



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

Centro Regional Universitario Bariloche

Exposición de *Scenedesmus dimorphus* a Cr (VI): selección de cepas tolerantes, mecanismos de resistencia y remoción del metal

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad Nacional del Comahue
en el área de Biología

Lic. Regina María Toranzo

Directores: Dra. María Verónica Beligni
Dra. Carolina Bagnato
Dr. Gonzalo Luis Pérez

Lugar de Trabajo: Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, Centro Atómico Bariloche,
Comisión Nacional de Energía Atómica

RESUMEN

La presencia en el medio ambiente de metales como el cromo, el níquel y el cadmio ha ido en aumento desde la revolución industrial debido a su uso en procesos industriales. La contaminación por metales proviene, entre otras fuentes, de los procesos industriales, tales como la minería, la metalurgia, la producción de baterías, pinturas y plásticos, entre otros. La inadecuada disposición de los desechos de distintas industrias en sus procesos de producción ha provocado el enriquecimiento de metales en el ambiente. A la toxicidad de ciertos metales se suma el hecho de que no son biodegradables, pero si bioacumulables (acumulación del metal en los organismos) y biomagnificables (aumento de la concentración a medida que se avanza en la cadena trófica). Dentro de estos metales se encuentra el cromo que produce numerosas alteraciones en la fisiología de los organismos por lo cual es importante implementar tratamientos que lo remuevan de los efluentes previos a su disposición final. En las últimas décadas se han comenzado a utilizar organismos para el tratamiento de efluentes, proceso denominado biorremediación. La biorremediación, en parte, es consecuencia de la tolerancia de los organismos a los contaminantes y al desarrollo de mecanismos de detoxificación que implican entre otras cosas la degradación y/o remoción de los mismos. Las microalgas son organismos unicelulares que se encuentran en ambientes de agua dulce y salada. Distintas especies de algas pueden vivir en ambientes contaminados con metales dado que presentan diversos mecanismos para reducir los efectos adversos. El desarrollo de una tecnología de remediación por microalgas requiere del conocimiento de la toxicidad específica de los metales y de la comprensión de los mecanismos de tolerancia y/o resistencia. Con este objetivo, en este trabajo se generó una cepa de *Scenedesmus dimorphus* resistente a Cr (VI) (cepa **CRS**: *Chromium Resistant Strain*, según sus siglas en inglés) que fue caracterizada en su capacidad de resistir la exposición al metal de manera comparada con la cepa control (**WT**: *Wild Type*).

Los resultados de este trabajo mostraron que ante la presencia del metal se producen en ambas cepas (WT y CRS) cambios drásticos en la morfología y en la formación de los cenobios. Asimismo, la tasa de crecimiento (μ) de CRS no se ve afectada cuando la cepa es expuesta al metal, mientras que la μ de la cepa WT se reduce a la mitad. Por otro lado, ante la presencia del Cr (VI), se observa que en ambas cepas hay una disminución en la concentración de clorofila *a* y *b*. Por el contrario, cuando las dos cepas son expuestas a Cr (VI), se evidencia un incremento en la producción de pigmentos accesorios (carotenoides, compuestos antioxidantes), que mostró ser mayor en CRS. Además, el metal induce la acumulación de triglicéridos y especies reactivas del oxígeno (ROS) en la cepa WT en una cantidad significativamente mayor que en la cepa CRS. Asimismo, se demostró que ambas cepas excluyeron por igual al Cr (VI) del interior celular. De esta manera se encontró que la

resistencia no contribuyó a mejorar la biorremediación de metal ya que ambas cepas evitan de forma equivalente la absorción/adsorción del Cr (VI). En el caso de la cepa CRS, se comprobó que, además de la exclusión del Cr (VI), la cepa secreta compuestos que disminuyen la toxicidad del metal. Por último, se realizaron estudios de remoción que confirmaron que una alta densidad celular y pHs bajos son las condiciones ideales para la remoción de Cr (VI). Sin embargo, en estas condiciones experimentales tampoco se encontraron diferencias en las eficiencias de remoción entre las cepas WT y CRS.

De lo observado podemos concluir que la cepa CRS muestra resistencia al Cr (VI) respecto de la cepa WT, dado que su proliferación no se ve modificada frente al metal. Además, se comprobó que la cepa CRS evitaría el estrés oxidativo generado por el metal mediante la liberación de exudados que actúan en simultáneo con la exclusión del Cr (VI). Asimismo, se demostró que ante la presencia del metal hay aumento en la síntesis de carotenoides que ayudaría a mitigar los efectos tóxicos del Cr (VI). Finalmente, la exclusión del metal va en detrimento de la remoción del Cr (VI) ya que, aunque la resistencia mejora la *performance* de la cepa CRS, esto no se ve reflejado en su capacidad de remoción de Cr (VI).

Palabras claves: algas, cromo, exclusión de metales, exudados, pigmentos accesorios, resistencia.

ABSTRACT

Since the industrial revolution, the presence in the environment of metals such as chromium, nickel and cadmium has been increasing due to their industrial applications. Metal pollution originates, among other sources, from industrial processes that include mining, metallurgy and production of batteries, paints and plastics. Inadequate waste disposal during industrial production is the main cause of metal enrichment in the environment. In addition to their toxicity, metals are not biodegradable and are bioaccumulable (they accumulate in living organisms) and biomagnifiable (their concentration increases within the food chain). Chromium is a metal that produces many alterations in the physiology of living organisms, hence, its removal prior to effluent disposal is fundamental. In the last few decades, the use of living organisms for wastewater treatment has become frequent, a process named bioremediation. Bioremediation is, in part, a natural consequence of the tolerance of organisms to pollutants and their detoxification response, which includes contaminant degradation and/or removal. Microalgae are unicellular organisms found in both freshwater and marine environments. Many species can live in metal-polluted environments, since they have diverse mechanisms to reduce their harmful effects. The development of a bioremediation technology using microalgae requires knowing the specific toxicity of metals and the tolerance or resistance mechanisms of algae. With this goal in mind, in this work, a strain of *Scenedesmus dimorphus* resistant to Cr (VI) (**CRS** strain: Chromium Resistant Strain) was generated and characterized in its ability to resist the metal, in comparison with a control strain (**WT**: Wild Type).

The results of this work showed that, when exposed to the metal, changes in cell morphology and coenobia formation occur in both strains, being considerably more drastic in the WT strain. The growth rate (μ) of the CRS strain remains unmodified when cells are exposed to the metal, whereas it is reduced to half in the WT strain. When exposed to Cr (VI), both strains undergo a reduction in the content of chlorophylls *a* and *b* and a relative increase in accessory pigments (carotenoids, with antioxidant function), being this increase more evident in the CRS strain. Chromium (VI) also triggers ROS formation and lipid accumulation in the WT strain, whereas these parameters are not modified in CRS cells. Despite the resistance to Cr (VI) of CRS cells, both strains exclude the metal from the cell interior to the same extent. As a consequence, CRS resistance does not contribute to bioremediating the metal, since both strains avoid Cr (VI) absorption/adsorption to the cell similarly. In the case of CRS, in addition to metal exclusion, the cells secrete compounds that reduce the toxicity of the metal. Lastly, metal removal experiments demonstrated that, at a high cell density and low pH, Cr (VI) is removed from the media considerably and equivalently in both strains, using the biomass as a biosorbent.

Altogether, we conclude that the CRS strain has resistance to Cr (VI) in comparison with the WT strain, given that its proliferation is not affected when exposed to the metal. In addition, CRS cells avoid oxidative stress caused by the metal by releasing compounds that reduce metal toxicity, in conjunction with the natural ability of the cells to exclude Cr (VI). In addition, exposure to the metal triggers an accessory pigment response in the form of carotenoid increase that could help mitigate the deleterious effects of Cr (VI). Finally, metal exclusion offsets metal bioremediation. In this scenario, despite the fact that resistance improves strain performance, this is not reflected in increased metal removal from the media.

Keywords: Accessory pigments, algae, cell exudates, chromium, metal exclusion, resistance.

Quiero agradecer,

A Carito, por haber confiado en mí desde en un principio, por haber transitado conmigo estos años y por abrirme las puertas a este mundo académico. Gracias por el tiempo que le dedicas a formar gente y por todas las oportunidades brindadas, gracias por tu paciencia, tu comprensión, tu contención y, en particular, gracias por ese empuje que te caracteriza. Me siento muy agradecida por haberte tenido como directora y por haber podido pasar tiempo con vos afuera del laboratorio.

A Vero, quien es una excelente formadora, agradezco el haberte tenido como directora. Me demostraste que no es necesario estar en el mismo lugar para estar presente. Gracias por todo lo que me enseñaste, por la paciencia y por siempre estar al otro lado del teléfono cuando te necesité (que fueron muuuuchas veces). Debo destacar también tu buena onda y tu sentido del humor, fueron un plus del que no puedo dejar de hablar.

A Gonza, por haber confiado en mí para poder llevar adelante este trabajo, por tus conocimientos, tus críticas, tus comentarios y tus sugerencias durante el desarrollo de esta Tesis. En especial, por tu generosidad y tu paciencia.

A Gise, qué decirte a vos Ferraro si durante esta Tesis fuiste mi jefa, mi compañera de laboratorio y de joda, mi contención, mi guía, mi psicóloga, fuiste el abrazo cuando lo necesité, pero lo más importante de todo, durante este proceso te convertiste en mi amiga. Este logro no es sólo mío, también es tuyo, gracias Gi.

A Cris, no sé ni por dónde empezar a agradecerte, la Guibaldo, mi amiga del alma, la que siempre está para mí, la que me malcría con un helado cuando estoy mal, la que me acompaña a todos lados, mi compañera de salidas, viajes, juntadas y aventuras. Agradezco enormemente el haber ido a Bariloche porque me dio la oportunidad de conocerte a vos y a esa Negrita que tanto amo.

Al Fede, mi amigo/asesor/consejero, gracias por todos estos años de amistad, gracias por la paciencia que me has tenido siempre y por siempre estar para ayudarme en todo, tanto a nivel personal como profesional, no quiero ni pensar la cantidad de favores que te debo.

Al Pumita, Marcita (la Brujita), el Aguuus, Samy (Sameeee), Maru, Alan, el Gael, la Mary, el Ale mi viejo y el Migue, mi familia de Bariloche, mis amigos, mis compañeros de juntadas y salidas, gracias por su amistad. En particular, gracias al Agus y a Marcita, por abrirme las puertas a sus vidas desde el primer día cuando caí de paracaidista a la oficina.

A Magui, Marie y Estefi, gente linda que conocí en Bariloche y que se convirtieron en grandes amigas, gracias por todos estos años compartidos y por siempre estar al pie del cañon para bancarme en todo, gracias las pibas!

A Clau, la Curti, Juan, Yami, la Negra, Pauli y Wendy, gracias por enseñarme que cuando estas rodeada de gente linda la vida se disfruta a pleno, gracias por tantas juntadas y risas.

A mi mamá, por ser una excelente madre y por darme todo su amor y comprensión a lo largo de mi vida. A mi abuela Ángela, por haber sido una persona muy importante en mi vida y por haberme dejado hermosos recuerdos, desearía que aun estuvieses conmigo.

A la Juli, quien llegó a mi vida de imprevisto y, quien desde entonces, me saca una sonrisa todos los días. Gracias por enseñarme a ver la vida con otros ojos, gracias por tu apoyo y por tu contención, en especial gracias por ese abrazo que me recarga de energía para seguir adelante.

A Edison, el colombiano boy, mi compañero de vivienda, el que se convirtió en una mezcla de amigo, de hermano, de psicólogo, de compañero de cocina, quien hace ese arroz con pollo que me hace tan feliz. Gracias colombiano boy por tu paciencia, por tu comprensión y por tu compañía. Agradezco enormemente el tenerte en mi vida.

A Mary, Marie, Ceci, Pame, Ro, Yas, Gonza y Chris, porque me demostraron que cuando la amistad es verdadera la distancia no importa.

A mis compañeros del lab, Gise, Marie, Jere, Estefi, Mica y Delfi, por hacer del laboratorio un excelente lugar de trabajo, gracias por todo lo compartido y por tantas risas.

A mis compañeros del IEDS, en especial a Valentín, Fabrizio, Quatri y Mauri por haber transitado conmigo todo el doctorado y por siempre estar dispuestos a ayudarme.

A los chicos del Departamento de FQ del CTP, en particular a Manu, JP, Andrea, Esteban, Georgina, Ariel, Ana, Dani, Fabiola, por siempre darme una mano en todo y, en especial, por haberme hecho parte de su grupo durante numerosos almuerzos.

