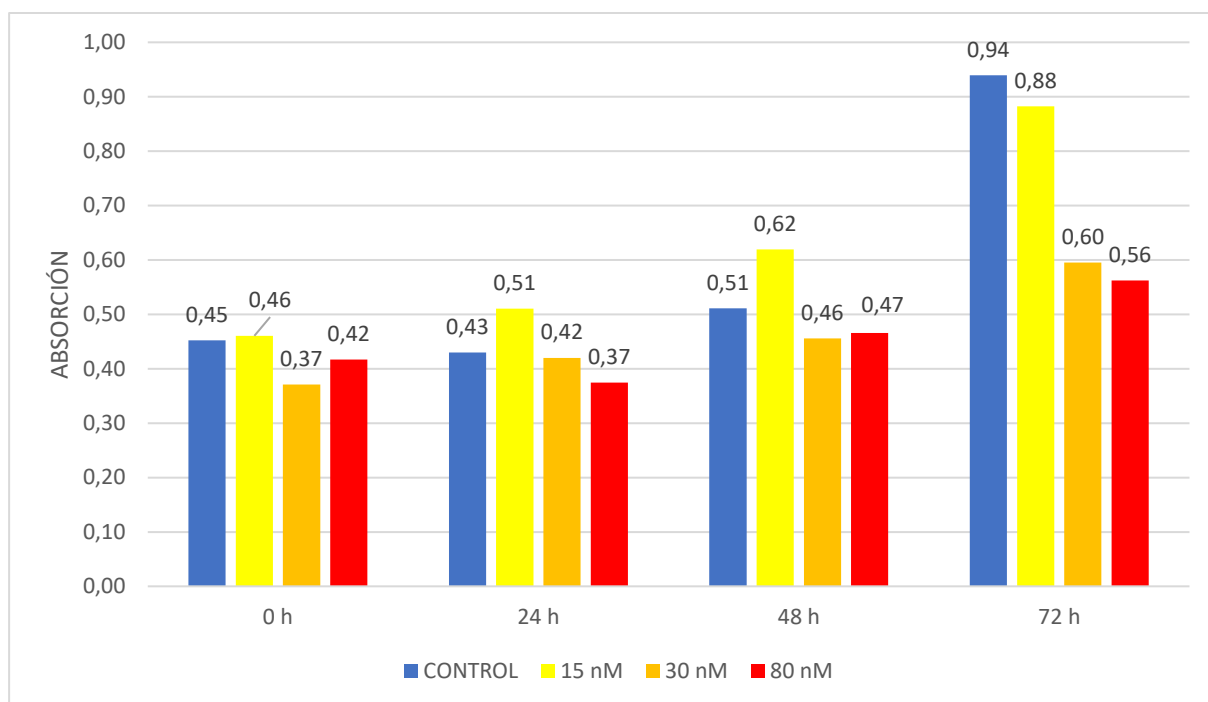
Esto suma un total de 160 muestras totales para el análisis final. Dichas muestras finales han seguido el procedimiento explicado anteriormente para ser analizadas mediante ICP-MS.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Densidad óptica

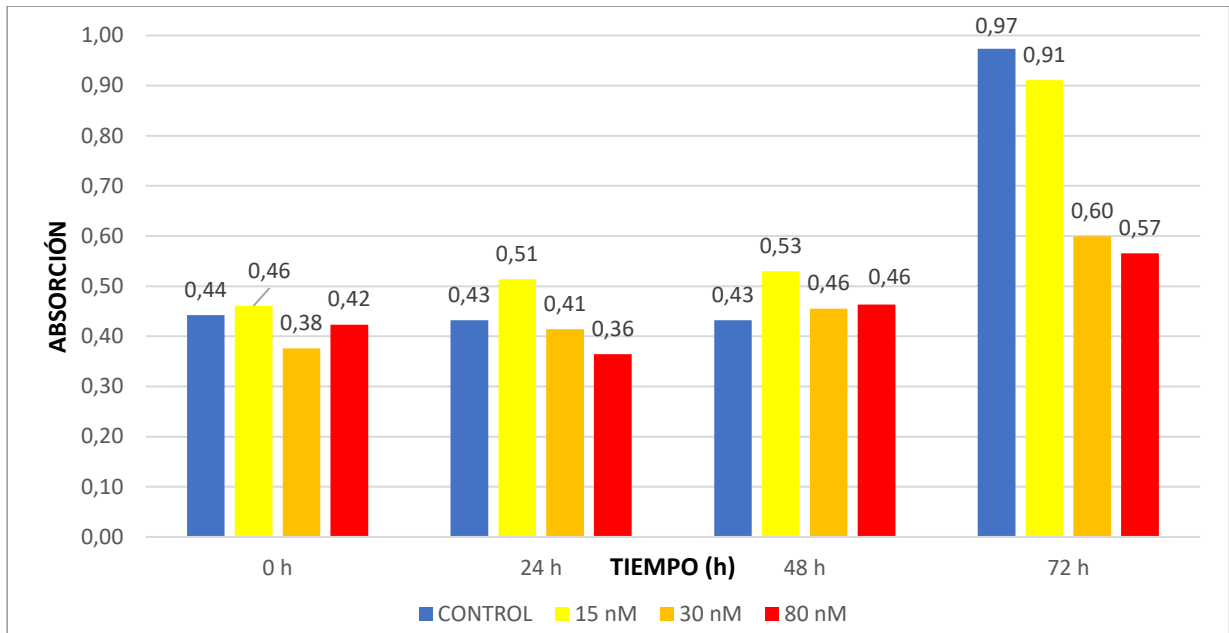
La densidad óptica se ha medido en tres longitudes de onda distintas, y cada una de ellas proporciona información sobre distintos elementos de la biomasa; a 530 nm para determinar la concentración de carotenoides, a 680 nm la clorofila y a 750 nm el total de biomasa. Los resultados de 530 y 680 nm se han representado en un solo gráfico para cada uno, y los de 750 nm en varios gráficos, uno por nivel de exposición.

#### 3.1.1. Resultados de densidad óptica de *C. onubensis*



**Figura 1.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 530 nm de *C. onubensis*.

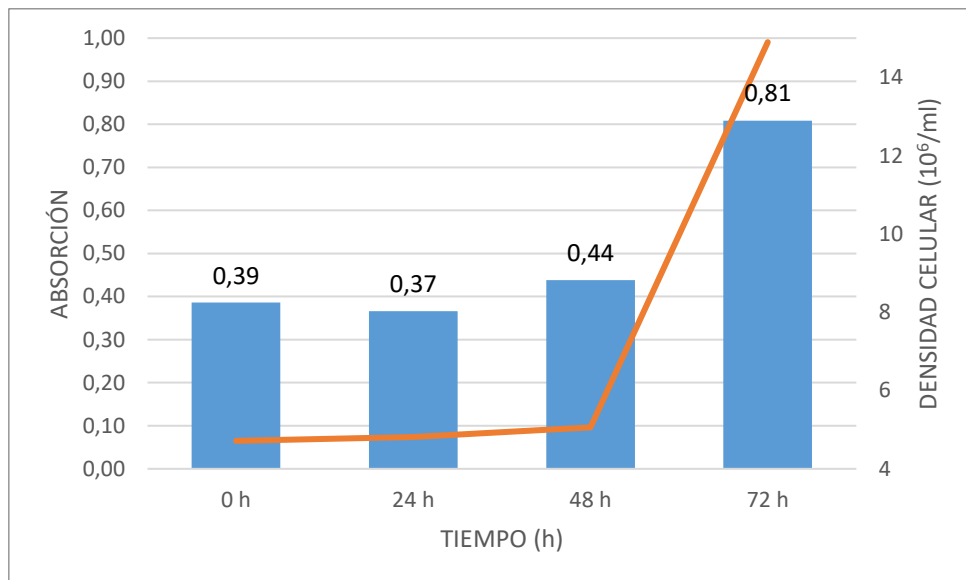
En los resultados para los 530 nm (ver Figura 1), en los 4 niveles los valores han ido aumentando a lo largo de las 72 h, menos en las primeras 24 h de 80 nM de exposición que disminuye ligeramente, siendo el control el que muestra el valor máximo de 0,94. El mayor crecimiento se da durante la última etapa en todos los casos, en los que los valores aumentan significativamente. A las 72 h se observan valores menores cuanto mayor es la concentración de MeHg. En las demás etapas la concentración de 15 nM es la que muestra los valores más altos, por encima del control. En las concentraciones de 30 y 80 nM no se observa ningún patrón de comportamiento concreto, pero sus valores son inferiores que el resto durante las 72 h.



**Figura 2.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 680 nm de *C. onubensis*.

En las medidas tomadas a 680 nm (ver Figura 2) vuelven a repetirse los mismos patrones observados a 530 nm.

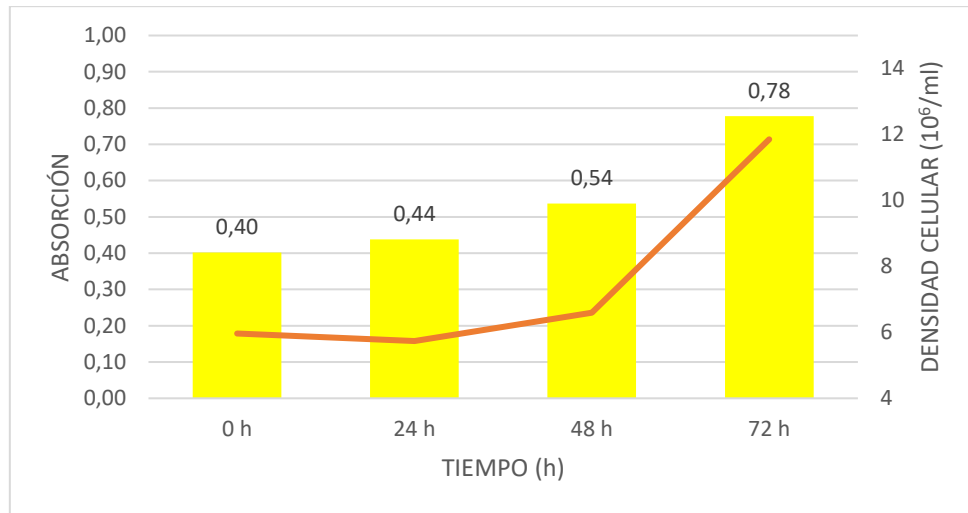
Las medidas de densidad óptica a 750 nm reflejan la totalidad de la biomasa, y está relacionado con el número de células, por ello en los gráficos se ha añadido la evolución del número de células a lo largo del tiempo en conjunto con estas medidas.



**Figura 3.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 750 nm de *C. onubensis* (control sin MeHg).

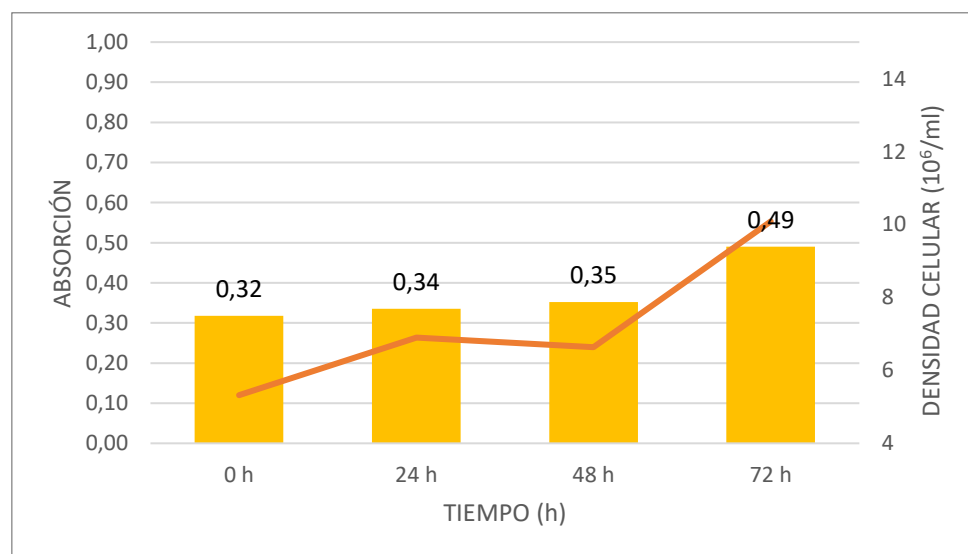
En el caso del control de *C. onubensis* (ver Figura 3), durante las primeras 24 h el valor de OD baja ligeramente de 0,39 a 0,37, pero se podría decir que prácticamente se mantiene constante, ya que la diferencia es tan pequeña que puede deberse a variaciones de la propia técnica de medición. En este mismo periodo, el número de

células aumenta ligeramente, prácticamente se mantiene constante. A las 48 h el valor de OD aumenta hasta 0,44, al igual que el número de células, y finalmente a las 72 h ambos valores aumentan significativamente, llegando al valor máximo de 0,81. Este valor es el más alto de todos los experimentos realizados.