A la gente del CAB, en particular a Claudia, Rolo, Pancho, René, Sandro, Matías, Paula, Manu, Enio, Roberto y Mariana, por su profesionalismo y buena predisposición y, en particular, por su buena onda siempre que fui a molestar con algo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por beneficiarme con la beca con la que pude realizar mi doctorado. A la CNEA, en especial al Dr. Pasquevich, por darme un lugar de trabajo y los recursos para poder realizar esta Tesis. Al Departamento de Físicoquímica y Control de Calidad del CTP, por las mediciones realizadas que fueron necesarias para el desarrollo de esta Tesis.

Simplemente gracias!

*A mi mamá,
por darme todo,
por siempre estar.*

“Ningún marinero se hizo experto en un mar en calma” (Lecciones de A.N.)

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 La problemática asociada al incremento de los metales en el medioambiente.....	2
1.2 Cromo: fuentes de contaminación.....	4
1.3 Regulaciones y límites en la descarga de cromo al medioambiente	7
1.4 Especiación del cromo	8
1.5 Toxicidad del cromo	12
1.6 Tratamiento de efluentes contaminados con metales.....	14
1.7 Capacidad de remoción del cromo utilizando distintos microorganismos	18
1.8 Las microalgas	19
1.9 Biorremediación usando microalgas.....	23
1.10 Microalgas: mecanismos de detoxificación	27
1.11 Mecanismos de remoción de cromo mediante el uso de microalgas	28
1.12 Hipótesis General	32
1.13 Objetivo General	32
2. Materiales y Métodos.....	33
2.1 Selección, cultivo y mantenimiento de las cepas	34
2.2. Preparación de la solución stock de cromo (VI).....	34
2.3 Cuantificación de cromo	35
2.4 Determinación de la dosis experimental de Cr (VI)	38
2.5 Generación y caracterización de la cepa resistente a Cr (VI).....	40
2.5.1 Determinación de la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación celular	41
2.5.2 Estudio de la resistencia de la cepa resistente (CRS)	42
2.5.3 Determinación de la tasa de mortalidad	42
2.6 Efectos del Fe del medio de cultivo en la reducción del Cr (VI).....	43
2.7 Efectos del metal sobre las cepas resistente (CRS) y <i>wild type</i> (WT)	44
2.7.1 Observaciones al microscopio de los cultivos en búsqueda de signos de estrés.....	44
2.7.2 Determinación de la inducción de estrés oxidativo: análisis de los niveles de ROS y de la actividad de catalasa	45
2.7.3 Análisis de la acumulación de lípidos	48
2.7.4 Determinación del coeficiente de absorción particulado y análisis de los pigmentos	50
2.7.5 Producción de exudados por exposición a cromo y análisis del crecimiento de las cepas resistente (CRS) y <i>wild type</i> (WT).....	52
2.7.6 Análisis de los grupos funcionales y de las macromoléculas de la pared celular	55
2.8 Ensayos de remoción de cromo	56
2.9 Análisis estadísticos.....	57

3. Resultados	58
3.1 Ensayo preliminar y determinación del índice CI50-72hs.....	59
3.2. Generación de la cepa resistente.....	61
3.3 Determinación de la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa resistente (CRS)	63
3.4 Caracterización de la cepa resistente (CRS): Estudio de la resistencia al cromo y determinación de la tasa de mortalidad	64
3.5 Efecto del Cr (VI) en la morfología de las cepas <i>wild type</i> (WT) y resistente (CRS)	71
3.5.1 Microscopía óptica	71
3.5.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	75
3.6 Efectos del medio de cultivo en la reducción del Cr (VI)	78
3.7 Efecto del cromo en la inducción de estrés oxidativo: especies reactivas del oxígeno (ROS).....	80
3.8 Efecto del cromo en la actividad enzimática de la catalasa.....	85
3.9 Efecto del cromo en la acumulación de lípidos	86
3.10 Efecto del cromo en el cloroplasto	88
3.11 Efecto protector de los exudados de la cepa resistente (CRS) en la toxicidad del cromo.....	99
3.12 Efecto del cromo en los grupos funcionales de la pared celular	103
3.13 Remoción de cromo	106
4. Discusión.....	112
4.1 Generación de la cepa resistente: efectos del cromo en el crecimiento y en la morfología.....	113
4.2 Efectos del Fe en la reducción del Cr (VI).....	117
4.3 Efectos del cromo en la fisiología y mecanismos de detoxificación de las cepas <i>wild type</i> (WT) y CRS	118
4.3.1 Efecto del Cr (VI) en la generación de estrés oxidativo.....	118
4.3.2 Efecto del Cr (VI) en la acumulación de lípidos	120
4.3.3 Efectos del Cr (VI) en el cloroplasto: Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores	122
4.3.4 Efecto protector de los exudados.....	125
4.4 Interacción del cromo con la pared celular y remoción del metal	126
4.4.1 Efecto del Cr (VI) en la pared celular	126
4.4.2 Remoción de cromo.....	128
5. Conclusiones.....	131
5.1 Conclusiones	132
5.2 Perspectivas a futuro	137
6. Referencias	139
7. Trabajo de respaldo.....	154

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Agentes contaminantes por rubro (establecimientos industriales y de servicios de la Cuenca Matanza Riachuelo que operan por fuera de la normativa ambiental)	3
Figura 1.2. Descargas de cromo al agua en China desde 1990 al 2009	7
Figura 1.3. Abundancia de las formas del Cr (VI) en solución acuosa en función del pH.....	11
Figura 1.4. Árbol filogenético donde se muestra la clasificación de las algas a nivel de las jerarquías más altas.....	20
Figura 1.5. Morfotipo de <i>Scenedesmus dimorphus</i> como ejemplo de una especie del género <i>Scenedesmus</i> sp. y ciclos de vida de dicho género	22
Figura 1.6. Diagrama de la interacción del Cr (VI) con la célula microalgal	30
Figura 2.1. Reacción de la 1,5-difenilcarbazida (DPC) con el Cr (VI)	35
Figura 2.2. Esquema de la preparación de las muestras para la determinación de Cr (VI) mediante el uso de 1,5-difenilcarbazida (DPC)	36
Figura 2.3. Curva de calibración característica para la determinación de Cr (VI) mediante el método de la 1,5-difenilcarbazida (DPC).....	37
Figura 2.4. Diseño de la cámara de iluminación	39
Figura 2.5. Imagen de la cámara de iluminación utilizada en los experimentos.....	40
Figura 2.6. Esquema donde se muestran los pasos seguidos en la generación de la cepa resistente por exposición a cromo (VI)	41
Figura 2.7. Reacción del marcador fluorescente dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) al ingresar a la célula e interactuar con las ROS.....	46
Figura 2.8. Esquema de la preparación de las muestras para la determinación de ROS mediante el uso de dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA)	47
Figura 2.9. Esquema de la preparación de las muestras para realizar la determinación de la actividad enzimática	48
Figura 2.10. Reacción de la formación del compuesto coloreado para la determinación de lípidos usando sulfo-fosfo-vainillina (SPV)	49
Figura 2.11. Esquema de la preparación de las muestras para la determinación de lípidos usando sulfo-fosfo-vainillina (SPV).....	50
Figura 2.12. Esquema de la preparación de las muestras en la técnica “ <i>filter pad technique</i> ”	51
Figura 2.13. Esquema de la preparación de las muestras para la extracción de pigmentos mediante el uso de metanol.....	52
Figura 2.14. Esquema de la generación de los exudados de cada cepa y su uso en los tratamientos.....	54
Figura 2.15. Esquema de la generación de los exudados de cada cepa y su uso en los tratamientos	55
Figura 3.1. Determinación de la CI50-72hs mediante el ajuste a una curva dosis-respuesta de regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism.....	60
Figura 3.2. Imagen del ensayo de la generación de la cepa resistente	62
Figura 3.3. Generación de la cepa de <i>S. dimorphus</i> resistente a cromo (CRS)	62

Figura 3.4. Generación de la cepa de <i>S. dimorphus</i> resistente a cromo (CRS): Apariencia y coloración de los cultivos	63
Figura 3.5. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (T_2) de las cepas WT y CRS.....	64
Figura 3.6. Densidad celular de las cepas WT y CRS al ser expuestas a 0 mg/L, 1,3 mg/L, 1,95 mg/L y 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs.....	65
Figura 3.7. Crecimiento de las cepas WT y CRS al ser expuestas a 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs.....	66
Figura 3.8. Puesta a punto de la tinción con safranina 0,25% p/V para detectar la presencia de células muertas	67
Figura 3.9. Viabilidad de las células en ausencia de cromo	68
Figura 3.10. Efecto del cromo en la viabilidad de las células.....	69
Figura 3.11. Efecto del cromo en la viabilidad de las células.....	70
Figura 3.12. Efecto del cromo en la morfología de las células.....	73
Figura 3.13. Efecto del cromo en la morfología de las células.....	74
Figura 3.14. Morfología de las cepas WT y CRS en ausencia del metal	76
Figura 3.15. Morfología de las cepas WT y CRS en presencia del metal	77
Figura 3.16. Efecto del Fe presente en el medio de cultivo en la reducción del Cr (VI) a Cr (III).....	79
Figura 3.17. Efecto del Fe presente en el crecimiento de las cepas WT y CRS.....	79
Figura 3.18. Imagen de la disposición de los viales en la incubadora durante el experimento	80
Figura 3.19. Efecto del cromo en la generación de ROS.	82
Figura 3.20. Efecto del cromo en la generación de ROS.....	83
Figura 3.21. Efecto del cromo en la generación de ROS en las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI).....	84
Figura 3.22. Efecto del cromo en la generación de ROS en las cepas WT y CRS	85
Figura 3.23. Efecto del cromo en la actividad enzimática de la catalasa en las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI).....	86
Figura 3.24. Imagen de la curva de calibración utilizada para la determinación de lípidos totales mediante la técnica de la sulfo-fosfo-vainillina (SPV)	87
Figura 3.25. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales mediante la técnica de la sulfo-fosfo-vainillina (SPV)	87
Figura 3.26. Efecto del cromo en la síntesis de lípidos totales en las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 0, 1,95 y 2,6 mg/L de Cr (VI).....	88
Figura 3.27. Imagen de los filtros con las muestras que fueron analizadas por espectrofotometría usando la técnica “ <i>filter pad technique</i> ”	90
Figura 3.28. Efecto del cromo en el cloroplasto y en los pigmentos: Análisis de la absorción particulada <i>in vivo</i> mediante “ <i>filter pad technique</i> ”	91
Figura 3.29. Imagen de los extractos de las muestras que fueron analizadas por espectrofotometría	92
Figura 3.30. Efecto del cromo en el cloroplasto: Análisis de pigmentos en HL (<i>Higher Light</i> , según sus siglas en inglés). Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs.....	93

Figura 3.31. Efecto del cromo en el cloroplasto: Análisis de pigmentos en LL (<i>Lower Light</i> , según sus siglas en inglés). Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs.....	95
Figura 3.32. Análisis estadístico de los 3 coeficientes obtenidos en las Figura 3.30 B y 3.31 B: Abs (417), Abs (437), y Abs (470) están normalizados al pico de clorofila α (665).....	96
Figura 3.33. Crecimiento de las cepas WT y CRS en el experimento de luz reducida	97
Figura 3.34. Efecto del cromo en el cloroplasto y en los pigmentos: Análisis de pigmentos. Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs.....	98
Figura 3.35. Efecto de los exudados con cromo de las cepas WT y CRS en la proliferación	100
Figura 3.36. Efecto del exudado con cromo de la cepa CRS en la proliferación de la cepa WT.....	102
Figura 3.37. Efecto del exudado con cromo de la cepa CRS en la proliferación de la cepa WT.....	102
Figura 3.38. Efecto del cromo en la pared celular	104
Figura 3.39. Efecto del cromo en la pared celular: Espectros de FTIR normalizados por proteína.....	105
Figura 3.40. Determinación de cromo en el sobrenadante de las cepas WT y CRS luego del tratamiento con el metal.....	107
Figura 3.41. Determinación de cromo en el sobrenadante de las cepas WT y CRS luego del tratamiento con Cr (VI).....	107
Figura 3.42. Experimento de remoción de cromo usando las cepas WT y CRS: pH 6,8.....	109
Figura 3.43. Experimento de remoción de cromo usando las cepas WT y CRS: pH 2.....	110
Figura 3.44. Efecto del cromo en la pared celular: Espectros del FTIR de los cultivos de WT y CRS luego de ser expuestos a 100 mg/L de Cr (VI) a pH de 6,8 durante 10 días (A) y a pH de 2 durante 24 horas (B).....	111
Figura 5.1. Modelo de la interacción entre el Cr (VI) y las cepas WT y CRS	136

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Concentración de cobre, cromo y zinc en sedimentos en 4 zonas de la Cuenca Matanza Riachuelo: Río Reconquista, Canal Hidalgo (afluente del Río Reconquista), Embalse Dique Ingeniero Roggero (cuenca alta del Reconquista) y Canal José León Suárez (afluente del Río Reconquista)	4
Tabla 1.2. Compuestos de cromo y sus usos industriales.....	6
Tabla 1.3. Eficiencias de bioremovición de Cr (VI) por diferentes organismos expresadas con el índice capacidad de remoción (mg de Cr/g de biomasa)	18
Tabla 2.1. Preparación de la curva de calibración para la determinación de Cr (VI) mediante el método de la 1,5-difenilcarbazida (DPC)	37
Tabla 3.1. Selección de la densidad celular según el criterio de aceptabilidad de la OECD (2006).....	59
Tabla 3.2. Ensayo preliminar: Tasa de crecimiento (μ) e inhibición del crecimiento de <i>S. dimorphus</i> ante la exposición a Cr (VI)	60
Tabla 3.3. Tasa de mortalidad luego de la exposición al cromo	71
Tabla 3.4. Concentración de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> , y carotenoides	99
Tabla 3.5. Picos seleccionados de la Figura 3.39	105
Tabla 3.6. Comparación de las dosis de Cr (VI) por cada célula en experimentos de toxicidad y en experimentos de remoción	108
Tabla 3.7. Peso seco y capacidad de remoción (<i>q</i>) de las cepas WT y CRS.....	110
Tabla 4.1. Concentración de Fe (M) en distintos medios de cultivos para microalgas.....	118
Tabla 4.2. Capacidad de remoción (<i>q</i>) de Cr (VI) por diferentes especies de algas verdes.....	130

LISTADO DE ABREVIATURAS

Cr (VI): cromo hexavalente

CRS: *Chromium Resistant Strain*, según sus siglas en inglés

DCFH-DA: dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato

DPC: 1,5-difenilcarbazida

FT-IR: *Fourier Transform Infrared spectroscopy*, según sus siglas en inglés

HL: *Higher Light*, según sus siglas en inglés

LL: *Lower Light*, según sus siglas en inglés

QFT: *Quantitative Filter Technique*, según sus siglas en inglés

WT: *Wild Type*, según sus siglas en inglés

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La problemática asociada al incremento de los metales en el medioambiente

Los metales se encuentran de forma natural en la corteza terrestre, por esta razón se los halla en los suelos, sedimentos, agua y en los organismos (Kaplan, 2013; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Algunos metales, como por ejemplo Zn, Cu, Mn, Ni y Co, son micronutrientes necesarios para el metabolismo de los organismos, pero en concentraciones elevadas tienen efectos adversos. Otros metales, como el Cd, el Pb y el Hg, no tienen actividad biológica, y por lo tanto son tóxicos para los seres vivos, incluso cuando se encuentran en concentraciones muy bajas (Kaplan, 2013; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Asimismo, la presencia de metales en el medioambiente ha ido en aumento desde la revolución industrial, encontrándoselos en la actualidad en concentraciones muy superiores a las normales (Jobby et al., 2018; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). La contaminación por metales se debe al uso de los mismos en procesos industriales, tales como la minería, la metalurgia, la producción de baterías, pinturas y plásticos, entre otros (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). La inadecuada disposición de los desechos de estas industrias provoca el enriquecimiento de metales en suelos, ríos, arroyos y aguas subterráneas (Jobby et al., 2018). A la toxicidad de ciertos metales se suma que no son biodegradables, son bioacumulables (acumulación del metal en los organismos) y biomagnificables (aumento de la concentración a medida que se avanza en la cadena trófica) (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). A modo de ejemplo, en Argentina se puede describir una situación en la Cuenca Matanza Riachuelo en la cual se vierten efluentes de numerosas industrias y es la región ambiental más degradada del país. Un informe elaborado por la Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo en 2017 (ACUMAR) relevó un total de 16.701 industrias localizadas en la Cuenca Matanza Riachuelo de las cuales 1.385 fueron declaradas como agentes contaminantes (Figura 1.1) (Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR), 2017). Incluso, en dicha cuenca se han determinado concentraciones de varios metales como el Cu, Cr y Zn en el sedimento que superan ampliamente los niveles guía de calidad para sedimentos establecidos por la

normativa holandesa (marco de referencia utilizado dada la ausencia de niveles guía nacionales para sedimentos) (Tabla 1.1) (Porzionato, 2016).

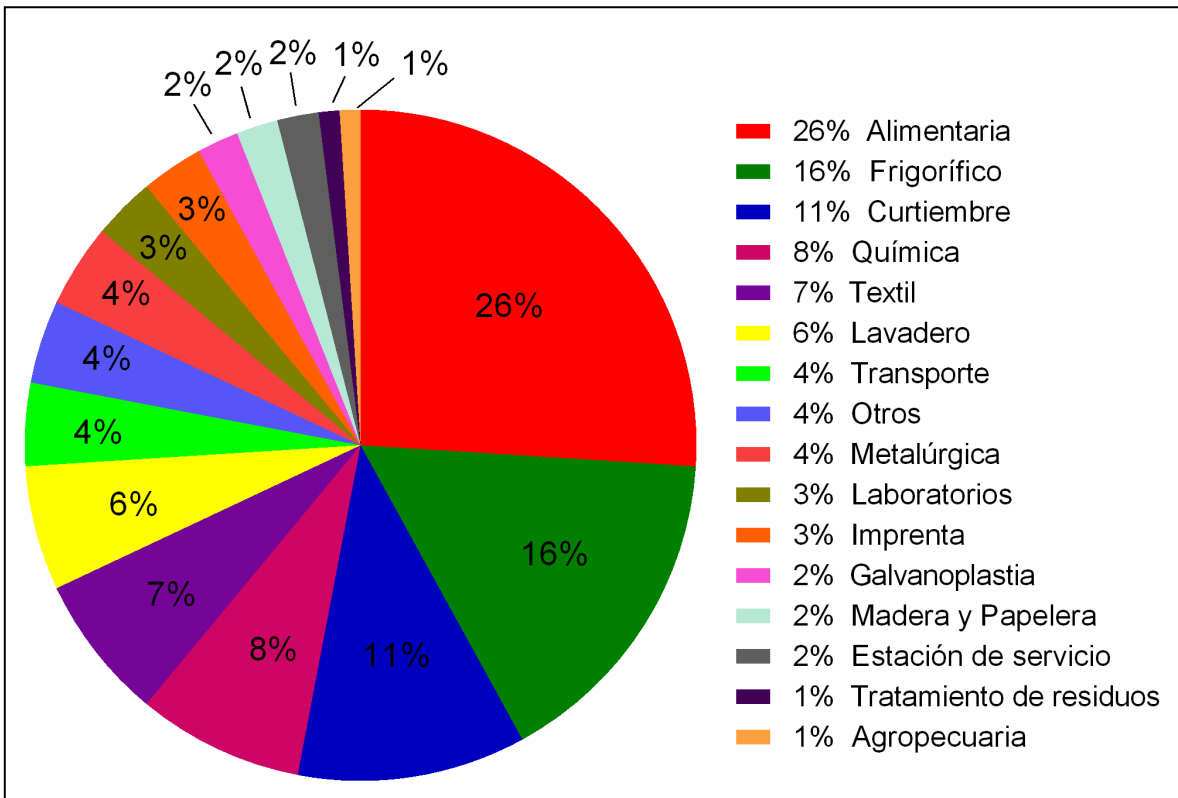


Figura 1.1. Agentes contaminantes por rubro (establecimientos industriales y de servicios de la Cuenca Matanza Riachuelo que operan por fuera de la normativa ambiental). Fuente: <http://datos.acumar.gob.ar/dataset/agentes-contaminantes-de-la-cuenca-matanza-riachuelo-agosto-2017/archivo/e12d5ebe-aa89-4557-9a44-8a1d92ad1850>. Fecha de acceso al link: 10/10/2020

Tabla 1.1. Concentración de cobre, cromo y zinc en sedimentos en 4 zonas de la Cuenca Matanza Riachuelo: Río Reconquista, Canal Hidalgo (afluente del Río Reconquista), Embalse Dique Ingeniero Roggero (cuenca alta del Reconquista) y Canal José León Suárez (afluente del Río Reconquista). Todos los valores se expresan en mg de metal/Kg de peso seco de sedimento (Porzionato, 2016). *Holanda. Sediment Quality Guidelines (2006).

	Cobre	Cromo	Zinc
Río Reconquista	115	105	450
Canal Hidalgo	630	2540	1020
Dique Roggero	6	<0,1	4
Canal J.L. Suarez	247	118	980
Normativa Holandesa*	36	100	140

1.2 Cromo: fuentes de contaminación

El cromo fue descubierto en 1789 por Vauquelin al aislarlo a partir de una muestra de un mineral, la crocoíta ($PbCrO_4$) (Losi et al., 1994; Mishra & Bharagava, 2016; Verger et al., 2018; Weeks, 1932). Su nombre deriva del griego, donde “*chroma*” significa color y fue sugerido por Haüy debido a los compuestos coloreados que forma (Losi et al., 1994; Verger et al., 2018; Weeks, 1932). El cromo ocurre de forma natural como cromita ($FeO \cdot Cr_2O_3$) y la gran mayoría de los depósitos geológicos se hallan en Sudáfrica, Albania y Kazajistán (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Elahi et al., 2020; Losi et al., 1994; Mishra & Bharagava, 2016; Pradhan et al., 2017) y, en menor medida, en Zimbawe, Filipinas y Turquía (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Losi et al., 1994). El cromo es un metal de transición y es el 21^{er} elemento más abundante en la corteza terrestre (Cervantes et al., 2001; Chandra & Kulshreshtha, 2004; Losi et al., 1994; Mishra & Bharagava, 2016). Las características físico-químicas de este metal, tales como su dureza, su brillo, la gama de colores de los diferentes compuestos que forma, sus elevados puntos de fusión y ebullición, y sus propiedades anti corrosivas, lo han convertido en un insumo muy valioso y requerido por su uso en procesos industriales (Elahi et al., 2020; Mishra & Bharagava, 2016; Pradhan et al., 2017). La contaminación ambiental por cromo se debe a su uso en

metalurgia, en aleaciones (por ejemplo acero inoxidable), en galvanoplastia y en industrias químicas (en particular la del curtido del cuero), en la producción de pigmentos, pinturas, vidrios, cerámicos y cemento y en la preservación de la madera, entre otros (Tabla 1.2) (Elahi et al., 2020; Losi et al., 1994; Pradhan et al., 2017). La Figura 1.2 muestra un claro ejemplo del incremento de la concentración de cromo en el agua causados por desechos originados en la combustión de los combustibles, la industria de extracción y procesamiento de metales no ferrosos, las industrias químicas entre ellas la del curtido del cuero, las industrias de la fabricación de metales y las de fundición y prensado de metales no ferrosos (Cheng et al., 2014). Una de las principales industrias que utiliza cromo son las curtiembres para el curtido del cuero y, durante el proceso, gran parte del cromo es descartado en el efluente (Jobby et al., 2018; Mishra & Bharagava, 2016). Asimismo, se ha reportado que estas industrias generan más de 40 millones de toneladas por año de desecho (Jobby et al., 2018). En relación a esto se ha reportado que en países como Australia, Bangladesh e India, numerosas zonas agrícolas y cuerpos de agua se encuentran extremadamente contaminados por la eliminación de desechos de curtiembres (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Jobby et al., 2018). Cabe destacar que solamente India produce aproximadamente entre unas 2.000-32.000 toneladas de desechos con cromo de las curtiembres y que la concentración del metal en estos efluentes es entre 2 y 5 g/L (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Jobby et al., 2018; Mishra & Bharagava, 2016). En Argentina, las curtiembres son una industria tradicional desde fines del siglo XIX y están asociadas al desarrollo de la ganadería y de la industria frigorífica. Actualmente, dentro de la Cuenca Matanza Riachuelo hay unas 67 curtiembres en funcionamiento que descargan efluentes que contienen cromo (Fuente: <https://www.acumar.gob.ar/parque-curtidor/curtiembres-la-cuenca/>. Fecha de acceso al link: 10/10/2020).

Tabla 1.2. Compuestos de cromo y sus usos industriales (Losi et al., 1994; Mishra & Bharagava, 2016).