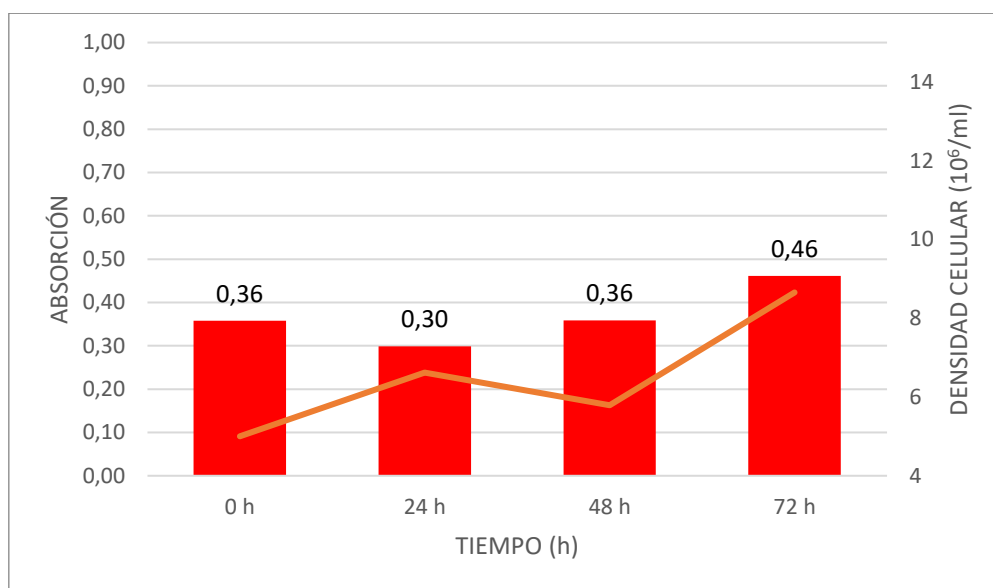
**Figura 4.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 750 nm de *C. onubensis* (con 15 nM de MeHg).

Respecto al nivel de exposición de 15 nM (ver Figura 4), el valor de DO inicial es de 0,40, el cual aumenta progresivamente durante las 72 h del experimento. En las primeras 24 h aumenta a 0,44, mientras que el número de células desciende ligeramente. A las 48 h ambos valores aumentan, alcanzando un valor de 0,54, y por último se observa la mayor subida a las 72 h, llegando a 0,78. El valor máximo tanto de DO como el del número de células son inferiores que en el experimento de control, y la mayor tasa de crecimiento en este caso también se observa en el último tramo, desde las 48 hasta las 72 h.



**Figura 5.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 750 nm de *C. onubensis* (con 30 nM de MeHg).

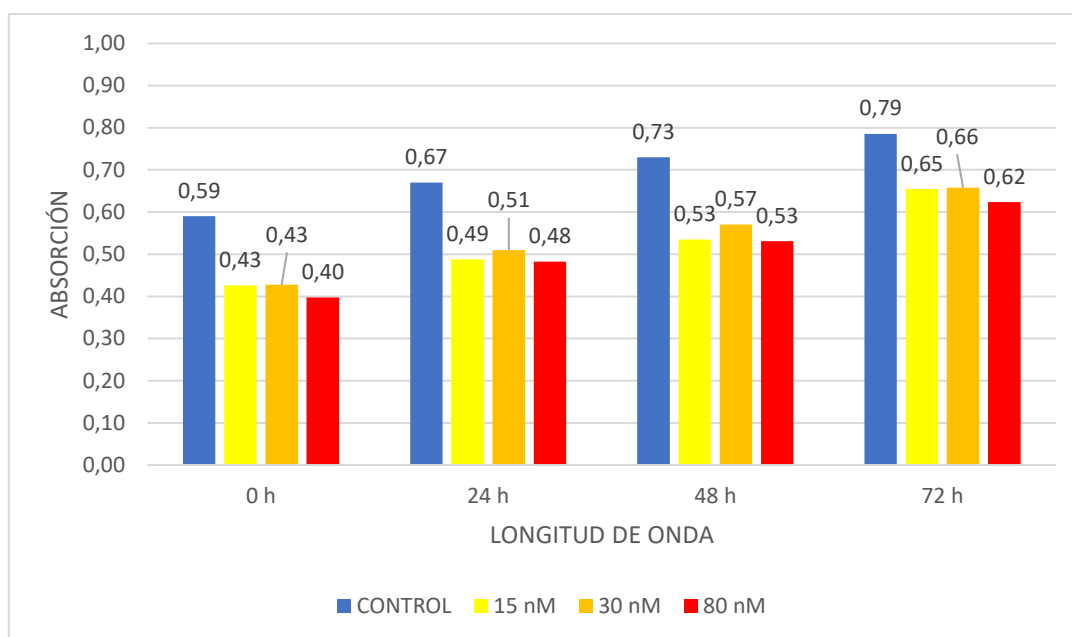
En el nivel de exposición de 30 nM (ver Figura 5) el valor inicial es de 0,32, el cual aumenta ligeramente a las 24 h, y vuelve a aumentar ligeramente de nuevo a las 48 h, pero esta variación es tan pequeña que se puede considerar que el valor se mantiene prácticamente constante durante estas primeras 48 h. A las 72 h se observa un aumento significativo, llegando a 0,49. Dicho valor es significativamente inferior a los valores observados en los experimentos anteriores. En este caso el mayor crecimiento se ha vuelto a dar en el último periodo del experimento, pero llegando a un máximo bastante menor. El comportamiento del número de células es parecido al del DO, pero en las primeras 24 h su aumento es algo mayor en comparación con el DO, que aumenta, pero no mucho.



**Figura 6.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica (OD) a 750 nm de *C. onubensis* (Con 80 nM de MeHg).

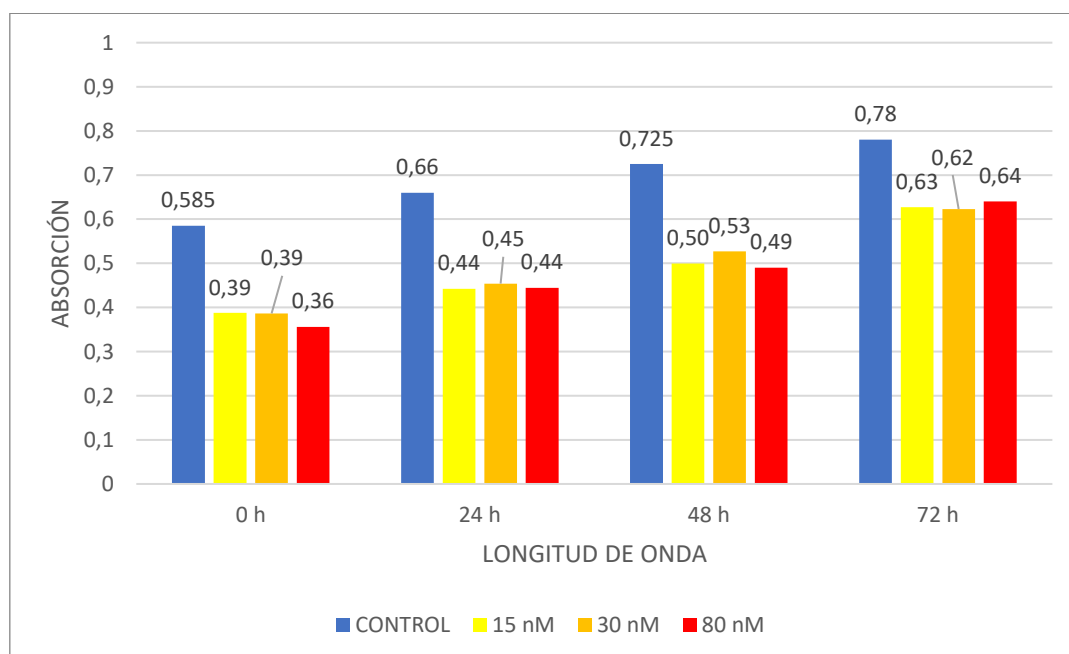
El valor inicial en el nivel de exposición más alto de 80 nM (ver Figura 6) es de 0,36, el cual disminuye hasta 0,30 tras 24 h para de nuevo aumentar hasta 0,36 tras 48 h. Los valores del número de células en este intervalo no corresponden a los cambios de OD, por lo que puede que se haya cometido algún error al tomar las medidas ya que deberían corresponder más o menos. Por último, tras 72 h el valor aumenta hasta 0,46, el menor pico de todos los experimentos con *C. onubensis*.

### 3.1.2. Resultados de densidad óptica de *D. salina*



**Figura 7.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 530 nm de *D. salina*

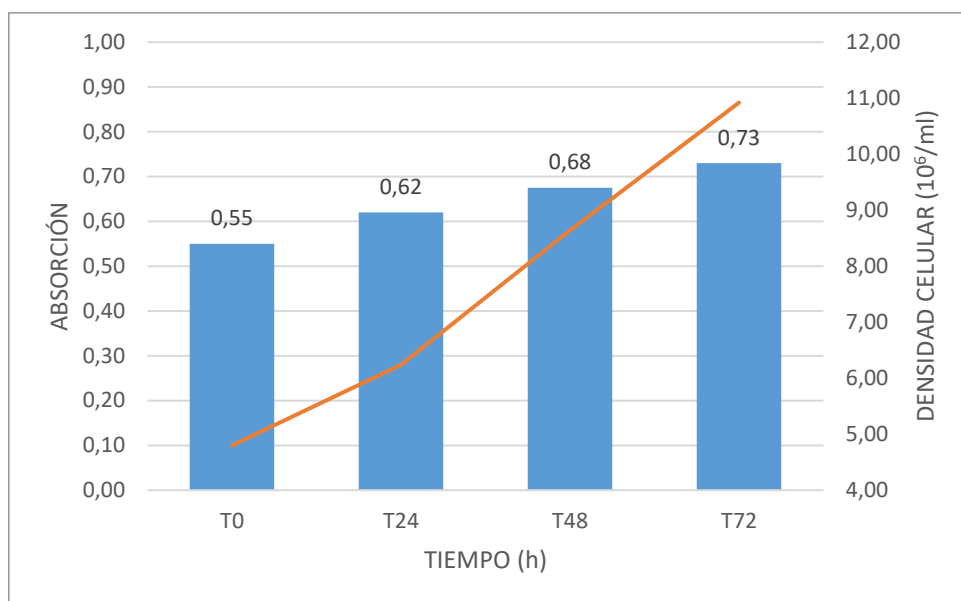
Las mediciones de OD a 530 nm para *D. salina* muestran un aumento a lo largo del tiempo en los 4 niveles analizados (ver Figura 7). En los 4 periodos el nivel más alto se consigue en el control, el cual alcanza el máximo de 0,79 a las 72 h. En las 4 etapas temporales el segundo valor más alto es el de 30 nM de MeHg, seguido por el de 15 nM y por último el más bajo es el de 80 nM en todos los casos.



**Figura 8.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 680 nm de *D. salina*

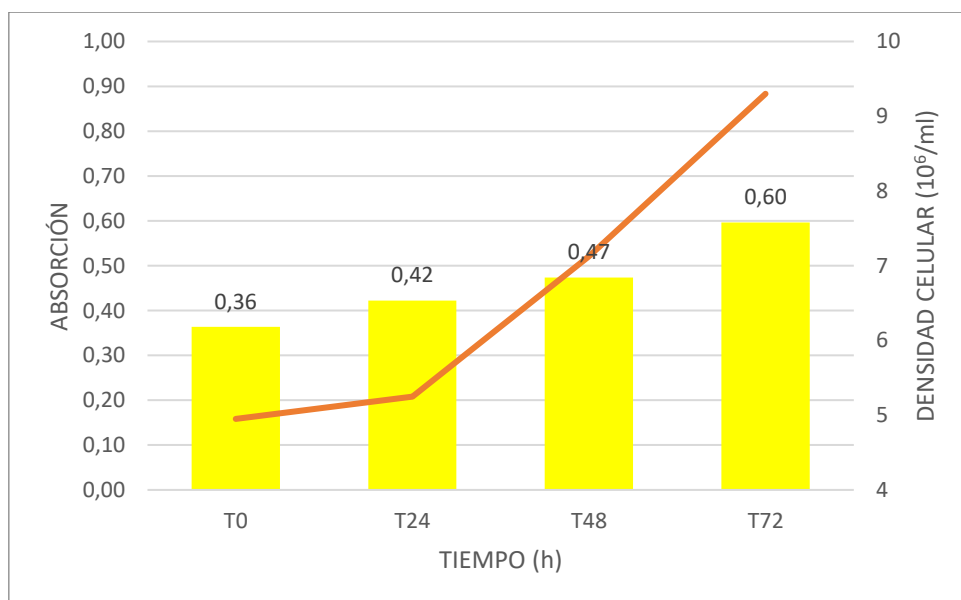
A 680 nm (ver Figura 8) se han observado los mismos patrones que a 530 nm, excepto en el caso de las concentraciones máximas a las 72 h, en la que a los 80 nM de MeHg

tiene el valor más alto (0,64) después del de control (0,78). El siguiente valor más alto se observa en el nivel de 15 nM y por último en el de 30 nM.



**Figura 9.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 750 nm de *D. salina* (control sin Hg).

Como se puede observar en la Figura 9, la densidad óptica en el control de *D. salina* a 750 nm aumenta progresivamente a lo largo del tiempo. El valor inicial es de 0.55, siendo este el más bajo, y el máximo se consigue a las 72 h (0.73). Dicho máximo es el mayor de todos los experimentos de densidad óptica realizados con *D. salina*. El número de células tiene la misma tendencia que la densidad óptica.