Compuesto	Fórmula	Uso industrial
Cromo (VI)		
Óxido de cromo (VI)	CrO_3	Galvanoplastia (cromado), preservación de maderas.
Cromato de bario	BaCrO_4	Pigmentos en pinturas, en tinturas y en plásticos, metalurgia (recubrimientos anticorrosión), pirotecnia, baterías de alta temperatura.
Cromato de plomo	PbCrO_4	Pigmentos en pinturas, en tinturas y en plásticos, curtido del cuero.
Cromato de zinc	ZnCrO_4	Pigmentos en pinturas, en tinturas y en plásticos, metalurgia (recubrimientos anticorrosión).
Cromato de calcio	CaCrO_4	Pigmentos en pinturas, en tinturas y en plásticos, metalurgia (recubrimientos anticorrosión), baterías de alta temperatura, imprimaciones para metales.
Dicromato de potasio	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Pigmentos en pinturas, en tinturas y en plásticos, metalurgia (acero inoxidable).
Cromato de sodio	Na_2CrO_4	Pigmentos en pinturas, en tinturas y en plásticos, metalurgia (recubrimientos anticorrosión, acero inoxidable).
Cromato de estroncio	SrCrO_4	Metalurgia (recubrimientos anticorrosión), aditivo de enchapados.
Cromato de mercurio	HgCrO_4	Recubrimiento <i>antifouling</i> .
Cromato de magnesio	MgCrO_4	Inhibidor de corrosión en turbinas de gas, material refractario.
Dicromato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Curtido del cuero, metalurgia (acero inoxidable), imprenta.
Cromo (III)		
Óxido de cromo (III)	Cr_2O_3	Pigmentos en pinturas, en tinturas y en plásticos.
Acetato de cromo	$\text{C}_{12}\text{H}_{36}\text{ClCr}_3\text{O}_{22}$	Imprenta; tinturas para textiles, preservación de textiles.
Sulfato de cromo	$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$	Catalizadores, emulsiones fotográficas.
Cloruro de cromo hexahidratado	$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Mordiente, curtido del cuero, formación de complejos orgánicos.
Cromita de hierro	$\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$	Material refractario y obtención de cromo metálico.
Cromita de cobre	CuCr_2O_4	Catalizadores.
Cromita de magnesio	MgCr_2O_4	Material refractario.

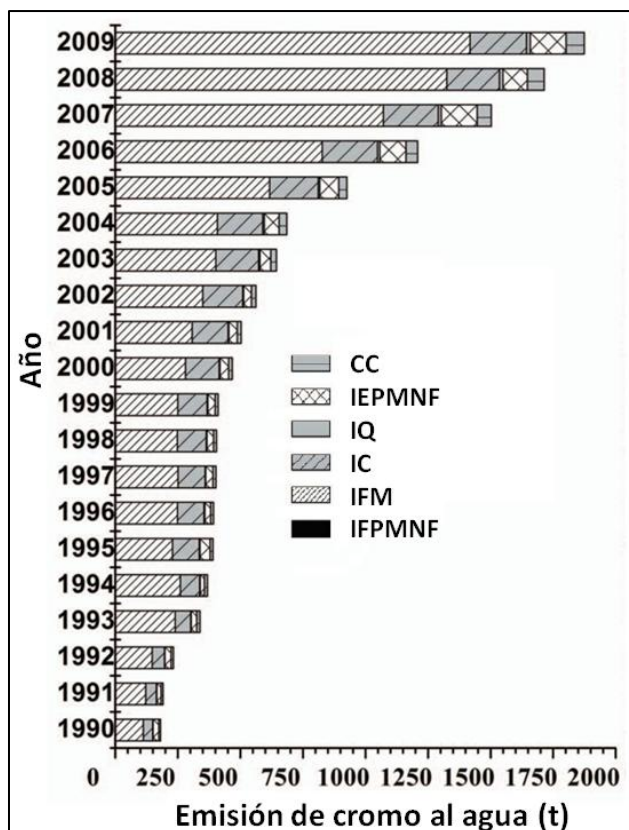


Figura 1.2. Descargas de cromo al agua en China desde 1990 al 2009. Gráfico tomado de Cheng (2014) y reproducido con autorización del Professor Cheng (Cheng et al., 2014). CC: combustión de los combustibles; IEPMNF: Industria de extracción y procesamiento de metales no ferrosos; IQ: Industrias químicas; IC: Industrias del cuero; IFM: Industrias de la fabricación de metales; IFPMNF: Industria de fundición y prensado de metales no ferrosos, t: tonelada.

1.3 Regulaciones y límites en la descarga de cromo al medioambiente

En Argentina, según la resolución 336/03 de la Autoridad del Agua (ADA), el límite para el vertido de cromo indica que este debe ser menor a 2 mg/L de cromo total y menor a 0,2 mg/L de cromo (VI) tanto para la colectora cloacal como para el cuerpo de agua superficial, mientras que no se pueden descargar efluentes con cromo total ni con cromo hexavalente en suelos. Adicionalmente, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la USEPA (*United States Environmental Protection Agency*, según sus siglas en inglés) el límite de cromo total en el agua potable no debe superar los 0,05 mg/L y los 0,1 mg/L, respectivamente (World Health Organization (WHO), 2003; United States Environmental

Protection Agency (USEPA), 2009). Incluso la USEPA ha definido al Cr (VI) como uno de los 17 químicos más peligrosos para los seres humanos (Jobby et al., 2018; United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2009). Dada la regulación y lo establecido por la OMS, los efluentes generados por las industrias que presentan altas concentraciones de cromo deben ser tratados previamente a su vertido en los cuerpos de agua. Sin embargo, por ejemplo, en la provincia de Buenos Aires la descarga de efluentes sin tratar es algo frecuente. En la Cuenca del Río Matanza-Riachuelo se han detectado altas concentraciones de cromo en agua y sedimentos, que en algunos casos se encuentran muy por encima de los límites de descarga de este metal (Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR), 2012; Ceballos et al., 2016; Porzionato, 2016). En el Río Reconquista, perteneciente a la Cuenca Matanza Riachuelo, se ha detectado la presencia de hasta 2500 mg/kg de cromo total en sedimentos y se han medido en agua concentraciones de cromo total de hasta 0,151 mg/L (Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR), 2012; Porzionato, 2016). Otro caso particular es el de la localidad de El Jagüel, partido de Esteban Echeverría, dentro de la Cuenca Matanza Riachuelo. En este se determinaron concentraciones de Cr (VI) disuelto en agua de hasta 4,19 mg/L y de 4,35 mg/L de Cr total en la proximidad de una antigua industria química (Ceballos et al., 2016).

1.4 Especiación del cromo

Los metales en la naturaleza ocurren en diferentes estados de oxidación, y su ocurrencia depende de diferentes parámetros tales como el pH, la materia orgánica, la temperatura y la fuerza iónica (Kaplan, 2013; Kotás & Stasicka, 2000; Monteiro et al., 2012). Asimismo, la interacción de los metales con los organismos o con compuestos secretados por estos también puede modificar la forma química en la que se encuentran (Kaplan, 2013; Monteiro et al., 2012). La especie química del metal define su solubilidad, movilidad, estabilidad y toxicidad (Kaplan, 2013; Kotás & Stasicka, 2000; Monteiro et al., 2012). Generalmente, los metales más tóxicos son aquellos que se encuentran biodisponibles (Kaplan, 2013; Monteiro et al., 2012). Por lo tanto, cualquier proceso que transforme el metal en una forma en la que le impida ingresar en los organismos

disminuye su toxicidad (Kaplan, 2013; Monteiro et al., 2012). El cromo presenta varios estados de oxidación (0 a VI), siendo las formas más estables el cromo trivalente Cr (III) y el cromo hexavalente Cr (VI) (Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994). El Cr (IV) y Cr (V) son muy inestables y se forman como intermediarios en las reacciones de óxido-reducción del Cr (III) y el Cr (VI) (Kotás & Stasicka, 2000).

CROMO (III)

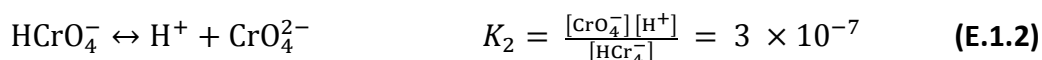
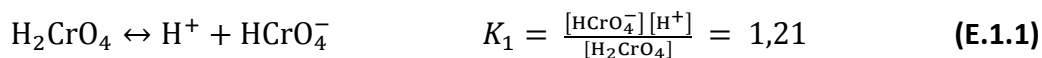
El Cr (III) es considerado la especie más estable del metal ya que se requiere de mucha energía para oxidarlo o reducirlo (Kotás & Stasicka, 2000). Además, este metal es un ácido fuerte y, en ausencia de otros elementos y/o compuestos excepto el agua, el Cr (III) se encuentra como $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$; $\text{Cr}(\text{OH})_2^+ \cdot \text{aq}$; siendo las especies predominantes a pHs de entre 4 y 10 el $\text{CrOH}^{2+} \cdot \text{aq}$ y el $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot \text{aq}$. Adicionalmente, ante la presencia de otros ligandos, como el —O, el —S y el —N, el Cr (III) forma óxidos, hidróxidos y sulfatos que aumentan levemente la solubilidad cuando forma complejos simples (Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994). No obstante, en el medioambiente el Cr (III) generalmente se encuentra asociado a macromoléculas de la materia orgánica, como el ácido húmico, y cabe destacar que este tipo de complejos resultan ser insolubles y la movilidad del metal es prácticamente inexistente (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994). El potencial redox de la dupla Cr (VI)/Cr (III) es muy elevado, por lo tanto muy pocos oxidantes en la naturaleza pueden oxidar al Cr (III) a Cr (VI). Asimismo, la oxidación del Cr (III) por el oxígeno en el medioambiente es despreciable y sólo se ha reportado que el manganeso puede oxidarlo (Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994).

CROMO (VI)

El Cr (VI) se halla frecuentemente asociado al oxígeno en forma de aniones, el hidrocromato (HCrO_4^-), el cromato (CrO_4^{2-}) o el dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), y la proporción de estos dependerá del pH y de la concentración del Cr (VI) (Figura 1.3) (Jobby et al., 2018; Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994). El ácido crómico, H_2CrO_4 , es un ácido fuerte y, por lo tanto, a pHs de entre 1 y 6 y en concentraciones inferiores a 0,01 M la especie predominante es el HCrO_4^- mientras que a pHs superiores a 7 la única forma existente es

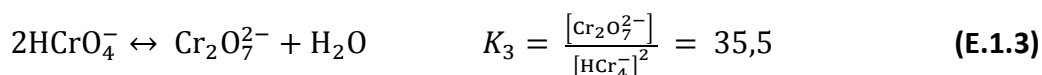
el CrO_4^{2-} (Cabatingan et al., 2001; Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994). En las siguientes ecuaciones se puede observar el equilibrio de las especies de Cr (VI) en solución acuosa (Cainelli & Cardillo, 1994):

K (25 °C), mol/L (M)



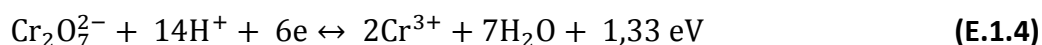
donde K es la constante de equilibrio a 25 °C y la unidad de la concentración de los reactivos y productos es M (mol/L).

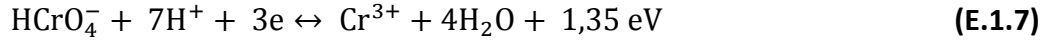
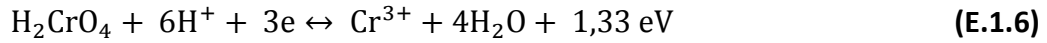
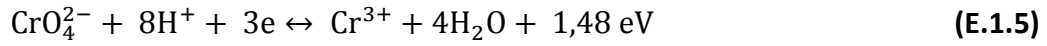
Adicionalmente, en soluciones diluidas la especie que presenta una mayor abundancia es el HCrO_4^- . No obstante, cuando la concentración de Cr (VI) es superior a 0,05 M el HCrO_4^- comienza a condensarse en $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ según la siguiente ecuación (Cainelli & Cardillo, 1994; Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994):



En los rangos normales de pH de los cuerpos de agua, el cromo se encuentra principalmente como HCrO_4^- , CrO_4^{2-} o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ y estos compuestos presentan una elevada solubilidad y movilidad en el medioambiente. No obstante, ante la presencia de agentes reductores como la materia orgánica o el Fe (II), estos oxianiones son fácilmente reducidos a Cr (III) (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994). Sin embargo, cabe destacar que elevadas concentraciones de Cr (VI) podrían superar la capacidad reductora del ambiente y por lo tanto persistir como un contaminante (Cervantes et al., 2001).