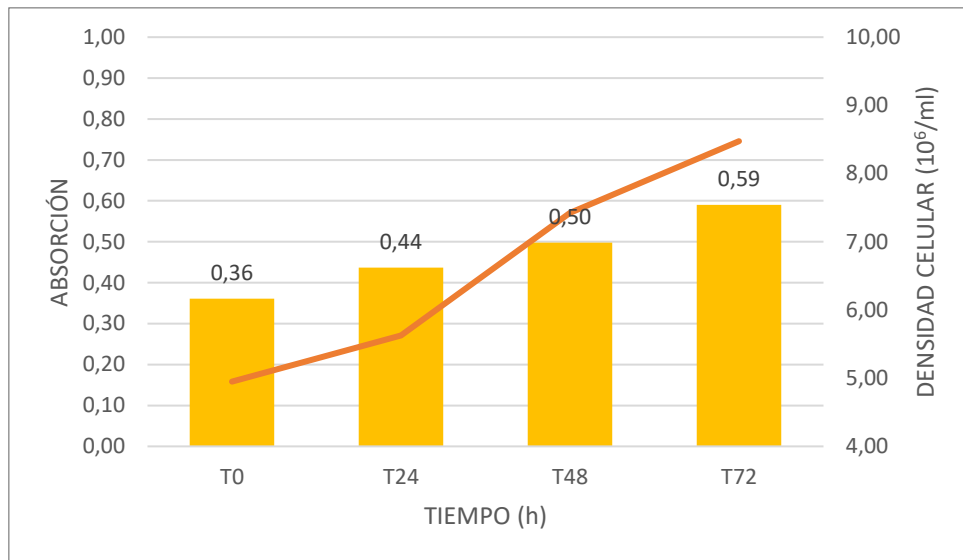


**Figura 10.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 750 nm de *D. salina* (con 15 nM de MeHg).

Las mediciones de DO a 750 nm a 15 nM de MeHg (ver Figura 10) muestran un aumento del valor a lo largo del tiempo. El valor inicial es de 0,36, que a las 24 h

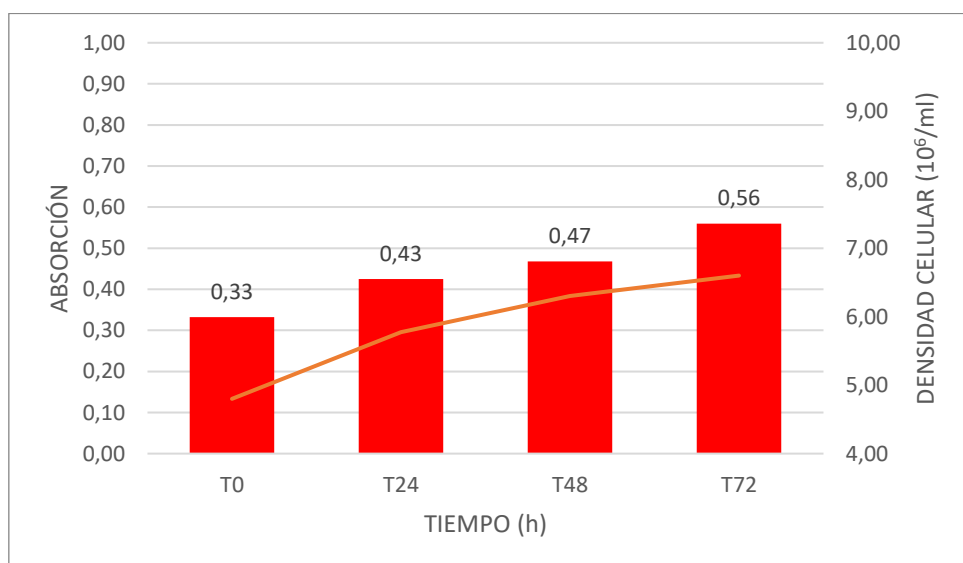


aumenta a 0,42, a las 48 h a 0,47 y finalmente a las 72 h alcanza el máximo de 0,60. El número de células también ha tenido un aumento progresivo durante el tiempo.



**Figura 11.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 750 nm de *D. salina* (con 30 nM de MeHg).

En el nivel de exposición de 30 nM (ver Figura 11) sucede lo mismo que en el caso anterior, siendo el valor inicial de 0,36, que aumenta hasta 0,44 a las 24 h, después a 0,50 a las 48 h y finalmente alcanza el máximo de 0,59 a las 72 h. Los valores a las 24 y 48 h son ligeramente superiores que los observados a 15 nM de MeHg, pero el valor final es ligeramente inferior. El número de células también muestra un aumento a lo largo del tiempo, y los valores a 24 y 48 h también son algo mayores que los observados en el caso anterior, aunque el máximo que alcanza es significativamente menor, lo cual muestra una relación entre el número de células y el OD.



**Figura 12.** Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica a 750 nm de *D. salina* (con 80 nM de MeHg).

Por último, a 80 nM de MeHg (ver Figura 12) los patrones son los mismos, aunque en este caso los valores son inferiores que en los dos casos anteriores en todas las horas. El valor inicial es de 0,33, que aumenta hasta 0,42 a las 24 h, después hasta 0,47 a las 48 h y finalmente alcanza el máximo de 0,56 a las 72 h. Los valores de número de células muestran un aumento a lo largo del tiempo, y son menores que los dos casos anteriores en todas las etapas, siendo su valor máximo el menor de todos los niveles de exposición.

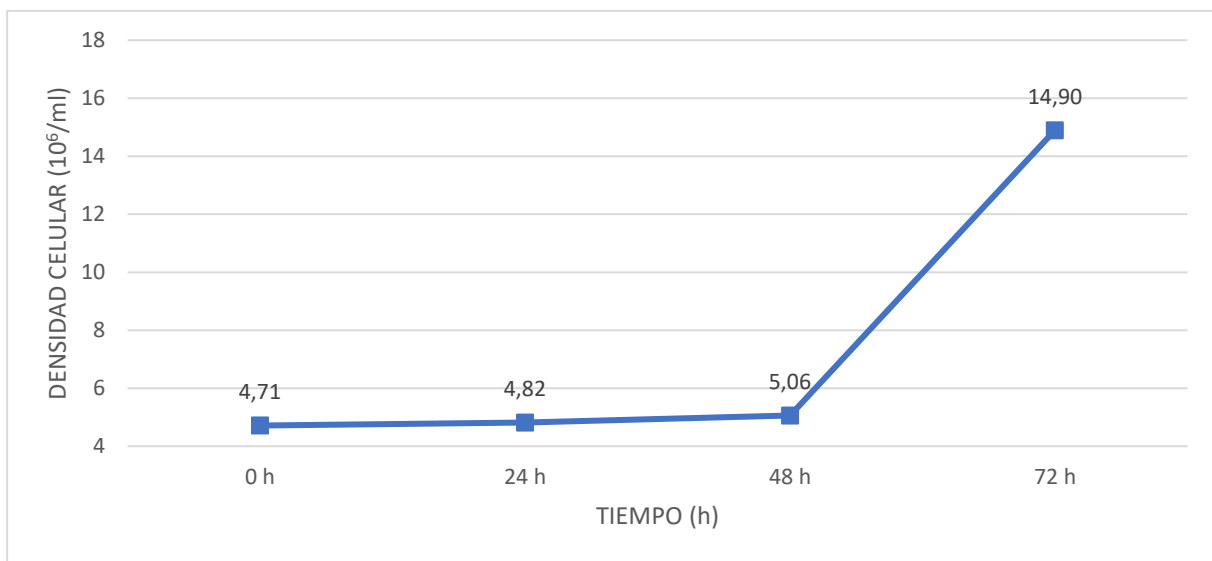
### 3.1.3. Conclusiones sobre la densidad óptica

Respecto a los resultados de 530 nm de *C. onubensis*, a las 72 h se aprecian claras diferencias entre los distintos niveles de exposición, el valor disminuye cuanto mayor es la concentración de MeHg aplicada. A 15 nM el valor se ve ligeramente reducido en comparación con el control, pero a 30 y 80 nM los valores reducen significativamente. Con los resultados de 680 y 750 nm de *C. onubensis* sucede exactamente lo mismo que en el caso anterior, dicho esto, se concluye a que la presencia de MeHg afecta tanto al crecimiento de los carotenoides como a las clorofilas y a la totalidad de la biomasa a todos los niveles de exposición, siendo este efecto relativamente ligero a los 15 nM y aumentando significativamente a partir de los 30 nM.

En cuanto a los resultados de *D. salina* a 530 nm, se observa una disminución del valor en las muestras que contienen MeHg respecto al control. Dicha disminución muestra valores similares a todos los niveles, por lo que una mayor concentración de MeHg no afecta en mayor medida a la densidad óptica de *D. salina*. En los resultados de 680 y 750 nm sucede lo mismo, con la excepción de las muestras con 80 nM a 750 nm, en la que se observa una disminución ligeramente mayor. Dicho esto, se concluye que la presencia de MeHg influye en el crecimiento de los carotenoides, clorofilas y la totalidad de la biomasa en todos los casos, pero esto sucede independientemente de la concentración aplicada.

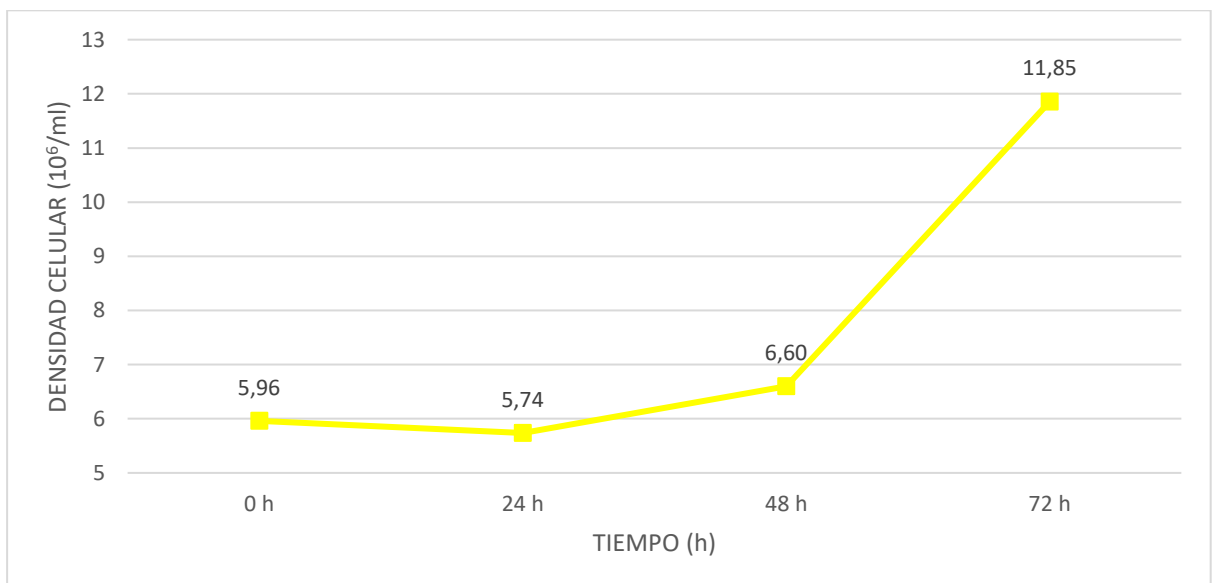
## 3.2. Número de células

### 3.2.1. Resultados de crecimiento de *C. onubensis*



**Figura 13.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) del control de *C. onubensis*.

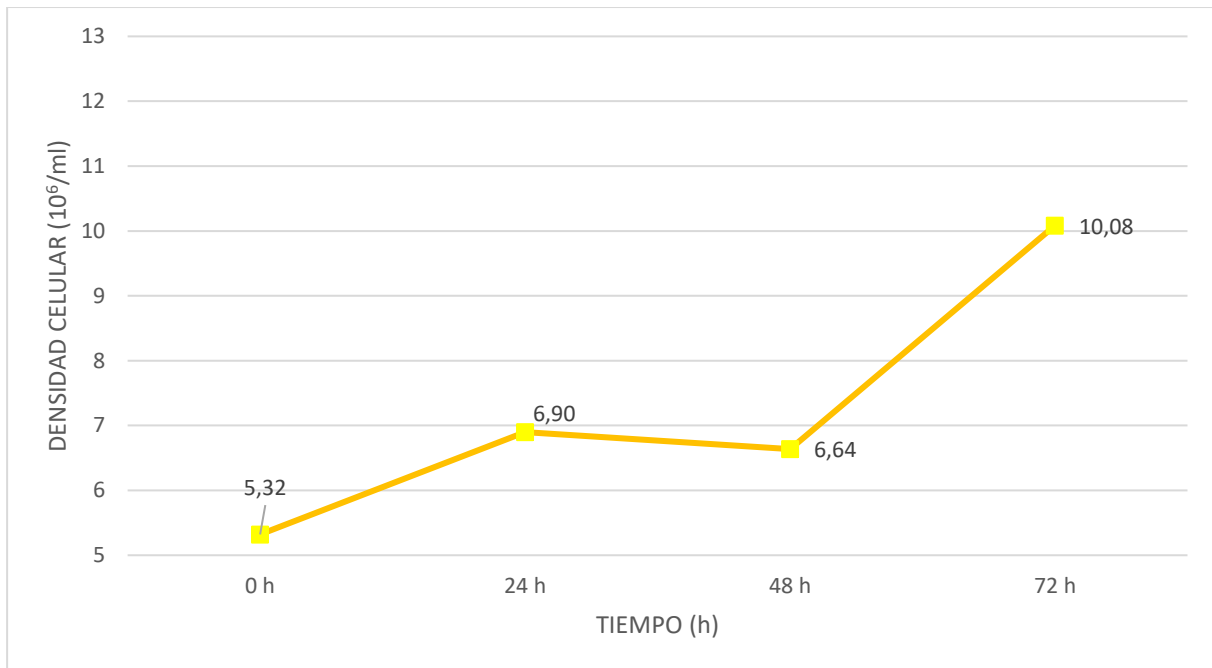
En el cultivo de control de *C. onubensis* se puede observar el crecimiento típico de los microorganismos fotosintéticos, donde durante las primeras 48 h se observa un crecimiento ligero, que se corresponde con la fase LAG, para después adquirir un crecimiento exponencial, llegando a tener algo más del doble de células durante las 24 h finales (ver Figura 13). El máximo observado es de 14,9 millones de células, teniendo el mayor número de células y la mayor tasa de crecimiento de los experimentos con *C. onubensis*.