Adicionalmente, la relación entre el Cr (VI) y el Cr (III) se describe en las siguientes ecuaciones (Cainelli & Cardillo, 1994):





De esta manera, queda demostrada la diferencia en el potencial eléctrico entre el Cr (VI) y el Cr (III), así como también refleja el gran potencial de oxidación del Cr (VI) y la gran energía que se requiere para oxidar el Cr (III) a Cr (VI).

En conclusión, el cromo (VI) se considera la especie más tóxica del cromo ya que tiene un gran potencial de oxidación y es soluble en agua, además puede atravesar las membranas celulares, estos factores favorecen su biodisponibilidad y toxicidad (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Jobby et al., 2018; Mishra & Bharagava, 2016). Asimismo, el estado de oxidación del cromo en el ambiente dependerá de las condiciones físico-químicas del compartimiento en el que se encuentre (pH y potencial de óxido-reducción debido a la presencia de agentes reductores y oxidantes). Por ejemplo, en aguas con mucha presencia de materia orgánica el cromo se encuentra como Cr (III) mientras que en ambientes oxidantes la especie predominante es el Cr (VI) (Arauzo et al., 2003; Kotás & Stasicka, 2000; Losi et al., 1994).

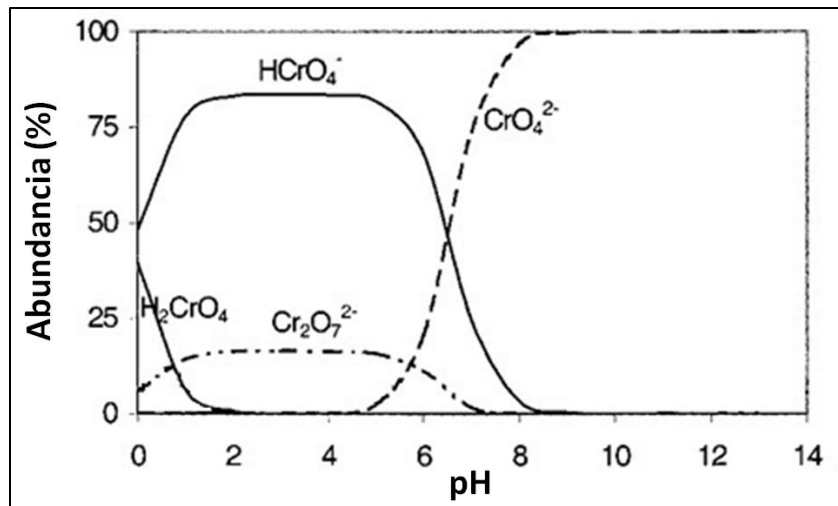


Figura 1.3. Abundancia de las formas del Cr (VI) en solución acuosa en función del pH. Imagen adaptada de Cabatingan (2001) (Cabatingan et al., 2001): distribución de las especies de Cr (VI) calculadas en función de una concentración de $7,69 \times 10^{-3}$ M y a una temperatura de 25 °C.

1.5 Toxicidad del cromo

La toxicidad del Cr (VI) en los seres vivos se debe principalmente a la generación de especies reactivas del oxígeno ó ROS (*Reactive Oxygen Species*, según sus siglas en inglés). En contacto con las células el Cr (VI) en forma de CrO_4^{2-} puede ingresar al interior celular por los canales de SO_4^{2-} donde es reducido a Cr (III), proceso durante el cual se generan intermediarios como Cr (V) y Cr (IV) que pueden reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y producir ROS, tales como el radical hidroxilo (OH^\bullet) (Gorbi et al., 2006; Nacorda et al., 2010; Ozer et al., 2012; Pinto et al., 2003; Pradhan et al., 2017). De hecho, se ha demostrado que la toxicidad del Cr (VI) está relacionada con la producción de OH^\bullet a partir del H_2O_2 mediante un mecanismo conocido como reacción de Fenton (Cervantes et al., 2001; Nacorda et al., 2010; Pinto et al., 2003; Pradhan et al., 2017). Una elevada concentración de ROS puede causar oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que termina provocando alteraciones en el material genético y en la estructura celular (Gorbi et al., 2006; Pinto et al., 2003; Pradhan et al., 2017). Adicionalmente, una vez que el Cr (VI) es reducido a Cr (III) en el interior celular, este último presenta efectos genotóxicos y mutagénicos debido a que puede unirse a los grupos fosfatos del ADN, afectando y provocando errores en la replicación y transcripción del ADN (Cervantes et al., 2001; Joutey et al., 2015; Pradhan et al., 2017).

El cromo en elevadas concentraciones resulta sumamente tóxico y genera severas consecuencias en animales, plantas, y microorganismos (Cervantes et al., 2001; Mishra & Bharagava, 2016; Shanker et al., 2005). A pesar de que el Cr (III) es considerado un micronutriente esencial para la salud de los seres humanos, una concentración de 50 mg/kg de peso corporal es letal (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Dayan & Paine, 2001). El Cr (VI) tiene efectos genotóxicos, mutagénicos en plantas y microorganismos y carcinogénicos en los animales (Dayan & Paine, 2001; Mishra & Bharagava, 2016). Las elevadas concentraciones de Cr (VI) en los seres humanos provocan úlceras en la piel, dermatitis aguda, irritación en el sistema respiratorio, perforación del tabique nasal, cáncer de pulmón, necrosis de hígado y riñones (Chandra & Kulshreshtha, 2004; Dayan &

Paine, 2001; Mishra & Bharagava, 2016). Adicionalmente, entre los efectos tóxicos del Cr (VI) en animales, en peces se pueden enumerar la disminución en la producción de anticuerpos, el aumento en la tasa de mortalidad, la disminución en las tasas de crecimiento, de fertilidad y de probabilidad de supervivencia del embrión y daño en el ADN (Aslam & Yousafzai, 2017). Por otro lado, en plantas el Cr (VI) disminuye el contenido de clorofila y proteínas, inhibiendo la fotosíntesis y el crecimiento (Cervantes et al., 2001; Chandra & Kulshreshtha, 2004; Mishra & Bharagava, 2016). En lo que respecta a microorganismos, se ha reportado que el Cr (VI) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento y en la incorporación de oxígeno, así como también provoca mutaciones (Cervantes et al., 2001). De la misma manera, en *Arthrobacter sp.*, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* se demostró que la exposición a Cr (VI) provocó la inhibición en el crecimiento (Megharaj et al., 2003; Ross et al., 1981).

Existen numerosos registros sobre el efecto de distintos metales en algas y, específicamente, del cromo sobre la fisiología y funciones celulares de las mismas (Cervantes et al., 2001; Peña-Castro et al., 2004; Takamura et al., 1989). A continuación, se mencionan algunos de los efectos por exposición a cromo reportados en distintas algas. Por ejemplo, se ha publicado que la exposición a Cr (III) y (VI) afecta la morfología celular (Corradi, Gorbi, & Bassi, 1995; Corradi & Gorbi, 1993), y que en casos como el de la especie *Scenedesmus incrasulata* también altera la formación de cenobios e induce la aparición de morfotipos (Peña-Castro et al., 2004). Por otra parte, D'Ors (2010) y Pereira (2013) han reportado importantes cambios morfológicos y citológicos en la especie *Dictyosphaerium chlorelloides* por exposición a Cr (III) (D'ors et al., 2010; Pereira et al., 2013). Los análisis por microscopía electrónica de transmisión y de barrido muestran cambios en el aspecto general de las células, tamaño y forma, cuando son expuestas a cromo, así como cambios ultraestructurales. Las células expuestas a Cr (III) muestran un engrosamiento de la pared celular y la aparición de numerosas vacuolas en el interior de las mismas. En relación al cloroplasto y la actividad fotosintética, se ha demostrado que la exposición a cromo induce cambios en el contenido de pigmentos (Gorbi et al., 2001; Rodríguez et al., 2007) y afecta la actividad fotosintética (Volland et al., 2014).

Por lo expuesto anteriormente, resulta necesario el tratamiento de los efluentes contaminados con cromo de modo tal de prevenir un aumento de la concentración del metal en el ambiente y sus efectos deletéreos en los organismos.

1.6 Tratamiento de efluentes contaminados con metales

Tradicionalmente la remoción de metales de los efluentes, incluido el cromo, se efectúa por métodos fisicoquímicos, tales como la precipitación química, el intercambio iónico, la filtración, la electrofloculación, la electrodeposición, la adsorción por carbón activado, la incineración, la extracción con solventes, entre otros (Gunatilake, 2015; Jobby et al., 2018; Kumar et al., 2015). A continuación, se describen algunas de las técnicas más utilizadas:

PRECIPITACIÓN QUÍMICA

La precipitación química es el método más utilizado en el tratamiento de efluentes industriales para la remoción de contaminantes debido a su fácil implementación y su bajo costo (Crini & Lichtfouse, 2019; Gunatilake, 2015; Sharma et al., 2018). Este proceso se basa en la generación de compuestos insolubles con el metal que precipitan y pueden ser fácilmente removidos, siendo las sales más utilizadas sulfatos, fosfatos, hidróxidos y carbonatos. La eficiencia del tratamiento puede mejorarse modificando parámetros como el pH, la temperatura, la concentración inicial, entre otros. La precipitación química más utilizada es mediante hidróxidos ya que es sencilla, económica y el precipitado (cal: óxido de calcio) es fácil de remover. A pesar de las ventajas que presenta esta técnica, resulta ser muy ineficiente cuando la concentración inicial del metal es baja (Crini & Lichtfouse, 2019; Gunatilake, 2015; Sharma et al., 2018). Además, para lograr concentraciones del metal permitidas para la descarga al medio ambiente se necesitan grandes cantidades de sales. Otra desventaja que presenta este método es que se generan desechos contaminados que luego requieren de un tratamiento (Crini & Lichtfouse, 2019; Sharma et al., 2018).

INTERCAMBIO IÓNICO

El intercambio iónico es un método ampliamente utilizado para la remoción de metales de desechos industriales. Ésta técnica consiste en el reemplazo de iones no deseados, como los metales que se buscan remover, por iones que no son contaminantes (Gunatilake, 2015; Sharma et al., 2018). En el intercambio iónico se utilizan resinas orgánicas sintéticas de intercambio iónico y el metal se transfiere de la fase líquida (efluente o sedimento en solución) a la fase sólida (resina). Este método resulta ser eficiente a bajas concentraciones del metal, no obstante las resinas son muy costosas, se saturan fácilmente, son sensibles a cambios de pH y presentan una muy baja selectividad (Crini & Lichtfouse, 2019; Gunatilake, 2015; Sharma et al., 2018).

FILTRACIÓN POR MEMBRANA

La filtración por membrana resulta ser una técnica muy atractiva para el tratamiento de desechos industriales debido a que genera un efluente de alta calidad y no se requieren químicos (Crini & Lichtfouse, 2019; Sharma et al., 2018). De acuerdo al tamaño de partícula se puede utilizar la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa para el tratamiento de metales. Dichas técnicas utilizan una membrana de filtración que puede retener a los contaminantes por su tamaño o por su interacción con un ligando en la cual se aplica una presión hidrostática para desplazar al efluente. No obstante, estos métodos presentan altos costos de inversión, de mantenimiento y de operación, tienen un elevado requerimiento energético, las membranas se saturan rápidamente y son procesos muy específicos según el efluente a tratar (Crini & Lichtfouse, 2019).

En general, las principales desventajas que presentan los métodos convencionales de remediación son que resultan ser ineficientes cuando la concentración del metal baja (< 100 mg/L), y/o generan descartes tóxicos y/o suelen ser muy costosos (Crini & Lichtfouse, 2019; Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018; Kumar et al., 2015). En relación a estos inconvenientes, en las últimas décadas ha surgido como alternativa la

utilización de organismos (algas, bacterias, plantas y hongos) para la remediación, proceso conocido como biorremediación (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). La biorremediación de metales mediante microorganismos involucra dos mecanismos: 1) un proceso pasivo, rápido y reversible, denominado bioadsorción, en el cual los metales son adsorbidos en la membrana o pared celular; y 2) un proceso activo y más lento, por el cual el metal ingresa en el interior de la célula y se acumula en ésta uniéndose a compuestos intracelulares (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). Este mecanismo resulta ser eficiente cuando las concentraciones del metal son bajas, menores a 100 mg/L (Elahi et al., 2020; Han et al., 2007; Kumar et al., 2015), además no generan residuos tóxicos adicionales y suelen ser menos costosos que los métodos tradicionales (Elahi et al., 2020; Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012).