**Figura 14.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *C. onubensis* con 15 nM de MeHg.

*C. onubensis* en el nivel de exposición de 15 nM tiene una concentración de 5,9 millones de células, la cual disminuye ligeramente a las 24 h hasta los 5,7 millones (ver Figura 14). En los dos días posteriores se observa un crecimiento gradual, llegando a 6,6 millones de células en las 48 h posteriores al inicio del experimento, y que continúa creciendo exponencialmente llegando hasta los 11,8 millones a las 72 h.

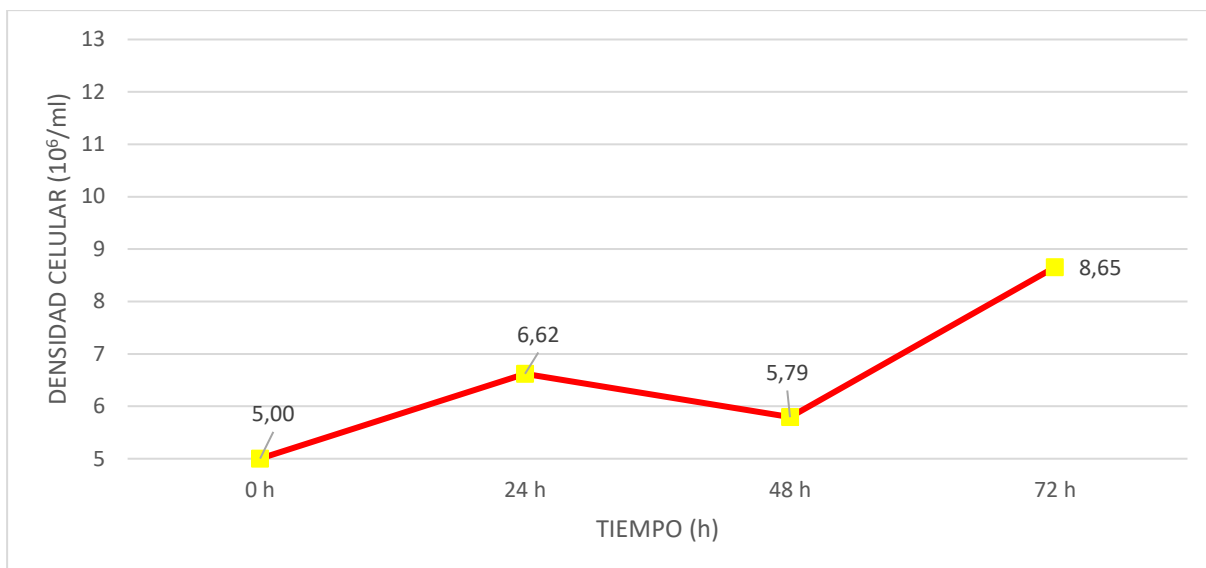
En las primeras 24 h el crecimiento se ve inhibido, para adquirir después una tendencia exponencial, llegando a duplicarse el número de células tras 72 h



**Figura 15.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *C. onubensis* con 30 nM de MeHg.

En el nivel de exposición de 30 nM, *C. onubensis* comienza en 5,3 millones de células, siendo algo menor que en anterior nivel de exposición (ver Figura 15). Tras 24 h se observa una tendencia de crecimiento positiva, llegando a los 6,9 millones de células, para después disminuir ligeramente hasta 6,6 millones de células tras 48 h. Finalmente tras 72 h vuelve a observarse un crecimiento positivo, el cual es mayor que en la primera etapa con tendencia positiva, llegando a los 10 millones de células.

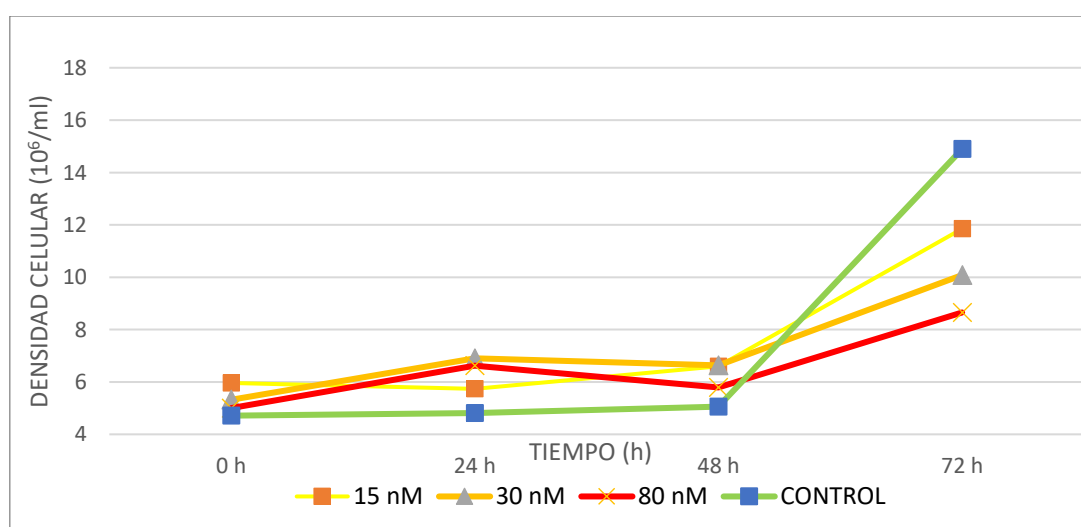
A diferencia del primer nivel de exposición, se observa una tendencia positiva en la primera etapa del experimento, y es tras 48 h cuando se observa una ligera inhibición del crecimiento. Finalmente, el cultivo consigue un notable crecimiento en las últimas 24 h. En comparación con el primer nivel de exposición, el nivel de crecimiento final ha sido algo menor, llegando a 10 millones de células en comparación con las 11,8 del primero. Hay que tener en cuenta que el segundo nivel de exposición tiene una concentración menor al principio del experimento, pero aun así se puede decir que el crecimiento se ha visto algo inhibido.



**Figura 16.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *C. onubensis* con 80 nM de MeHg.

El nivel de exposición más alto de 80 nM comienza con una concentración menor que los anteriores, con 5 millones de células (ver Figura 16). Sigue las mismas tendencias que la exposición a 30 nM, es decir, tras 24 h se observa una tendencia positiva, con una tasa de crecimiento muy parecida, llegando a los 6,6 millones de células para disminuir hasta 5,8 millones en las posteriores 48 h. Este decrecimiento en la segunda etapa es mayor que en el anterior nivel de exposición, llegando a disminuir 800 mil células en el transcurso desde las 24 a las 48 h. Finalmente el cultivo recupera una tendencia positiva tras 72 h, llegando a alcanzar un máximo de 8,6 millones.

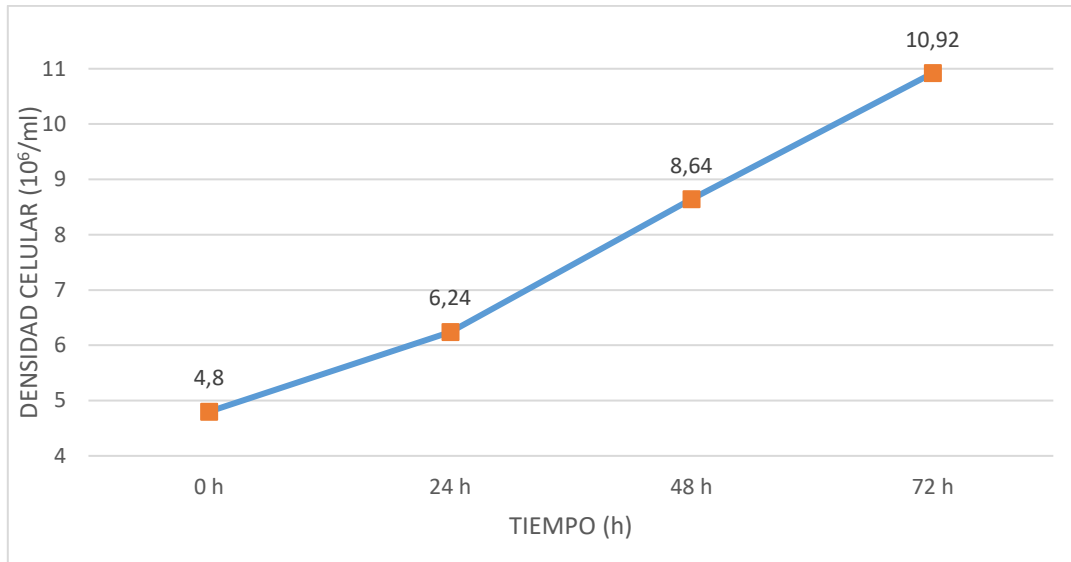
La tendencia total sigue siendo positiva, pero se aprecia una notable inhibición del crecimiento, ya que el número máximo de células es menor que en los dos niveles anteriores.



**Figura 17.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *C. onubensis* con para todos los niveles de exposición.

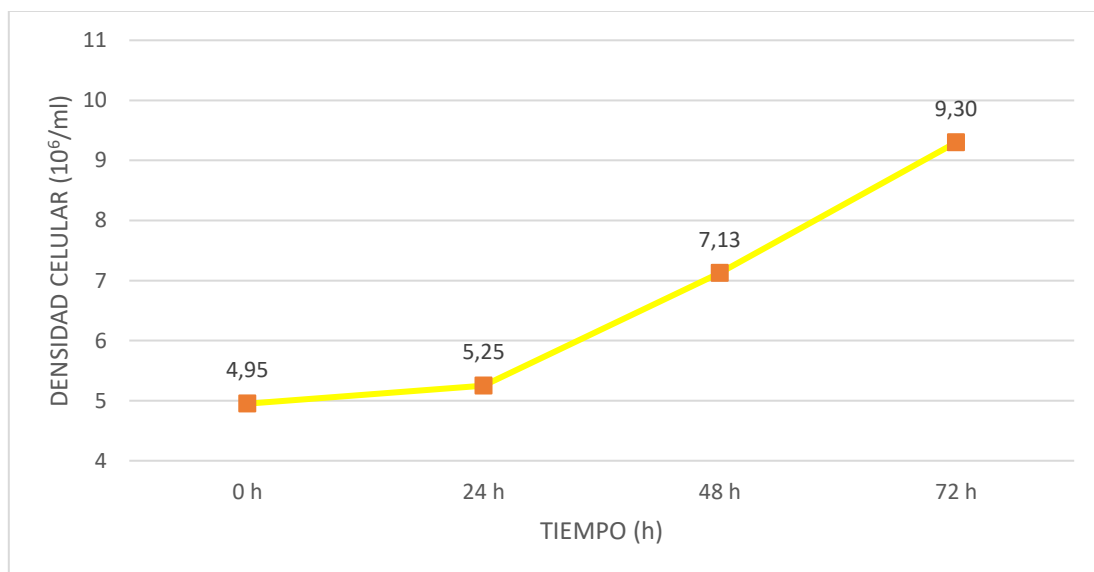
Si comparamos todos los niveles juntos (ver Figura 17), se puede apreciar un crecimiento en todos ellos, pero cuanto mayor es la concentración de MeHg, el crecimiento máximo final que se alcanza es menor.

### 3.2.2. Resultados de crecimiento de *D. salina*



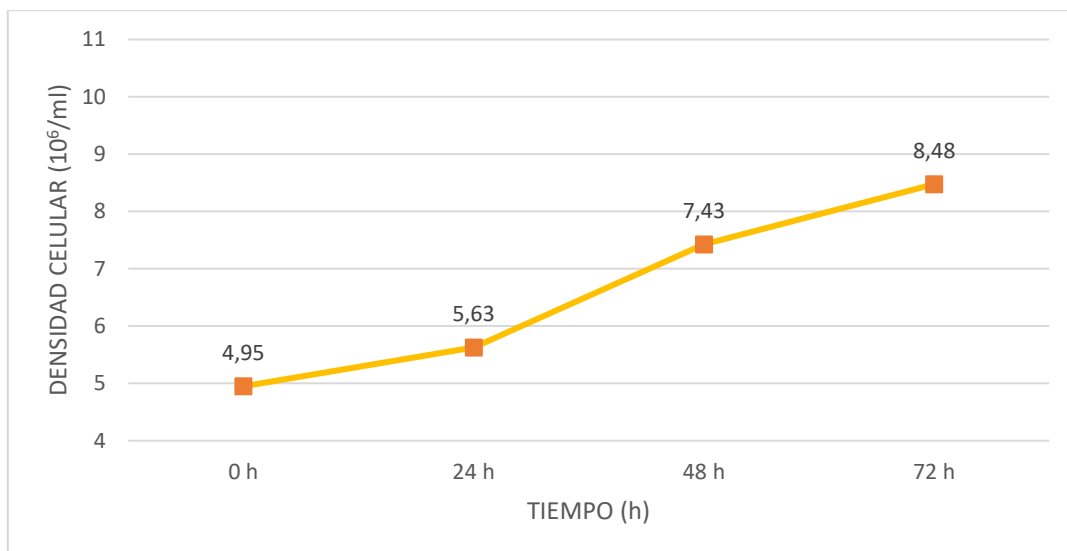
**Figura 18.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) del control de *D. salina*.

En la Figura 18 se observa el crecimiento celular para el control de *D. salina*, el cual va aumentando progresivamente a lo largo del tiempo. El valor inicial es de 4.8 millones de células, que aumenta a una velocidad constante hasta alcanzar su máximo a las 72 h (10.9 millones de células). Este máximo es el mayor de todos los experimentos realizados con *D. salina*.



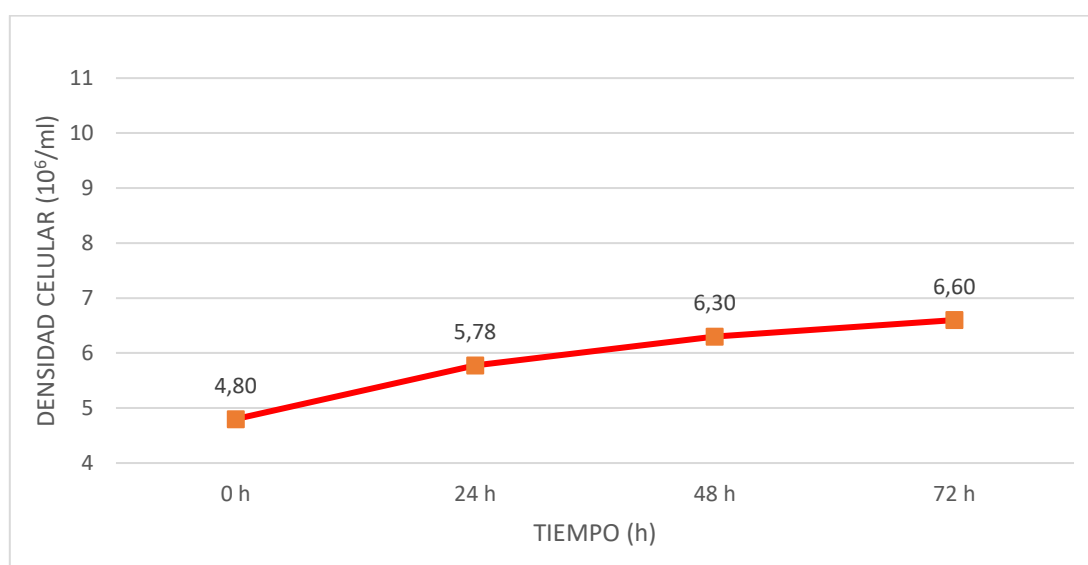
**Figura 19.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *D. salina* con 15 nM de MeHg.

En el nivel de exposición de 15 nM (ver Figura 19) se observa un crecimiento durante las 72 h, el cual es menor durante las primeras 24 h, y después mantiene un crecimiento constante. El máximo se consigue a las 72 h con 9,3 millones de células, algo menos del doble que las del principio del experimento.



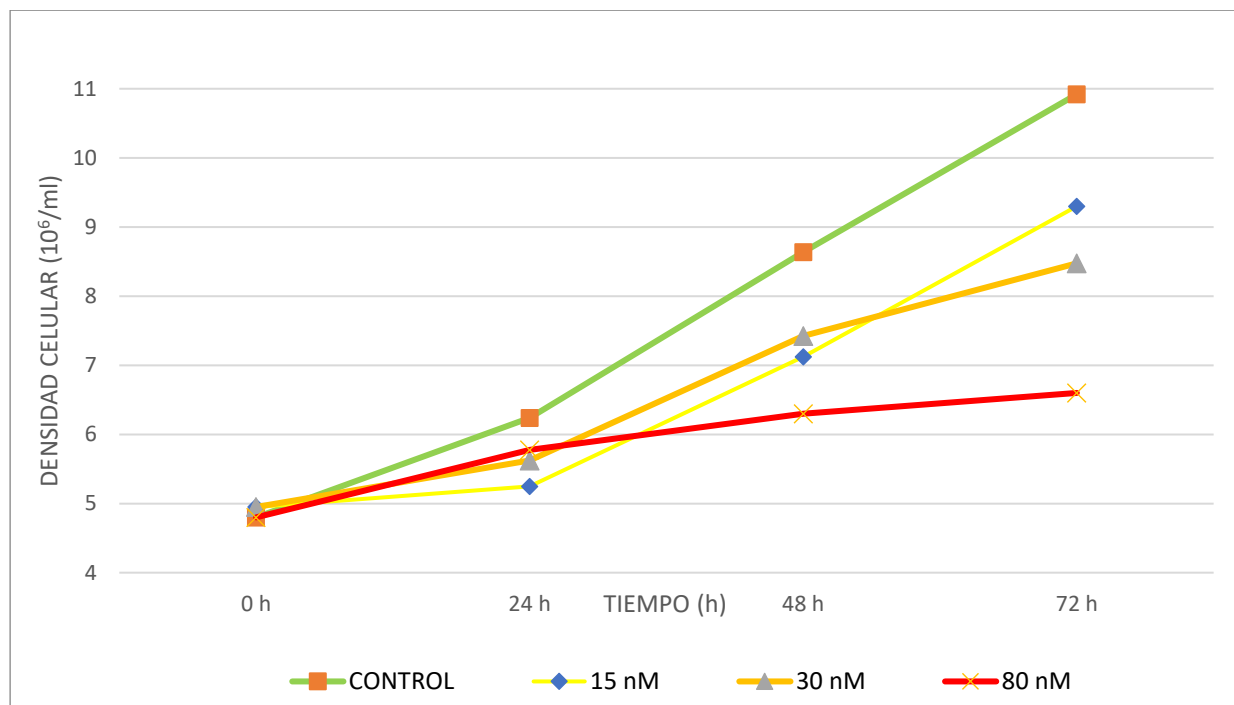
**Figura 20.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *D. salina* con 30 nM de MeHg.

En el nivel de exposición de 30 nM (ver Figura 20) se mantiene una tendencia de crecimiento positiva, observándose una tasa de crecimiento menor durante las primeras 24 h, que llega a 5,6 millones de células. Después, el crecimiento es algo más rápido, llegando a 7,4 millones de células a las 48 h, para volver a disminuir la tasa de crecimiento en el último día, llegando al máximo de 8,5 millones de células. El crecimiento es muy parecido al del anterior del nivel de exposición menos en la etapa final, en la que se observa una menor tasa de crecimiento, y un valor máximo menor.



**Figura 21.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *D. salina* con 80 nM de MeHg.

Por otra parte, el nivel de exposición de 80 nM (ver Figura 21) muestra un crecimiento del cultivo en todas las etapas, pero con una tasa de crecimiento significativamente menor que en los anteriores casos, llegando al máximo de 6,6 millones de células a las 72 h.



**Figura 22.** Evolución a lo largo del tiempo del número de células (en millones por ml) de *D. salina* todos los niveles de exposición.

Al igual que en el caso de *C. onubensis* el crecimiento en general ha sido positivo en todos los casos después de 72 h, y también se observa que cuanto mayor sea la concentración de MeHg expuesta disminuye el crecimiento máximo de los cultivos (ver Figura 22).

### 3.2.3. Conclusiones sobre el crecimiento

En cuanto a los resultados de crecimiento de *C. onubensis*, en todos los casos se ha observado un crecimiento a lo largo del tiempo, pero en distinta medida. Las muestras con MeHg han tenido un crecimiento final menor que el control, y a mayor concentración de dicho compuesto, menor ha sido el crecimiento final a todos los niveles. Dicho esto, se concluye que el crecimiento de los cultivos de *C. onubensis* se ve afectado por la presencia de MeHg, y dicho efecto se ve acentuado a mayor concentración de este compuesto.

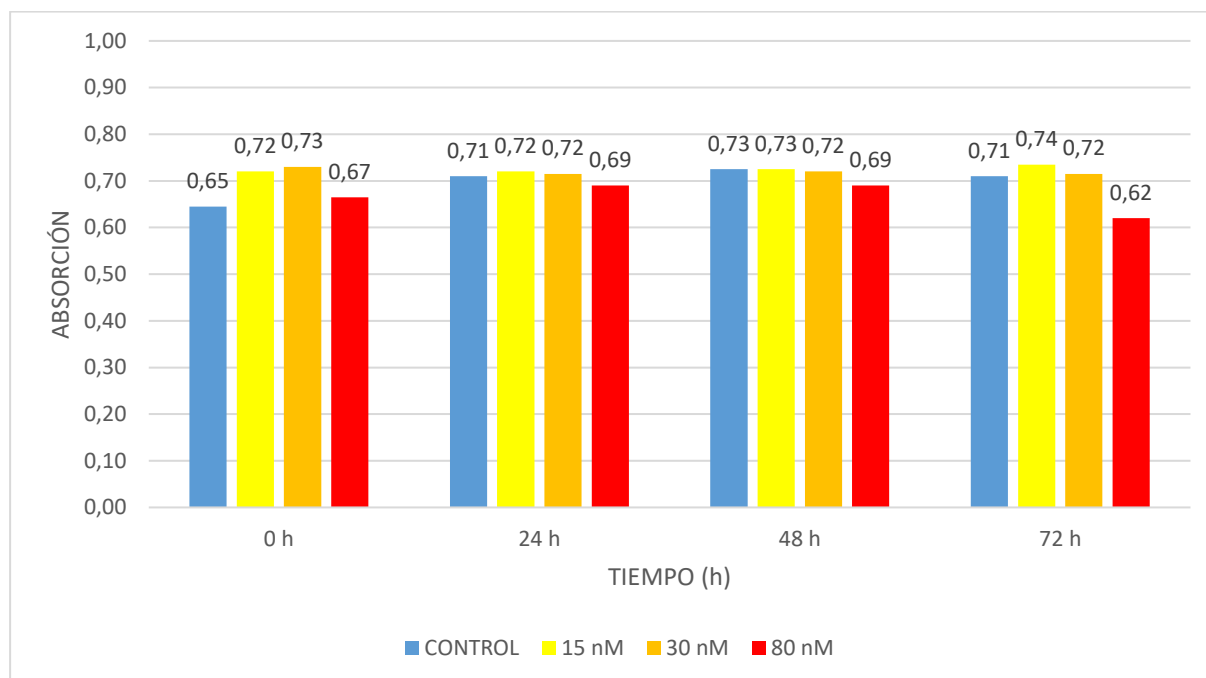
Respecto a los resultados de *D. salina* sucede lo mismo que con *C. onubensis*; Se ha observado un crecimiento a lo largo del tiempo en todos los casos, pero a las 72 h se ve una clara diferencia entre los diferentes niveles, alcanzando un número de células menor a medida que aumenta la concentración de MeHg. En conclusión, el MeHg



también tiene un efecto negativo en el crecimiento celular de *D. salina*, y cuanto mayor es la concentración de dicho elemento, mayor es el efecto.

### 3.3. Eficiencia cuántica

#### 3.3.1. Resultados de $Q_y$ de *C. onubensis*



**Figura 23.** Evolución de la eficiencia cuántica ( $Q_y$ ) de *C. onubensis* a lo largo del tiempo para las distintas concentraciones de MeHg.

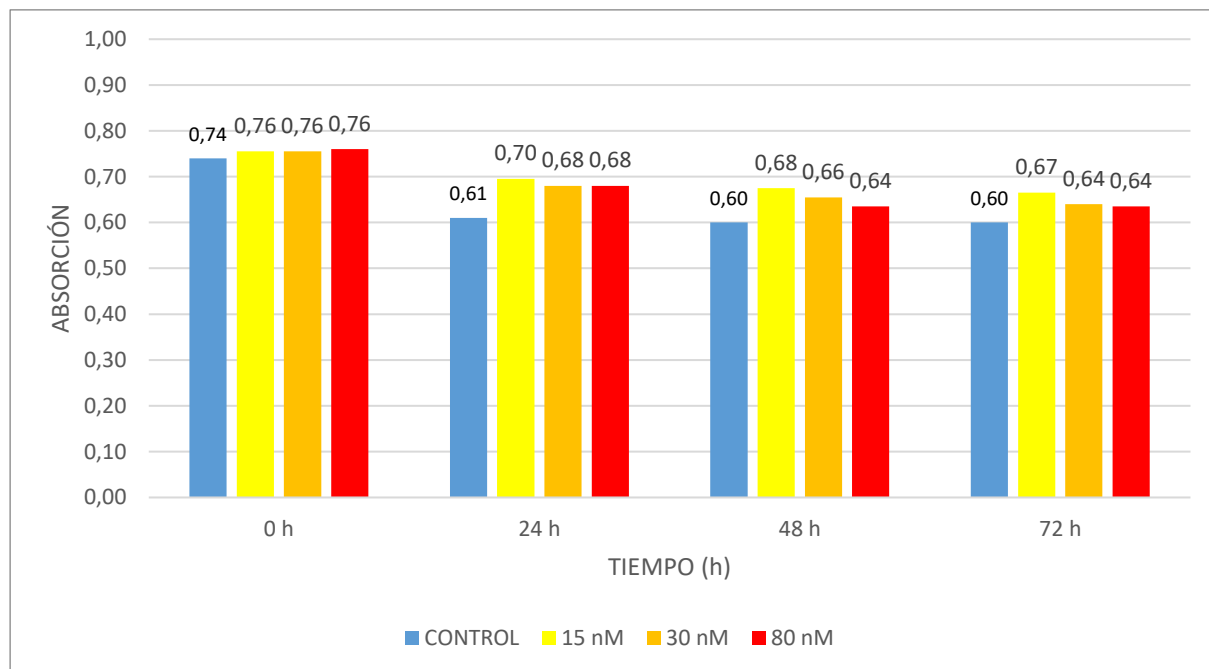
Para las exposiciones de 15 y 30 nM apenas se observa variación, en ambos casos la eficiencia cuántica se mantiene relativamente constante durante las 72 h que dura el experimento (ver Figura 22). En el nivel de 15 nM, el valor final es ligeramente superior al inicial, mientras que en la de 30 nM es ligeramente inferior, pero la variación es muy pequeña en ambos casos.

En cuanto a la eficiencia cuántica a 80 nM de MeHg sí que se observan variaciones, aumenta ligeramente durante las primeras 24 h de 0,67 a 0,69, y se mantiene hasta las 48 h, para finalmente disminuir hasta 0,62 a las 72 h. El nivel de exposición de 80 nM es el que muestra una mayor diferencia entre el valor inicial y el final, empezando en 0,67, que disminuye hasta 0,62 tras 72 h. Aunque se observe una disminución, esta no es muy grande, y hay que tener en cuenta que el valor inicial de este nivel de exposición es significativamente menor que en los dos anteriores, lo que podría haber influido en los resultados.