La posibilidad de usar organismos para el tratamiento de efluentes contaminados con metales se debe a que estos han desarrollado mecanismos de detoxificación incluidos la bioadsorción, la bioacumulación y/o la biotransformación (Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018). En el caso particular del Cr (VI) la bio-reducción a Cr (III), forma más estable, insoluble e inmóvil del cromo se ha propuesto como una posibilidad para el tratamiento de efluentes que presenten Cr (VI) (Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018). A continuación, se describen brevemente los 3 mecanismos de detoxificación:

BIOADSORCIÓN

La bioadsorción es un mecanismo físico-químico pasivo, rápido y reversible entre el biosorbente (material biológico) y el metal (Fernández et al., 2018; Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). Las paredes celulares de los organismos como algas, hongos y bacterias tienen grupos funcionales tales como hidroxilos, carboxilos, aminos y sulfhidrilos que funcionan como sitios de adsorción para los metales (Fernández et al., 2018; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). Este mecanismo ocurre por interacciones electrostáticas y por la formación de uniones iónicas y covalentes e incluye la adsorción física, el intercambio iónico, la coordinación o complejación química, la

quelación y la precipitación (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). La bioadsorción no depende, necesariamente, de la actividad biológica y se puede usar material biológico inactivo (Fernández et al., 2018; Zeraatkar et al., 2016). Las ventajas de utilizar biomasa muerta es que no hay que preocuparse por los efectos adversos sobre el organismo, se ahorra la incorporación de nutrientes y es más sencilla la recuperación del metal (Fernández et al., 2018; Zeraatkar et al., 2016).

BIOACUMULACIÓN

La absorción de los metales por los organismos es un mecanismo activo que depende del metabolismo y de la concentración inicial del metal y del tiempo de contacto (Fernández et al., 2018). Por lo tanto, la bioacumulación es un proceso lento y generalmente irreversible ya que una vez que el metal ingresa al interior celular forma complejos con moléculas como tioles o es retenido en organelas tales como las vacuolas o en cuerpos de polifosfatos (Kumar et al., 2015). Este mecanismo muchas veces se ve limitado por los efectos adversos que provocan ciertos metales como el cromo en los seres vivos (Fernández et al., 2018). El transporte activo del Cr (VI) al interior celular ocurre principalmente por los canales de SO_4^{2-} debido a la similitud entre los aniones del cromato y el sulfato (Fernández et al., 2018; Joutey et al., 2015; Pradhan et al., 2017). Por otro lado, la membrana celular resulta ser impermeable al Cr (III) debido a que los compuestos que forma tienen una baja, casi nula, solubilidad (Fernández et al., 2018).

BIOTRANSFORMACIÓN

La biotransformación es un mecanismo de detoxificación en el cual el metal es modificado a una forma menos tóxica al ser estabilizado o transferido a otra fase del ambiente (Ali et al., 2013; Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018). Un claro ejemplo es la fitoestabilización, durante este proceso las plantas pueden inmovilizar en el suelo a los metales mediante la precipitación, la complejación química y la reducción mediante la secreción de enzimas de tipo redox (Ali et al., 2013). Otro mecanismo presente en las plantas es la fitovolatilización, ésta ocurre en metales como el Hg y el Se que son

volatilizados y, posteriormente, liberados a la atmósfera (Ali et al., 2013). Cabe destacar, que en la biotransformación solamente se modifica el estado de oxidación o la localización/ubicación del metal en el ambiente.

En el caso del Cr (VI) se considera a la biotransformación como un mecanismo de detoxificación ya que al reducirse a Cr (III) este metal suele formar compuestos muy estables y que son muy poco solubles (Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018). En bacterias como *Pseudomonas* y *Bacillus* se ha reportado la reducción de Cr (VI) mediante enzimas de tipo cromato reductasa que pueden encontrarse en el citosol o en la membrana plasmática (Fernández et al., 2018). La bio-reducción a Cr (III) también puede ser no enzimática mediada por aminoácidos, azúcares, vitaminas, glutatión y ácidos orgánicos como el oxalato y el citrato (Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018).

1.7 Capacidad de remoción del cromo utilizando distintos microorganismos

Se han realizado numerosos estudios utilizando una gran diversidad de microorganismos para la remoción de Cr (VI), entre ellos se encuentran bacterias, hongos y microalgas (Jobby et al., 2018; Kumar et al., 2015). En la siguiente tabla se muestran datos de capacidades de remoción de diferentes microorganismos (Tabla 1.3):

Tabla 1.3. Eficiencias de bio-remoción de Cr (VI) por diferentes organismos expresadas con el índice capacidad de remoción (mg de Cr/g de biomasa).

Organismo	Capacidad de remoción		Referencia
	pH	(mg de Cr (VI)/g de biomasa)	
Microalgas			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	18,2	(Arica et al., 2005)
<i>Chlorella vulgaris</i>	2	23	(Çetinkaya Dönmez et al., 1999)
<i>Chlorella vulgaris</i>	4	23,6	(Zümriye Aksu et al., 1999)
<i>Dunaliella sp. 1</i>	2	58,3	(Dönmez & Aksu, 2002)
<i>Dunaliella sp. 2</i>	2	45,5	(Dönmez & Aksu, 2002)
<i>Pediastrum boryanum</i>	2	~13	(Ozer et al., 2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	2	15,6	(Çetinkaya Dönmez et al., 1999)
Bacterias			
<i>Arthrobacter viscosus</i>	4	13,0	(Silva et al., 2012)

<i>Aeromonas caviae</i>	2,5	124,46	(Loukidou et al., 2004)
<i>Bacillus circulans</i>	2,5	34,5	(Srinath et al., 2002)
<i>Bacillus licheniformis</i>	2,5	69,35	(Zhou et al., 2007)
<i>Escherichia coli</i>	2	64,36	(Gabr et al., 2009)
<i>Pseudomonas sp.</i>	4	95	(Ziagova et al., 2007)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	1	143	(Ziagova et al., 2007)
Hongos			
<i>Aspergillus niger</i>	3	30,1	(Mungasavalli et al., 2007)
<i>Aspergillus niger</i>	1	117,33	(Khambhaty et al., 2009)
<i>Candida sp.</i>	6	44,38	(Guillén-Jiménez et al., 2009)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	2	75,1	(Abigail et al., 2014)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	2	78	(Aksu & Balibek, 2007)
<i>Rhizopus nigricans</i>	2	15,5	(Bai & Abraham, 2001)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	32,6	(Özer & Özer, 2003)

1.8 Las microalgas

Las algas son un grupo polifilético de organismos eucarióticos fotosintéticos, con grupos pertenecientes a al menos cinco supergrupos o reinos diferentes (Figura 1.4). Algunas de ellas están emparentadas con las plantas (algas verdes y rojas), mientras que otras se encuentran relacionadas con los Protistas (diatomeas, eustigmatófitas, dinoflagelados y algas pardas, por ejemplo) (Figura 1.4). Todos los grupos de algas carecen de un verdadero embrión y de una cubierta estéril de células alrededor de las células reproductoras, ambas características de las plantas. A diferencia con las plantas, las algas no poseen una diferenciación tisular, es decir no tienen raíces, hojas, tallos ni un sistema de conducción complejo. Si bien algunas algas pluricelulares presentan estructuras equivalentes a las hojas, tallos y raíces, no forman verdaderos tejidos. Por otro lado, se suele separar a las algas en macroalgas y microalgas según su tamaño y organización celular, aunque esta clasificación no tiene valor taxonómico. Las primeras son organismos pluricelulares y las segundas organismos unicelulares, que además pueden ser coloniales o cenobiales. Las algas generalmente se encuentran en el agua dulce, salada y salobre, sin embargo, también pueden hallarse en casi todos los ambientes como en el suelo, la nieve o en aguas termales. Asimismo, las algas son un grupo morfológicamente muy diverso: poseen formas y tamaños muy variados y ciclos de vida muy diversos. Además, poseen

importantes diferencias en la composición de sus paredes celulares, de sus pigmentos fotosintéticos y de sus polisacáridos de reserva y estructurales. Toda esta gran variabilidad refleja los diferentes orígenes evolutivos de los organismos agrupados dentro de las algas.

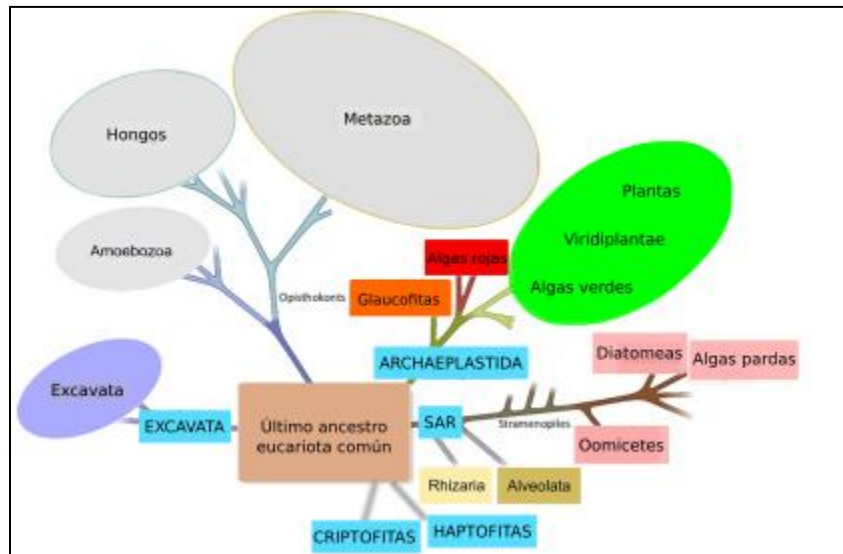


Figura 1.4. Árbol filogenético donde se muestra la clasificación de las algas a nivel de las jerarquías más altas. El término algas se refiere a un grupo polifilético con miembros en cinco reinos o supergrupos diferentes, cuyos nombres se muestran en celeste. Dentro de los mismos, algunos de los grupos principales de algas son: Algas rojas, Algas verdes, Algas pardas, Diatomeas, Glaucofitas, Criptofitas y Haptofitas. Dentro de las algas verdes, emparentadas con las plantas, se encuentra el género *Scenedesmus*. Esquema adaptado de Rensing (2016) (Rensing, 2016).

En esta Tesis, nos enfocaremos en *Scenedesmus dimorphus*, una especie de microalga verde perteneciente a la clase Chlorophyceae, orden Sphaeropleales. *Scenedesmus* sp. es un género ampliamente utilizado en estudios de biorremediación (Kumar et al., 2015). Este género es cosmopolita y generalmente se encuentra en el fitoplancton en ríos, estanques y lagos. Son microalgas coloniales que forman cenobios de 2, 4, 8, 16 y 32 células, y las células suelen ser elipsoidales, ovoides, en forma de medialuna o alargadas con los extremos ahusados (Figura 1.5). Los cenobios se forman por la unión lateral adyacente de las células que se encuentran dispuestas de forma lineal o alternada (Figura 1.5). Las células son uninucleadas y tienen un solo cloroplasto parietal que generalmente presenta un único pirenoide (Figura 1.5). Muchas especies de

Scenedesmus generalmente se encuentran como células individuales, lo que representa ciertas ventajas asociadas a la disminución de la velocidad de sedimentación y a una mayor relación superficie/volumen para la absorción de nutrientes. Algunas especies de este género pueden presentar espinas o cerdas en la pared celular para favorecer la flotabilidad. La reproducción es asexual y es mediante autoesporas (células hijas con la misma forma que la célula parental) aunque en determinadas condiciones, como por ejemplo escasez de nitrógeno, puede darse la producción de zoosporas (células flageladas móviles) (Lee, 2018)(Figura 1.5). Generalmente la morfología depende del medio en el que se encuentre, pudiendo hallarse como células individuales o también pueden perder las espinas. Adicionalmente, muchas especies de *Scenedesmus* crecen como células individuales pero ante una presión de depredación, como por ejemplo una gran abundancia de *Daphnia*, *Scenedesmus* forma colonias multicelulares como mecanismo de defensa (Lee, 2018).