Para el control de *C. onubensis* sí que se observa un aumento notable durante las primeras 24 h, de 0,65 a 0,71, el cual se mantiene bastante constante hasta la finalización del experimento. El valor inicial del experimento de control se asemeja más al del experimento de 80 nM que los otros, por lo que se deduce que la exposición

más alta sí que ha influido en la reducción del valor final, aunque no se pueda comparar directamente con los otros dos niveles de exposición, debido a la diferencia en el valor inicial.

### 3.3.2. Resultados de $Q_y$ de *D. salina*



**Figura 24.** Evolución de la eficiencia cuántica ( $Q_y$ ) de *D. salina* a lo largo del tiempo para las distintas concentraciones de MeHg.

En el control de la eficiencia cuántica de *D. salina* (ver Figura 24) se observa una disminución del valor a lo largo del tiempo. El valor inicial es de 0.74, el cual disminuye hasta 0.61 a las 24 h, para después mantenerse en 0.60 hasta las 72 h. Dichos valores son los más bajos en todas las etapas del experimento.

En el nivel de exposición de 15 nM para *D. salina* se ha observado un patrón de disminución progresiva del valor de  $Q_y$  a lo largo del tiempo (ver Figura 24). Empieza en 0,76, para disminuir hasta 0,70 tras 24 h, después a 0,68 a las 48 h, y finalmente disminuye hasta 0,67 tras 72 h. El valor final es significativamente menor que el inicial, con una disminución de 0,09.

En el nivel de exposición intermedio de 30 nM (ver Figura 24) se ha observado la misma tendencia que en el anterior caso, pero la disminución del valor ha sido algo mayor. El valor inicial es de 0,76, que tras 24 h disminuye hasta 0,68, para continuar disminuyendo hasta 0,66 tras 48 h, llegando finalmente hasta 0,64 tras 72 h. La diferencia entre el valor inicial y el final ha aumentado respecto al nivel de exposición anterior, ya que el valor final en este caso es menor (0,64) respecto al anterior (0,67).

En cuanto al nivel de exposición de 80 nM (ver Figura 24), se observa una tendencia parecida que en los dos anteriores, pero en este caso la disminución es mayor. El

primer valor es de 0,76, que disminuye hasta 0,68 tras 24 h, y sigue disminuyendo hasta 0,64 a las 48 h. En la etapa final el valor se mantiene constante, manteniéndose en 0,64 tras 72 h. En este caso, al contrario que en los anteriores, el valor mínimo se consigue tras 48 h, y no sigue disminuyendo en la etapa final, sino que se mantiene constante, además presenta el valor más bajo de los tres niveles.

### 3.3.3. Conclusiones sobre Qy

En el caso de *C. onubensis*, en las concentraciones de 15 y 30 nM apenas se ha observado variación alguna durante la duración de los experimentos, por lo que se concluye que estas concentraciones de MeHg no afectan a la capacidad de fotosíntesis de esta especie. A 80 nM sí que se han observado variaciones, pero el aumento durante las primeras 24 h puede deberse a que el valor inicial es más bajo comparado con los otros dos casos. En todos los demás casos, los valores tienden a estabilizarse cerca de 0,70, por lo que puede considerarse como el valor óptimo que alcanza esta especie, y en la primera etapa sube hasta 0,69, un valor cercano a dicho valor óptimo. Este aumento puede deberse a que el valor inicial es menor, y que consigue aumentar su potencial fotosintético al estabilizarse. Mantiene dicha estabilidad hasta las 48 h, donde sufre un descenso considerable a las 72 h. Esto puede deberse a que la exposición al MeHg ha disminuido su capacidad fotosintética después de haber pasado 48 h, ya que en todos los otros casos dicho valor se mantiene estable alrededor de 0,70 durante todo el experimento. Incluso en el caso del control, que tiene un valor inicial parecido al del nivel de exposición más alto, se estabiliza sobre estas cifras después de aumentar tras 24 h. Aunque se observe una disminución en comparación con los otros experimentos, el valor mínimo que alcanza es de 0,62, el cual sigue estando dentro del intervalo óptimo para que la fotosíntesis se realice de manera adecuada, ya que dicho intervalo es de entre 0,60 y 0,75. Dicho esto, se concluye que las concentraciones de 15 y 30 nM de MeHg no afectan a la capacidad fotosintética de *C. onubensis*, pero a 80 nM sí que se observa una disminución durante la última etapa del experimento.

Respecto a *D. salina*, se ha observado una disminución del valor a lo largo del tiempo en todos los niveles de exposición, y además cuanto mayor es la concentración de MeHg los valores disminuyen más rápidamente. Los valores iniciales son muy parecidos en los tres casos, y se observa una diferencia notable entre los diferentes niveles de exposición a lo largo del tiempo. Los valores más bajos se observan en el control, lo que a priori no debería de ser así, pero este fenómeno sucede debido a que el crecimiento es mayor que en los otros casos; como los cultivos se encuentran en un espacio muy limitado, al aumentar la densidad del cultivo la luz no llega a todas las células, dificultando la fotosíntesis y provocando la bajada del valor de la eficiencia cuántica. Por ello, se concluye que la capacidad fotosintética de *D. salina* se ve disminuida ante la presencia de MeHg, y que este efecto aumenta cuanto mayor sea la concentración de dicho compuesto. Cabe mencionar que los valores mínimos que

se han observado en todos los casos siguen estando dentro del rango óptimo para la fotosíntesis, ya que no disminuye por debajo de 0,60 en ningún caso.

### 3.4. SOD

En lo que respecta a los resultados de SOD, se analiza si ha sucedido algún cambio significativo en la actividad específica entre los ensayos del control y los que tienen 80 nM de MeHg. La actividad específica se mide en U SOD/mg de proteínas, es decir, las unidades de SOD de la muestra por mg de proteínas que contiene. Cuanto mayor sea este valor, mayor será el estrés oxidativo que sufren las células, y como respuesta estas aumentan la cantidad de especies reactivas de oxígeno para combatir dicho estrés. Para que la diferencia entre las dos muestras analizadas sea significativa, la que contiene MeHg tendría que ser por lo menos de entre 1,5 y 2 veces mayor que la del control. Tanto para el control como para las muestras con 80 nM de MeHg se han hecho solo 2 réplicas, ya que esta técnica requiere una gran cantidad de biomasa, y por limitaciones técnicas del laboratorio no ha sido posible conseguir una mayor cantidad.

#### 3.4.1. Resultados de SOD de *C. onubensis*

**Tabla 1.** Resultados de la actividad específica determinada mediante SOD para *C. onubensis*.

<i>C. onubensis</i>		
Cálculo Actividad específica U/mg proteínas:	Proteínas en EC mg/ml EC	Actividad específica
1 (80 nM MeHg)	2,15	7,57
2 (80 nM MeHg)	3,41	4,85
3 (Control)	2,62	6,48
4 (Control)	2,96	5,50
	AV	6,10
	SD	0,15
	% SD	2,52

En el caso de *C. onubensis* (ver Tabla 1), la diferencia observada en la actividad específica entre el control y las muestras con 80 nM de MeHg es de un 2,52 %. La variación que se observa es muy pequeña, por lo que se puede decir que las dos muestras son prácticamente iguales.

### 3.4.2. Resultados de SOD de *D. salina*

**Tabla 2.** Resultados de la actividad específica determinada mediante SOD para *D. salina*

<i>D. salina</i>		
Cálculo Actividad específica U/mg proteínas:	Proteinas en EC mg/ml EC	Actividad específica
1 (80 nM MeHg)	6,45	2,95
2 (80 nM MeHg)	6,16	2,35
3 (Control)	5,99	2,73
4 (Control)	6,96	2,22
	AV	2,56
	SD	0,12
	% SD	4,75

En el caso de *D. salina* (ver Tabla 2) la diferencia entre las muestras es algo mayor, de un 4,75 %. Aun así, sigue siendo una diferencia muy pequeña, y se puede decir que las dos muestras presentan prácticamente los mismos resultados.

### 3.4.3. Conclusiones sobre los resultados de la actividad de la enzima SOD

La actividad específica de *D. salina* comparada con la de *C. onubensis* es menor. Esto sucede porque esta última crece en ambientes donde tiene que soportar un gran estrés oxidativo, debido a las altas concentraciones de metales pesados presentes en las aguas de Rio Tinto, por lo que cuenta con mecanismos biológicos para combatir dicho estrés.

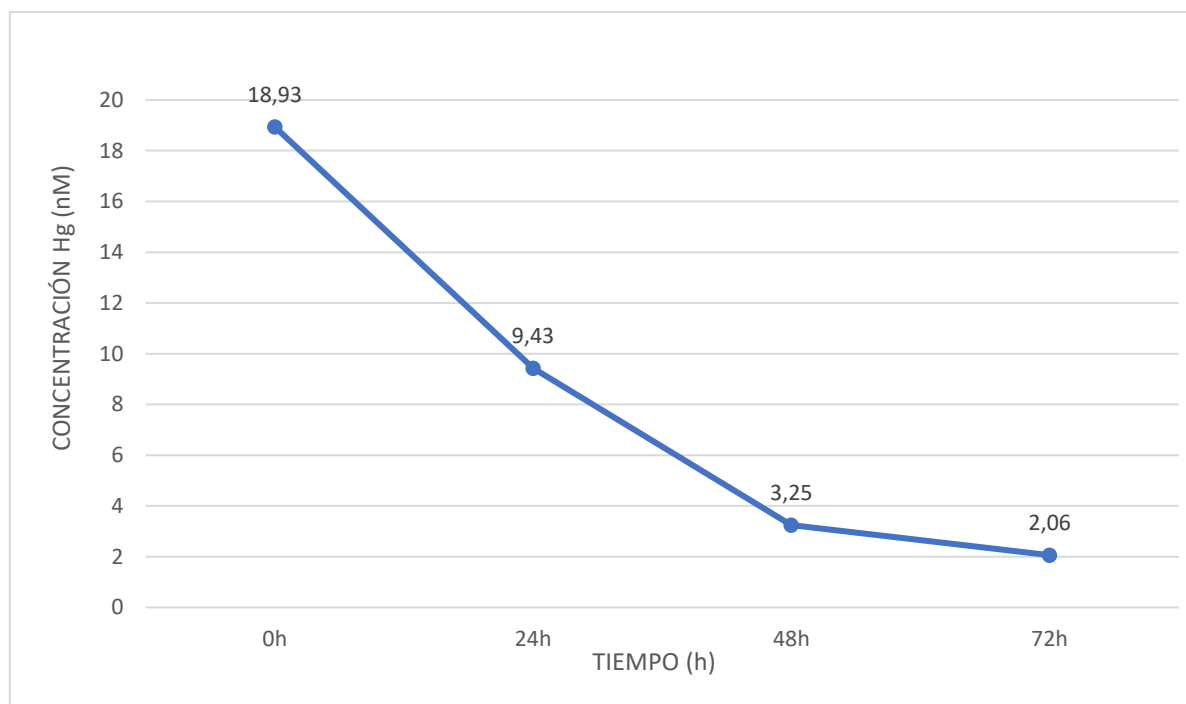
No se ha observado ninguna variación significativa en las unidades de SOD por mg de proteínas en ninguna de las dos especies, lo que sugiere que 80 nM de MeHg no provoca estrés oxidativo a ninguna de las dos especies, por lo menos en esas concentraciones. Al no observarse variaciones en el nivel de concentración más alto al que se ha expuesto a dichas especies, no ha sido necesario repetir los ensayos de SOD con las otras dos concentraciones, ya que, si la más alta no ha provocado ningún aumento en el SOD, se deduce que las concentraciones menores tampoco lo harán.

Se ha observado que una mayor concentración de MeHg influye negativamente en el crecimiento de las dos especies, pero los resultados de SOD muestran que dicho efecto no ha sido causado por un aumento en el estrés oxidativo, por lo que el causante de ello ha tenido que ser algún otro factor que no se ha logrado identificar.

## 3.5. ICP-MS

Respecto a los resultados de ICP-MS, el laboratorio externo ha tenido problemas técnicos con el equipo, y no se han podido conseguir resultados fiables para las fracciones líquidas de lavado y medio. Esto se debe a que para el análisis de Hg

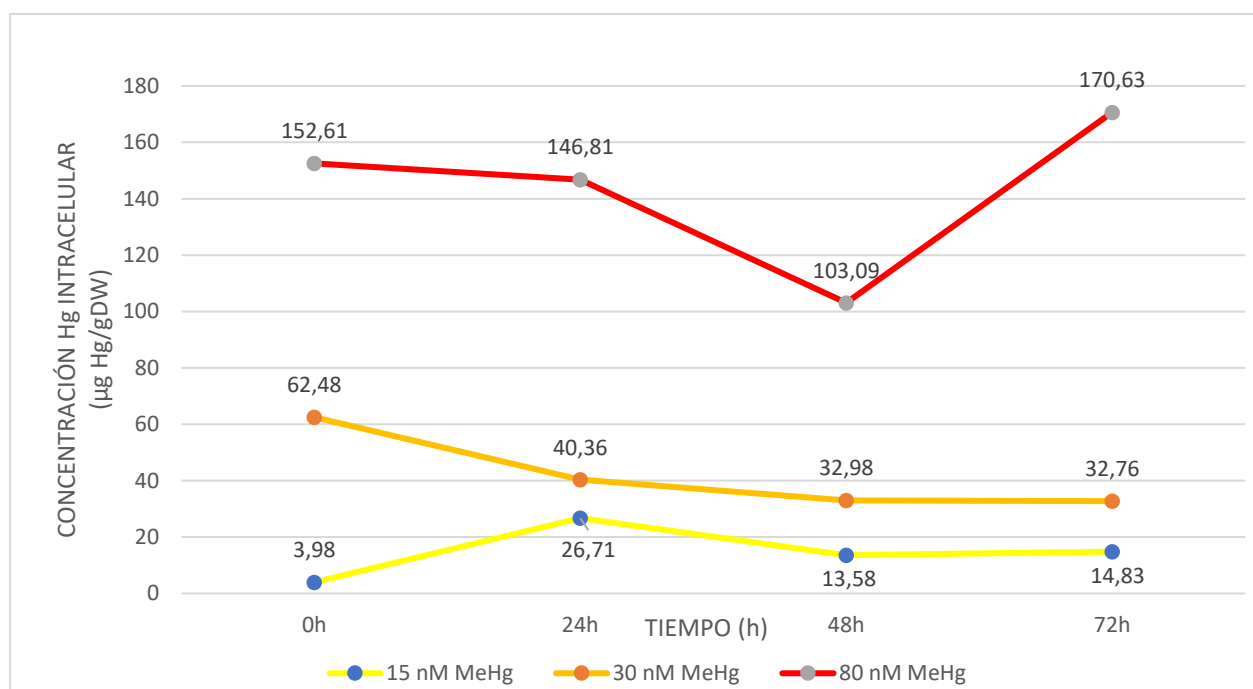
mediante ICP-MS de muestras líquidas se requiere un pretratamiento específico con el que no se contaba. Este pretratamiento evita el arrastre de Hg en las muestras consecutivas, y por ello el Hg se acumulaba en el equipo. Debido a este problema se conseguían valores muy bajos en algunas muestras líquidas, y en otras pasaba lo que había quedado acumulado de golpe, dando valores muy altos, y haciendo los datos inservibles. Por otro lado, los análisis de muestras sólidas de la biomasa no daban este problema, y se consiguieron valores con una fiabilidad adecuada. Estos son los que más interés tienen en el presente estudio, y se van a presentar solamente estos resultados, ya que ICP-MS es una técnica destructiva y se han perdido las muestras.



**Figura 25.** Evolución a lo largo del tiempo de la concentración de Hg en el medio, correspondiente al control abiótico con 20 nM de MeHg.

Se hizo un control abiótico (ver Figura 25), es decir, solo con MeHg sin ningún alga. Se aplicaron 20 nM de MeHg y se dejó durante 72 h para observar la degradación de dicho compuesto. Los resultados muestran una degradación casi completa a las 72 h, probablemente por el efecto de la luz ya que MeHg es un compuesto fotodegradable (Li et al., 2022).

### 3.5.1. Resultados ICP-MS de *C.onubensis*



**Figura 26.** Evolución a lo largo del tiempo de la concentración intracelular ( $\mu\text{g Hg/gDW}$ ) de Hg para *C. onubensis*.

En cuanto a la acumulación de Hg dentro de las células de *C. onubensis*, hay una gran diferencia entre los tres niveles de exposición analizados, y se observa que cuanto mayor es la cantidad de MeHg añadida, *C. onubensis* es capaz de acumular más cantidad de mercurio y a pesar de ello seguir creciendo, aunque como se ha visto anteriormente sí que influye en el crecimiento.

Al añadir 15 nM de MeHg, el valor inicial de Hg intracelular ha sido de 3,98  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , el cual ha aumentado hasta 26,70  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  tras 24 h, para descender hasta 13,60  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 48 h, y finalmente volver a aumentar ligeramente hasta 14,80  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 72 h. El pico de acumulación se ha dado a las 24 h desde el inicio del experimento, y el valor mínimo se da al inicio de este.

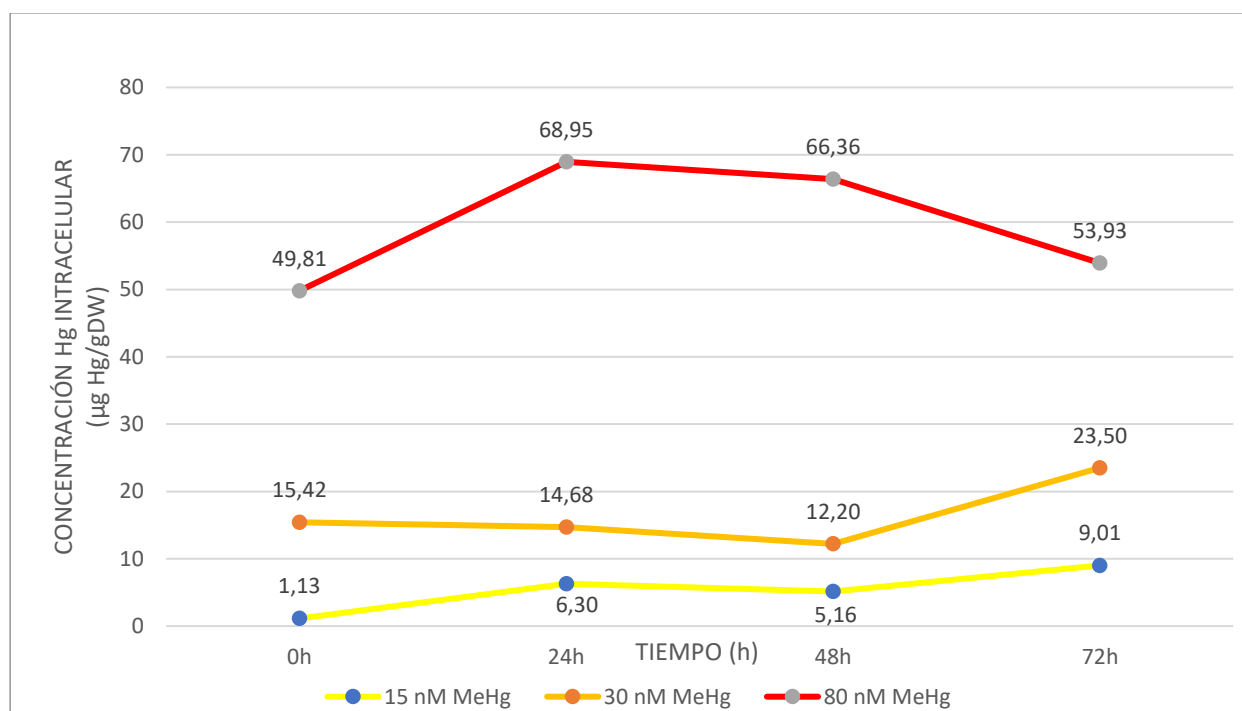
Con la adición de 30 nM, el valor inicial ha sido de 62,50  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , el cual ha ido descendiendo progresivamente durante el tiempo; a las 24 h ha sido de 40,40  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , a las 48 h de 33  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , y finalmente a las 72 h de 32,80  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ . Esta última etapa varía muy poco, por lo que se puede considerar que el valor se mantiene constante desde las 48 a las 72 h. El máximo de acumulación en este caso coincide con el valor inicial, y en cambio el mínimo se da a las 72 h.

En el nivel de exposición más alto de 80 nM, el valor inicial es de 152,60  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , que tras 24 h disminuye ligeramente hasta 146,80  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , para seguir disminuyendo significativamente hasta 103,10  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 48 h. Finalmente, el valor aumenta drásticamente hasta 170,60  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 72 h, el mayor aumento y el valor máximo

observado en todos los experimentos. El valor más bajo se sitúa en este caso a las 48 h.

En los niveles de 30 y 80 nM los valores iniciales tienden a descender a lo largo del tiempo, aunque en el segundo caso este aumenta drásticamente en la etapa final. En el nivel de 15 nM, al principio apenas acumula Hg en el interior de la célula hasta pasadas 24 h, que después desciende como en los casos anteriores. Finalmente el valor vuelve a aumentar ligeramente.

### 3.5.2. Resultados ICP-MS de *D. salina*



**Figura 27.** Evolución a lo largo del tiempo de la concentración intracelular ( $\mu\text{g Hg/gDW}$ ) de Hg para *D. salina*.

En el caso de *D. salina* (ver Figura 27), en todos los casos se observa una mayor acumulación intracelular de Hg al aumentar la concentración de MeHg añadida. Al igual que *C. onubensis*, *D. salina* es capaz de acumular una cantidad mayor de Hg a medida que se le expone a concentraciones más altas, al menos a estas concentraciones, y a pesar de ello seguir creciendo. Como se ha visto en el punto 3.2 sobre el crecimiento celular, aunque se observe un crecimiento a todos los niveles, el crecimiento máximo que se alcanza disminuye al aumentar la concentración de MeHg.

En el nivel de exposición de 15 nM, el valor inicial es de 1,10  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , el cual asciende hasta 6,30  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 24 h, después desciende ligeramente hasta 5,20  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 48 h, y finalmente aumenta hasta 9  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 72 h, en la cual se alcanza la concentración máxima. Por otra parte, el valor mínimo se da al inicio del experimento.



En el nivel de 30 nM, el valor inicial es de 15,40  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , el cual desciende hasta 14,70  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  tras 24 h, y sigue disminuyendo hasta 12,20  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  tras 48 h, que es el valor mínimo de este experimento. Finalmente aumenta hasta 23,50  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 72 h, alcanzando el máximo.

Con la adición de 80 nM, el valor inicial ha sido de 49,80  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , el cual aumenta considerablemente hasta 69  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 24 h. Después disminuye hasta 66,40  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 48 h, y continúa disminuyendo hasta 53,90  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$  a las 72 h. El mínimo coincide con el valor inicial y el máximo a las 24 h, que a su vez es el máximo de todos los experimentos de esta especie.

Las cantidades que *D. salina* ha acumulado en el interior de la célula en cada nivel de exposición son mucho menores en comparación con las de *C. onubensis*; a 15 nM de MeHg, el máximo acumulado por *C. onubensis* ha sido de 26,70  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , mientras que *D. salina* ha conseguido 9  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ . A 30 nM de MeHg, el máximo acumulado por *C. onubensis* ha sido de 62,5  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , mientras que *D. salina* ha conseguido 23,50  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ . Por último, a 80 nM de MeHg, el máximo acumulado por *C. onubensis* ha sido de 170,60  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ , mientras que *D. salina* ha conseguido 69  $\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$ .

### 3.5.3. Conclusiones sobre los resultados de ICP- MS

Respecto a los resultados de absorción, en el caso de *C. onubensis* se han observado valores de concentración intracelular de Hg bastante significativos, sobre todo para el nivel de exposición de 80 nM. *C. onubensis* tiende a acumular MeHg desde el primer momento, menos en la concentración de 15 nM. que a tiempo cero acumula poca cantidad, que aumenta tras 24 h. Después parece que la concentración va disminuyendo progresivamente, siendo menores los valores observados a las 72 h, a excepción de la concentración de 80 nM, en la que durante el último tramo la concentración aumenta muy significativamente. Con ello se concluye que en los dos niveles de concentración más bajos, *C. onubensis* tiende a eliminar el mercurio intracelular hasta cierto punto, ya que durante el último tramo, la cantidad observada se estabiliza. Por otra parte, en el nivel de concentración más alto también tiende a disminuir la cantidad intracelular a lo largo del tiempo, pero por razones desconocidas en el último tramo vuelve a concentrar Hg en el interior. Puede que en cierto punto la concentración extracelular sea excesiva, y la célula decida volver a absorberlo. A pesar de ello, *C. onubensis* es capaz de acumular cantidades significativas de MeHg en el interior de la célula a la vez que continúa creciendo, aunque como se ha visto en apartados anteriores, el crecimiento se ve claramente afectado.

En el caso de *D. salina*, a las concentraciones de 15 y 30 nM las concentraciones se mantienen relativamente estables durante las primeras 48 h, y en el tramo final tienden a acumular una mayor cantidad. En la concentración de 80 nM tiene un comportamiento distinto; a las primeras 24 h se incrementa la acumulación, y después se mantiene estable, pero a diferencia de los casos anteriores, en el último tramo

desciende la concentración. *D. salina* mantiene una concentración en torno a 67 µg/g<sub>DW</sub> durante 24 h, por lo que puede ser que no sea capaz de mantener tal concentración durante el tiempo, y por ello reacciona expulsándolo al exterior.

Las concentraciones máximas de MeHg que acumula *C. onubensis* son 2,5 veces mayores que las de *D. salina*, y además esta última parece que no es capaz de mantener dicha concentración a lo largo del tiempo. Por otra parte, *C. onubensis* parece ser capaz de acumular mayores cantidades cuando las circunstancias lo requieren.

## **CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES FINALES**

En ambas especies se han observado efectos negativos en el crecimiento celular cuanto mayor es la concentración de MeHg aplicada. Esto probablemente sea debido a que la acumulación intracelular afecte a la fotosíntesis. En los experimentos no se ha observado ningún indicio de estrés oxidativo en el rango de las concentraciones de MeHg aplicadas.

La eficiencia cuántica de *C. onubensis* a 80 nM desciende significativamente a las 72 h en comparación con los demás niveles, y coincide con el gran aumento en la concentración de MeHg intracelular, por lo que es probable que tales concentraciones intracelulares por un tiempo prolongado sean las causantes de la disminución de la capacidad fotosintética, y que como consecuencia de ello, el crecimiento también se vea afectado. En el caso de *D. salina* sucede lo mismo, cuanto más tiempo pasa el MeHg en el interior de la célula mayores son las consecuencias observadas en la disminución de la eficiencia fotosintética. Al nivel de 80 nM se siguen observando mayores bajadas de  $Q_y$ , aunque en las dos etapas finales disminuyan las concentraciones intracelulares. Esto puede deberse a que la célula elimina el MeHg como respuesta a la disminución de la eficiencia fotosintética.

Lógicamente se observa una relación entre los valores de densidad óptica y los de crecimiento celular, ya que la densidad óptica aumenta cuanto mayor es la cantidad de biomasa, es decir, cuando aumenta el número de células.