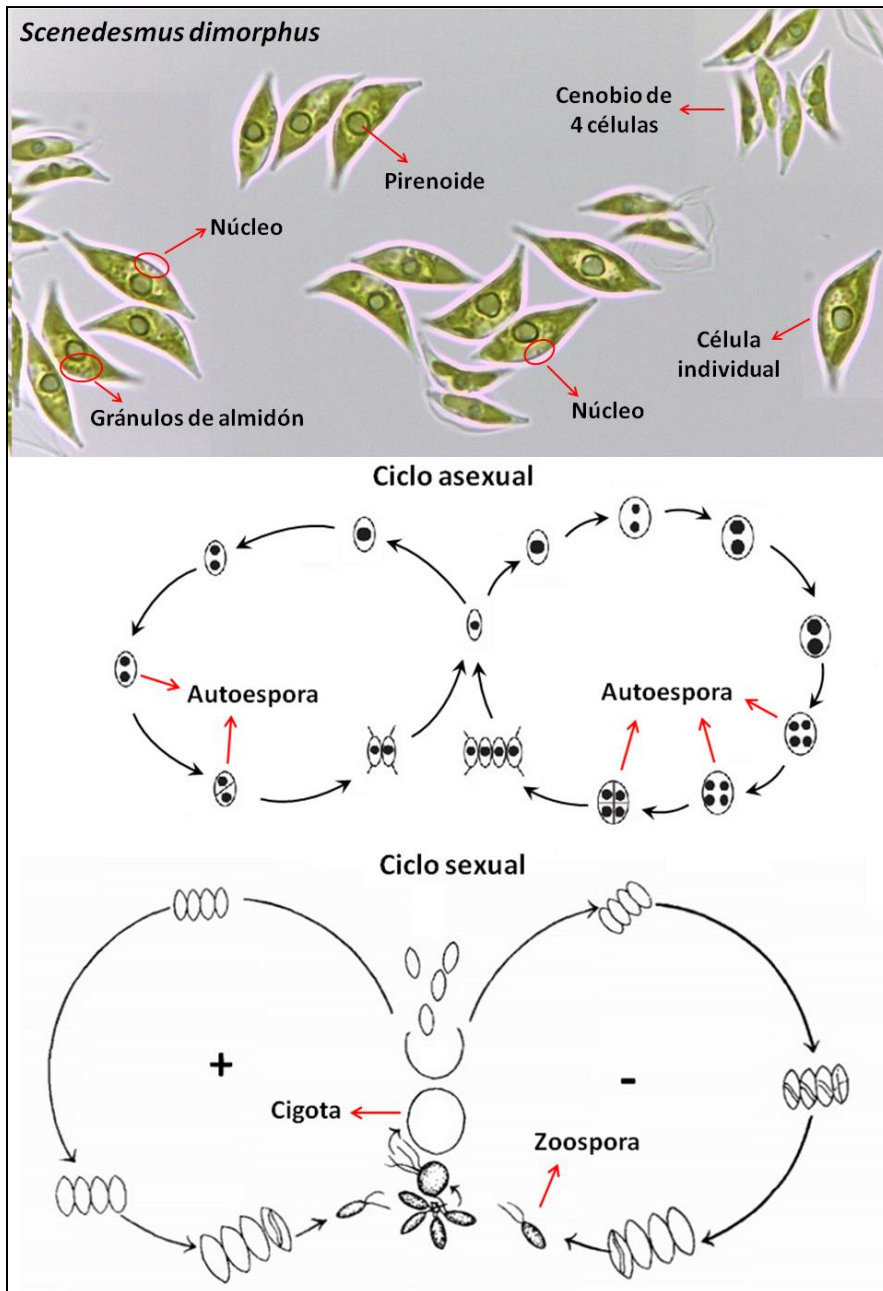


Figura 1.5. Morfotipo de *Scenedesmus dimorphus* como ejemplo de una especie del género *Scenedesmus* sp. y ciclos de vida de dicho género. En el panel superior se muestran las principales estructuras celulares. En el panel inferior, se muestran los ciclos de vida asexual y sexual. En condiciones de crecimiento óptimo, *Scenedesmus* se reproduce asexualmente a través de autoesporas. En condiciones de estrés o deficiencia nutricional, la reproducción puede ocurrir sexualmente mediante la unión de gametas haploides flageladas de tipos de apareamiento diferentes (+ y -), para formar un cigoto cuadriflagelado. El cigoto puede generar hasta 32 zoosporas mediante germinación (meiosis y mitosis), que generan nuevas gametas mediante gametogénesis. El esquema del ciclo de reproducción sexual fue adaptado de Trainor (1996) (Trainor, 1996).

1.9 Biorremediación usando microalgas

Las microalgas son ampliamente utilizadas en estudios de biorremediación (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). La biorremediación mediante microalgas depende de varios factores, tanto bióticos como abióticos (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Dentro de los bióticos se destacan la especie, la tolerancia del organismo a un metal dado y la concentración de la biomasa. Por otro lado, entre los factores abióticos podemos enumerar el pH, la temperatura, la concentración inicial del metal, la especiación del metal, y la presencia de otros metales. A continuación, se describen los factores que influyen en el proceso de biorremediación mediante microalgas:

ESPECIE

La sensibilidad a cada metal y la eficiencia de biorremediación es especie-dependiente. Incluso se han reportado diferentes capacidades de remoción y respuestas a un mismo metal en especies del mismo género (Dwivedi et al., 2010; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). Un ejemplo es el caso en las distintas eficiencias de remoción de metales como el Cr (VI) que presentan *Chlorella miniata* y *Chlorella vulgaris*, siendo especies del mismo género (Kumar et al., 2015). Adicionalmente, cabe destacar que muchas microalgas pueden vivir en sitios contaminados con metales debido a que presentan o desarrollan mecanismos de tolerancia y/o resistencia que influyen en el proceso de remoción (Baselga-Cervera et al., 2018; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). La tolerancia es la estrategia poblacional para sobrevivir y reproducirse como respuesta a la exposición de un determinado contaminante o tóxico. Este término se distingue de la resistencia o la capacidad adquirida por mutación genética de una parte de la población para sobrevivir y reproducirse. En lo que respecta al efecto de la especie utilizada en estudios de biorremediación, se ha demostrado que cepas aisladas de ambientes con una alta concentración de metales o cepas resistentes a metales que han sido generadas en laboratorios presentan eficiencias de biorremediación muy elevadas (Baselga-Cervera et al., 2018; Dwivedi et al., 2010). Además, en concordancia con lo expuesto anteriormente, se ha reportado que microalgas que han

sido aisladas del mismo sitio pero que pertenecen a especies distintas muestran diferentes capacidades de remoción (Dwivedi et al., 2010; Novák et al., 2020).

MECANISMOS DE TOLERANCIA/RESISTENCIA

Las microalgas cuentan con numerosos mecanismos de tolerancia que difieren dependiendo de la especie, del estado de oxidación y de la concentración del metal. Por ejemplo, dentro de la respuesta antioxidante de las microalgas se encuentran las enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la ascorbato peroxidasa (Kumar et al., 2015; Pinto et al., 2003). Adicionalmente, otros mecanismos de detoxificación no enzimáticos son la síntesis de compuestos como fitoquelatinas o tioles no peptídicos, la exclusión o compartimentalización de los metales, o la secreción de exudados que pueden quelar los metales (Kaplan, 2013; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012).

CONCENTRACIÓN DE LA BIOMASA

El aumento en la biomasa conlleva un incremento de los sitios disponibles para la adsorción del metal y por lo tanto se refleja en una mejor capacidad de remoción (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). No obstante, se ha reportado que un exceso de biomasa puede ser contraproducente y provocar una disminución de la eficiencia de biorremediación. Esto se debería a que un incremento en el número de células provoca que estas se agreguen y de esta forma disminuye el número de sitios libres para la unión con el metal (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Otra posible razón para la pérdida de la capacidad de remoción asociada a un aumento excesivo de la biomasa es que disminuye la distancia promedio entre los sitios disponibles para la adsorción (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012).

pH

El pH es considerado como el factor más importante que influye en el proceso de adsorción ya que afecta la solubilidad y la toxicidad del metal (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). La especiación del metal y su comportamiento en medio acuoso

depende directamente del pH. De la misma manera, las propiedades ácido-base de los grupos funcionales presentes en la pared celular de las microalgas dependen del pH, confiriéndoles una carga superficial negativa a pHs fisiológicos (mayores a 5). Por ejemplo, a pHs bajos los grupos funcionales están protonados y cargados de forma positiva, por lo tanto, los metales que se encuentran como cationes son rechazados por fuerzas repulsivas. Por el contrario, a pHs elevados los grupos funcionales se encuentran desprotonados y cargados de forma negativa, permitiendo que los cationes se unan a ellos. Cada grupo funcional tiene un rango de pH diferente en el que se encuentra cargado de forma negativa, los carboxilos predominan a pHs entre 3 y 5; entre pHs de 5 a 9 también se hallan los fosfatos, mientras que a pHs de 9 a 12 todos los grupos funcionales, incluidos los hidroxilos y aminos, están disponibles para unirse a los cationes. No obstante, a pHs elevados muchos metales tienden a precipitar y por lo tanto es necesario definir el pH óptimo para la biorremediación (Kumar et al., 2015; Zeraatkar et al., 2016).

TEMPERATURA

Si bien la temperatura influye en numerosos parámetros que son importantes en la biosorción, como por ejemplo la estabilidad y solubilidad del metal, los estudios realizados no son consistentes (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). Aunque hay autores que han reportado un aumento en la eficiencia de remoción asociado a un incremento en la temperatura, otros concluyen lo opuesto. Por ejemplo, en el trabajo de Aksu (2002) se observó en *Chlorella vulgaris* un aumento en la eficiencia de remoción de Ni (II) asociado al incremento de la temperatura, lo cual fue evaluado en un rango de temperatura de 15 a 45 °C (Aksu, 2002). Contrariamente, en un estudio previo del mismo autor, este concluyó que el aumento en la temperatura (20 a 50 °C) provocó la disminución en la capacidad de absorción de Cd (II) por parte de la misma cepa (Aksu, 2001). De forma similar, Gupta y Rastogi (2008) reportaron que en *Oedogonium* sp. el incremento en la temperatura (25 a 45 °C) afectó negativamente la biosorción de Cd (II) (Gupta & Rastogi, 2008). Adicionalmente, otros estudios afirman que no habría un efecto de la temperatura en la remoción de metales (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016).

CONCENTRACIÓN DEL METAL

La eficiencia de remoción en solución depende de la concentración inicial del metal, y puede predecirse mediante modelos matemáticos, isothermas clásicas de adsorción (Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). De esta manera, la capacidad de biosorción aumenta cuando se incrementa la concentración del metal, aunque a concentraciones muy elevadas el sistema llega a un punto de saturación (Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016).

ESPECIACIÓN DEL METAL

La biosorción de los metales depende de su especiación y de su carga, las cuales están determinadas por el pH. Los metales en solución pueden encontrarse como iones libres, formando complejos con ligandos orgánicos/inorgánicos o adsorbidos en diferentes fases particuladas. No obstante, cuando el metal se halla como un ión libre presenta una mayor capacidad de unión a las microalgas y por lo tanto es la forma más tóxica (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012).

PRESENCIA DE OTROS METALES

Generalmente, los efluentes industriales se encuentran contaminados con más de un metal, por ejemplo en las aguas de desecho de procesos en galvanoplastia contienen una mezcla de Cr, Ni, Cd y Zn (Monteiro et al., 2012; Zeraatkar et al., 2016). Por lo tanto, se debe tener en cuenta el efecto que produce en el proceso de remoción la interacción de todos los metales presentes en los efluentes. En soluciones multi-metálicas, la interacción entre los metales no presenta un patrón definido y puede ocurrir que compitan por los sitios activos en las paredes celulares de las microalgas o que precipiten en presencia de otros metales. Por esta razón, se debe estudiar de forma conjunta el comportamiento de los diferentes metales presentes en cada sistema.

1.10 Microalgas: mecanismos de detoxificación

Distintas especies de algas pueden vivir en ambientes contaminados con metales dado que presentan mecanismos de detoxificación, lo que las hace tolerantes al metal (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Gran parte de los fenómenos de tolerancia y/o resistencia residen en la capacidad de distintas poblaciones o cepas de inmovilizar los metales, intracelular o extracelularmente, de manera de que no ejerzan efectos tóxicos (Monteiro et al., 2012).

Se han descrito distintos mecanismos de interacción célula-metal que conducen a la remoción del mismo del medio líquido. La primera barrera con la que se encuentran los metales es la pared celular que está conformada por polisacáridos, proteínas y lípidos que poseen grupos funcionales que le otorgan cargas positivas y negativas tales como aminos, carboxilos, fosfatos, sulfhidrilos e hidroxilos. Estos grupos funcionales le otorgan una elevada afinidad por los metales, pudiendo quedar éstos adsorbidos a la superficie celular (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Si bien la superficie celular presenta sitios cargados positivos y negativos la carga neta es negativa a pHs superiores a 5.