En ningún caso se ha visto que mueran los cultivos, de hecho, se ha observado lo contrario, ya que ambas especies son capaces de seguir creciendo incluso con las concentraciones de MeHg más altas. Esto significa que el rango de concentraciones aplicado no es letal, y es adecuado para el presente estudio. Por ello, *C. onubensis* y *D. salina* pueden ser aptas para su uso como bioindicadores, o incluso para biorremediación, ya que en ambas especies han sido capaces de acumular y mantener durante el tiempo cantidades significativas de MeHg. Cabe destacar que *C. onubensis* ha mostrado una capacidad de acumulación intracelular 2,5 superior a *D. salina* en las concentraciones más elevadas, por lo que dicha especie muestra un potencial muy destacable para la bioremediación de aguas contaminadas con MeHg.

Dicho esto, es necesario que futuras investigaciones sigan explorando esta línea de investigación, ya que a pesar de que los resultados expuestos en el presente trabajo son prometedores, aún queda mucho trabajo antes de que *C. onubensis* y *D. salina* puedan ser utilizadas como bioindicadores o para biorremediación en un proyecto real a gran escala. Las líneas de investigación futuras podrían centrarse en determinar los daños específicos que causa el MeHg en las células de estas especies o repitiendo la metodología del presente trabajo con una escala temporal mayor, y en cultivos de laboratorio a escala piloto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ayala Montaña, S. (2016). *Clasificación taxonómica de microalgas presentes en un consorcio microbiológico que biorremedia el efluente de una planta de sacrificio de bovinos y porcinos*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4203.1764>
- Básaca Loya, G. A. (2006). *Comportamiento de la agregación célula-exopolisacárido y reología del cultivo celular de la microalga roja Rhodosorus marinus* [Tesis Doctoral, Universidad de Sonora]. <http://www.bidi.uson.mx/TesisIndice.aspx?tesis=10635>
- Bermejo, E., Ruiz-Domínguez, M. C., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ramos-Merchante, A., Vega, J. M., Vilchez, C., & Garbayo, I. (2018). Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis* under abiotic stress by salt or ultraviolet light. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(6), 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.12.025>
- Bhattacharya, D., & Medlin, L. (1998). Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant physiology*, 116, 9-15. <https://academic.oup.com/plphys/article/116/1/9/6097377>
- Boening, D. W. (1999). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40, 1335-1351.
- Bowler, C., Van Montagu, M., & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 83-116. <https://doi.org/10.1146>
- Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., Behrenfeld, M. J., Boetius, A., Boyd, P. W., Classen, A. T., Crowther, T. W., Danovaro, R., Foreman, C. M., Huisman, J., Hutchins, D. A., Jansson, J. K., Karl, D. M., Koskella, B., Mark Welch, D. B., ... Webster, N. S. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Número 9, pp. 569-586). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>
- Comisión Europea. (2008, diciembre 24). *Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo*. Diario Oficial de la Unión Europea núm. 348. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-82606>
- Comisión Europea. (2009). *Directiva 2009/161/UE de la Comisión*. Diario Oficial de la Unión Europea núm. 183. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj13rnEjeH\\_AhXdVaQEHZnPCOAQFnoECBQQAQ&url=https%3A%2F%2Feur-lex.europa.eu%2Flegal-](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj13rnEjeH_AhXdVaQEHZnPCOAQFnoECBQQAQ&url=https%3A%2F%2Feur-lex.europa.eu%2Flegal-)

content%2FES%2FTXT%2FPDF%2F%3Furi%3DCELEX%3A32009L0161%26from%3DPL&usg=AOvVaw1RBkstsRG3yS6DSYYO7geA&opi=89978449

- Comisión Europea. (2023, abril 25). *Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión*. Diario Oficial de la Unión Europea núm. 119. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2023-80614>
- D. Guy, R., L. Fogel, M., & A. Berry, J. (1993). Photosynthetic Fractionation of the Stable Isotopes of Oxygen and Carbon. *Plant Physiology*, 101(1), 37-47. <https://doi.org/10.1104>
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. En *Plant Physiology* (Vol. 141, Número 2, pp. 330-335). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078204>
- El-Baz, F. K., Aly, H. F., & Salama, A. A. A. (2019). Toxicity assessment of the green *Dunaliella salina* microalgae. *Toxicology Reports*, 6, 850-861. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.003>
- Eltanahy, E., & Torky, A. (2021). Microalgae as Cell Factories: Food and Feed-grade High-value Metabolites. En *Microalgal Biotechnology* (pp. 1-35). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781839162473-00001>
- Even, C., Hadroug, D., Boumlaik, Y., & Simon, G. (2022). Microalgae-based Bioenergy with Carbon Capture and Storage quantified as a Negative Emissions Technology. *Energy Nexus*, 7, 100117. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100117>
- Ferreira de Oliveira, A. P., & Bragotto, A. P. A. (2022). Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100157>
- Folgar, S., Torres, E., Pérez-Rama, M., Cid, A., Herrero, C., & Abalde, J. (2009). *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1-3), 486-493. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.010>
- Fuentes, J. L., Huss, V. A. R., Montero, Z., Torronteras, R., Cuaresma, M., Garbayo, I., & Vílchez, C. (2016). Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga *Coccomyxa onubensis* sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3269-3279. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0887-3>
- García Jiménez, M. del P. (1994). *Aclimatación reproductiva fisiológica y estructural al cultivo invitro del alga grateloupia doryphora (montagne) Howe (rhodophyta)* [Tesis Doctoral]. Universidad de Las Palmas de Gran Canarias.

- García Romeral, J., Pavía Sanz, M., García Sanz, T., Chirivella-Martorell, J., & Serrano-Aroca, A. (2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 9, 115-129.
- Gojkovic, Ž., Vílchez, C., Torronteras, R., Vígara, J., Gómez-Jacinto, V., Janzer, N., Gómez-Ariza, J. L., Márová, I., & Garbayo, I. (2014). Effect of selenate on viability and selenomethionine accumulation of *Chlorella sorokiniana* grown in batch culture. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/401265>
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. En *Plant Physiology* (Vol. 141, Número 2, pp. 312-322). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Ighalo, J. O., Dulta, K., Kurniawan, S. B., Omoarukhe, F. O., Ewuzie, U., Eshiemogie, S. O., Ojo, A. U., & Abdullah, S. R. S. (2022). Progress in Microalgae Application for CO<sub>2</sub> Sequestration. *Cleaner Chemical Engineering*, 3, 100044. <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100044>
- Kaamoush, M., El-Agawany, N., & Omar, M. Y. (2022). Environmental toxicological evaluation (in vitro) of copper, zinc and cybutryne on the growth and amino acids content of the marine alga *Dunaliella salina*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2022.07.004>
- Lavoie, R. A., Jardine, T. D., Chumchal, M. M., Kidd, K. A., & Campbell, L. M. (2013). Biomagnification of mercury in aquatic food webs: A worldwide meta-analysis. *Environmental Science and Technology*, 47(23), 13385-13394. <https://doi.org/10.1021/es403103t>
- Li, Y., Li, D., Song, B., & Li, Y. (2022). The potential of mercury methylation and demethylation by 15 species of marine microalgae. *Water Research*, 215. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118266>
- Liem-Nguyen, V., Nguyen-Ngoc, H. T., Adediran, G. A., & Björn, E. (2020). Determination of picomolar levels of methylmercury complexes with low molecular mass thiols by liquid chromatography tandem mass spectrometry and online preconcentration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(7), 1619-1628. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02389-y>
- López Rosales, A. R. (2017). *Potencial de cepas de microalgas aisladas de la costa de Yucatán para la producción de biodiesel* [Tesis doctoral]. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

- Marnane, I. (2018, octubre 17). *El mercurio, una amenaza persistente para el medio ambiente y la salud*. Agencia Europea de Medio Ambiente. <https://www.eea.europa.eu/es/articles/el-mercurio-una-amenaza-persistente>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 244(22), 6049-6055. <https://doi.org/10.1016>
- Ministerio de la Presidencia, R. con las C. y M. D. (2023, enero 11). *Real Decreto 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro*. BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO núm. 9. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2023/01/10/3>
- Mobin, S. M. A., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. *Energy Procedia*, 160, 752-760. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.02.183>
- Navarro, F., Toimil, A., Ramírez, S., Montero, Y., Luis Fuentes, J., Perona, J. S., Ángel Castaño, M., Pásaro, R., Vega, J. M., Vílchez, C., & Vílchez cvilchez, C. (2020). The acidophilic microalga *Coccomyxa onubensis* and atorvastatin equally improve antihyperglycemic and antihyperlipidemic protective effects on rats fed on high-fat diets. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3923-3931. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02280-4/Published>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *Exposición al mercurio: un asunto importante para la salud pública, segunda edición. Prevención de enfermedades a través de ambientes saludables*. Who.int. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj8tlrz6-D\\_AhVuxAIHHclpAOQQFnoECA0QAw&url=https%3A%2F%2Fapps.who.int%2Firis%2Fbitstream%2Fhandle%2F10665%2F341450%2F9789240025134-spa.pdf&usq=AOvVaw3O1YQAP1I6IDmebtC4UvU4&opi=89978449](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwj8tlrz6-D_AhVuxAIHHclpAOQQFnoECA0QAw&url=https%3A%2F%2Fapps.who.int%2Firis%2Fbitstream%2Fhandle%2F10665%2F341450%2F9789240025134-spa.pdf&usq=AOvVaw3O1YQAP1I6IDmebtC4UvU4&opi=89978449)
- Quiroga-Flores, R., Guédron, S., & Achá, D. (2021). High methylmercury uptake by green algae in Lake Titicaca: Potential implications for remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111256>
- R. L. Guillard, R., & H. Ryther, J. (1962). STUDIES OF MARINE PLANKTONIC DIATOMS I. CYCLOTELLA NANA HUSTEDT, AND DETONULA CONFERVACEA (CLEVE) GRAN. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239. [www.nrcresearchpress.com](http://www.nrcresearchpress.com)
- Romero Cruz, M. del C. (2017). *El estrés abiótico en el metabolismo del nitrógeno y en el sistema antioxidante de la microalga acidófila* [Tesis Doctoral]. Universidad de Huelva UHU.

- Sadava, D., Hillis, D., Heller, C., & Berenbaum, M. (2011). *Life, The Science of Biology* (F. & C. W.H., Ed.; 9ª edición). Sinauer Associates.
- Sehgal, A., Goswami, K., Pal, M., Chikkaputtaiah, C., Chetia, P., & Boruah, H. P. D. (2019). Morpho-taxonomic, genetic, and biochemical characterization of freshwater microalgae as potential biodiesel feedstock. *3 Biotech*, *9*(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1664-1>
- Siedlewicz, G., Korejwo, E., Szubska, M., Grabowski, M., Kwasigroch, U., & Bełdowski, J. (2020). Presence of mercury and methylmercury in Baltic Sea sediments, collected in ammunition dumpsites. *Marine Environmental Research*, *162*. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105158>
- Silverman', M. P., & Lundgren, D. G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*, *77*(5), 642-647. <https://doi.org/10.1128/jb.77.5.642-647.1959>
- Skrobonja, A., Gojkovic, Z., Soerensen, A. L., Westlund, P. O., Funk, C., & Björn, E. (2019). Uptake Kinetics of Methylmercury in a Freshwater Alga Exposed to Methylmercury Complexes with Environmentally Relevant Thiols. *Environmental Science and Technology*, *53*(23), 13757-13766. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05164>
- Thera, J. C., Kidd, K. A., Stewart, A. R., Bertolo, R. F., & O'Driscoll, N. J. (2022). Using tissue cysteine to predict the trophic transfer of methylmercury and selenium in lake food webs. *Environmental Pollution*, *311*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119936>
- Toimil García, A. (2021). *Aplicaciones farmacológicas y alimentarias de la microalga extremófila Coccoomyxa onubensis* [Tesis Doctoral]. Universidad de Huelva.
- Tredici, M. R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: Understanding the tools for the next green revolution. *Biofuels*, *1*(1), 143-162. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.10>
- Ulus, Y., Tsz-Ki Tsui, M., Sakar, A., Nyarko, P., Aitmbarek, N. B., Ardón, M., & Chow, A. T. (2022). Declines of methylmercury along a salinity gradient in a low-lying coastal wetland ecosystem at South Carolina, USA. *Chemosphere*, *308*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136310>
- Vaquero, I., Ruiz-Domínguez, M. C., Márquez, M., & Vílchez, C. (2012). Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccoomyxa onubensis*. *Process Biochemistry*, *47*(5), 694-700. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.016>



- Wong, J. F., Hong, H. J., Foo, S. C., Yap, M. K. K., & Tan, J. W. (2022). A review on current and future advancements for commercialized microalgae species. En *Food Science and Human Wellness* (Vol. 11, Número 5, pp. 1156-1170). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.04.007>
- Wu, P., Kainz, M. J., Bravo, A. G., Åkerblom, S., Sonesten, L., & Bishop, K. (2019). The importance of bioconcentration into the pelagic food web base for methylmercury biomagnification: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 646, 357-367. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.328>
- Zepeda Lupio, E. G. (2017). *Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga Dunaliella sp. en diferentes condiciones de cultivo* [Tesis Doctoral]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Zhu, Q., Guo, S. N., Wen, F., Zhang, X. L., Wang, C. C., Si, L. F., Zheng, J. L., & Liu, J. (2019). Transcriptional and physiological responses of *Dunaliella salina* to cadmium reveals time-dependent turnover of ribosome, photosystem, and ROS-scavenging pathways. *Aquatic Toxicology*, 207, 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.007>
- Zhu, Q., Zhang, M., Bao, J., & Liu, J. (2021). Physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal the dynamic redox homeostasis upon extended exposure of *Dunaliella salina* GY-H13 cells to Cd. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112593>