Un modo diferente de reducir la concentración del metal y evitar su ingreso al interior de la célula es mediante la formación de complejos entre el metal y exudados orgánicos (Corradi et al., 1998; Ferraro et al., 2018; Gorbi et al., 2004; Kaplan, 2013; Myklestad, 1995). La composición de estos exudados, en términos de qué tipos de polisacáridos poseen así como qué proporción y tipo de proteínas presentan, resulta ser especie-específica y determinará su capacidad de quelar los diferentes metales (Gorbi et al., 2004; Kaplan et al., 1987; Myklestad, 1995). Cabe mencionar que la secreción de exudados orgánicos se ha estudiado principalmente para metales que en solución se encuentran como cationes, pero poco se conoce sobre la secreción de los mismos cuando las algas son expuestas a metales en forma de aniones. En este sentido, caracterizar la secreción de compuestos orgánicos por exposición a cromo resulta de gran interés.

Otro mecanismo para destacar es el desencadenado por la generación de ROS. Las microalgas muestran una fuerte respuesta antioxidante que se induce durante la exposición a distintos metales incluido el cromo. La regulación e inducción en la producción de antioxidantes como respuesta al estrés oxidativo depende de cada tipo de metal (Pinto et al., 2003). Uno de los mecanismos de detoxificación más importantes en microalgas es la síntesis de tioles no peptídicos tales como la cisteína (Cys) y el glutatión (GSH) (Gorbi et al., 2006, 2007; Marieschi et al., 2015; Torricelli et al., 2004). El GSH es el antioxidante no enzimático más importante y actúa reduciendo el efecto del cromo en la generación de ROS (Nagalakshmi & Prasad, 2001). Adicionalmente, existen tioles peptídicos como las fitoquelatinas que contribuyen a mitigar el estrés oxidativo (Gorbi et al., 2006; Marieschi et al., 2015; Torricelli et al., 2004). Este tipo de compuestos actúan formando complejos con los metales que posteriormente son almacenados en vacuolas, cloroplastos y/o cuerpos de inclusión o simplemente como precipitados en el citosol (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012; Perales-Vela et al., 2006; Torricelli et al., 2004).

1.11 Mecanismos de remoción de cromo mediante el uso de microalgas

Numerosas especies de algas han mostrado capacidad para la captación de metales. Estudios realizados a escala de laboratorio con diferentes especies de microalgas, incluidas las del género *Scenedesmus* sp., muestran una buena eficiencia en la remoción de Cr (VI) (Cervantes et al., 2001; Jácome-Pilco et al., 2009). Como se mencionó previamente en la sección 1.9, las microalgas presentan carga superficial negativa a pHs fisiológicos, es decir superiores a 5. Asimismo, el cromo interactúa de forma diferente con las microalgas en función de su estado de oxidación y de su carga. El Cr (III) generalmente se encuentra presente con carga positiva y por lo tanto, a pHs superiores a 5, el Cr (III) es adsorbido a la pared celular por los grupos funcionales cargados de forma negativa, mientras que no puede unirse a la biomasa a pHs más ácidos (menores a 5). Contrariamente, el Cr (VI) se encuentra con carga negativa en forma de HCrO_4^- , CrO_4^{2-} o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ y, a pHs mayores a 4, tanto el Cr (VI) como las microalgas presentan una carga superficial negativa, por lo que sufren fuerzas electrostáticas repulsivas, resultando en una

remoción del metal muy baja. No obstante, el Cr (VI), a pHs superiores a 4, puede ser reducido por la biomasa para posteriormente ser adsorbido y también puede ser incorporado al interior celular a través de los canales de sulfato (Elahi et al., 2020; Jobby et al., 2018; Joutey et al., 2015; Marieschi et al., 2015; Pereira et al., 2008; Sardella et al., 2019). Por otro lado, a pHs menores a 4, el Cr (VI) es adsorbido directamente a la pared celular ya que la mayoría de los grupos funcionales que presenta están cargados de forma positiva. Adicionalmente, se ha reportado que posteriormente puede ocurrir una reducción del Cr (VI) a Cr (III) mediada por los carbonilos y, de esta manera, el Cr (III) puede permanecer unido a la biomasa o bien puede ser liberado nuevamente al medio (Han et al., 2007; Park et al., 2007).

Cabe destacar que, como se mencionó en la Sección 1.9, la eficiencia de remediación se incrementa con el aumento en la cantidad de biomasa debido a que, de esta forma, hay un mayor número de sitios activos para la bioadsorción del metal. Adicionalmente, es importante recordar que las microalgas presentan una carga superficial negativa a pHs fisiológicos (mayores a 5). Por estas dos razones, generalmente los ensayos de biorremediación de Cr (VI) se realizan con una biomasa considerable y a pHs menores a 4 para obtener buenas eficiencias de remoción del metal.

En la Figura 1.6 se representan mediante un esquema las generalidades de la interacción del Cr (VI) en las células microalgales.

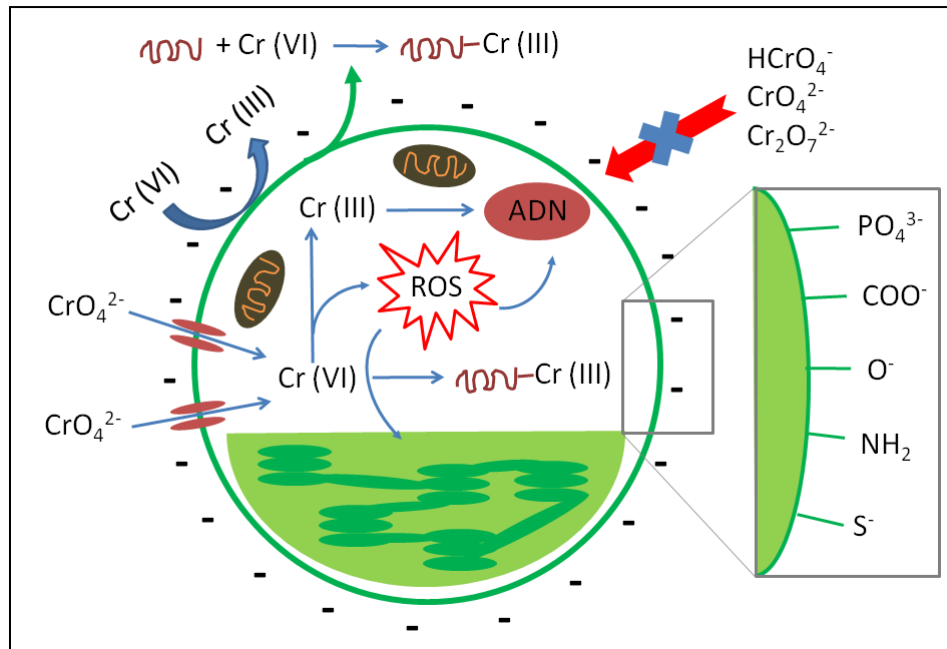


Figura 1.6. Diagrama de la interacción del Cr (VI) con la célula microalgal. La primera barrera con la que se enfrenta el Cr (VI) es la pared celular. Cuando el Cr (VI) se encuentra como hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}), o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), la pared celular que presenta carga superficial neta negativa ejerce fuerzas repulsivas sobre estas especies del metal. No obstante, el cromato puede ingresar al interior celular a través de los canales de sulfato, donde es reducido a Cr (III), proceso durante el cual se generan ROS. Adicionalmente, el Cr (VI) puede ser reducido a Cr (III) por polisacáridos presentes en la pared celular. Como contraparte de esta reducción, los hidroxilos y carbonilos de los polisacáridos se oxidan a carboxilatos. Una elevada concentración de ROS en el interior celular puede causar oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y también puede afectar la actividad fotosintética e inducir cambios en la composición pigmentaria. A su vez, el Cr (III) en el interior celular también presenta efectos genotóxicos y mutagénicos debido a que puede unirse a los grupos fosfatos del ADN. Una de las respuestas para mitigar los efectos del Cr (VI) y evitar su ingreso es la secreción de compuestos protectores que forman complejos con el metal, disminuyendo su biodisponibilidad y, por lo tanto, su toxicidad. Otro de los mecanismos de detoxificación es la síntesis de tioles no peptídicos que actúan formando complejos con el metal y, que posteriormente, son almacenados en vacuolas, cloroplastos y/o cuerpos de inclusión o simplemente como precipitados en el citosol.

En resumen, la ventaja de utilizar microalgas para la biorremediación es que presentan una rápida y una elevada eficiencia de remoción de metales. Además, confieren un método económico y amigable con el medio ambiente que no genera residuos tóxicos, permitiendo reciclar y reutilizar la biomasa. Asimismo, permiten también recuperar el

metal y presentan una elevada tasa de crecimiento en comparación con las plantas. Por otro lado, tienen una relación superficie/volumen muy apropiada para la remoción de metales, y además se pueden utilizar en procesos en *batch* y en sistemas continuos. Por último, son eficientes a bajas concentraciones de metales, y la biomasa puede usarse viva o muerta (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Sin embargo, para proponer y desarrollar una tecnología de biorremediación de metales basada en el uso de algas, resulta fundamental tener una buena comprensión del proceso. Esto requiere conocer la interacción del metal con la célula algal, así como la respuesta y los mecanismos de detoxificación generados por las microalgas, además de una adecuada caracterización del proceso de remoción del metal y del efecto de variables determinantes sobre el mismo.

En relación a lo detallado en la introducción, en el presente trabajo de Tesis se propuso la generación de una cepa resistente a cromo por exposición crónica al metal. Una vez obtenida la cepa, y habiendo probado su resistencia, el sistema cepa resistente (CRS) y su correspondiente cepa *Wild Type* (WT), permitió estudiar los efectos del cromo y los mecanismos de resistencia de manera comparada. Por otra parte, en el contexto del campo de la biorremediación, la idea de generar una cepa resistente se basa en reportes para varios metales, en los que se demuestra que la resistencia está asociada a una mayor tasa de bioadsorción y bioacumulación de metal y, por lo tanto, de bioremoción del medio del mismo. Esto último está fuertemente relacionado con el mecanismo de resistencia, o sea con el modo en que las algas reducen la disponibilidad del metal del medio y/o sus efectos adversos. Basado en datos de literatura, esencialmente para metales que se encuentran como cationes, se desarrolló una estrategia de generar y caracterizar una cepa resistente a Cr (VI) (CRS) versus su control (WT), con la hipótesis de que la cepa resistente sería más eficiente en la bioremoción del metal. En este sentido, el desarrollo de una cepa resistente, la caracterización de los mecanismos de tolerancia y su capacidad para remover cromo permitió profundizar en todos estos aspectos para un metal sumamente tóxico, y por su condición de encontrarse como un anión, menos estudiado en estos procesos. A continuación, se detallan las hipótesis de trabajo y los objetivos de esta Tesis.

1.12 Hipótesis General

Mediante la exposición de *Scenedesmus dimorphus* a cromo (VI) se generará una cepa resistente a cromo con capacidad de tolerar y remover mayores cantidades del metal que su correspondiente control o cepa salvaje.

1.13 Objetivo General

Estudiar los mecanismos de resistencia a cromo (VI) de una cepa de *Scenedesmus dimorphus* y evaluar su capacidad de remoción de cromo (VI) en comparación con la cepa salvaje. Este objetivo pretende constituir un primer paso en la comprensión de la interacción metal-célula tendiente al desarrollo de un proceso de biorremediación.

Objetivos Específicos

1. Generar una cepa de *Scenedesmus dimorphus* resistente a cromo (VI) mediante exposición prolongada al metal.
2. Estudiar los efectos del cromo (VI) sobre la cepa de *Scenedesmus dimorphus* resistente generada en comparación con la cepa salvaje
3. Dilucidar los mecanismos celulares responsables de la detoxificación y/o remoción del cromo (VI) del medio de cultivo.
4. Caracterizar la capacidad de remoción de cromo (VI) del medio de cultivo mediada por la cepa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección, cultivo y mantenimiento de las cepas

En este trabajo se utilizó la clorofita cenobial *Scenedesmus dimorphus* (UTEX 417), adquirida originalmente del *Culture Collection of Algae* de la Universidad de Texas en Austin (UTEX). La cepa se mantuvo en cultivos líquidos en 100 mL de medio Bold's Basal Medium (BBM): NaNO_3 ($2,94 \times 10^{-3}$ M), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,70 \times 10^{-4}$ M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,04 \times 10^{-4}$ M), K_2HPO_4 ($4,31 \times 10^{-4}$ M), KH_2PO_4 ($1,29 \times 10^{-3}$ M), NaCl ($4,28 \times 10^{-4}$ M), EDTA ($1,71 \times 10^{-4}$ M), KOH ($5,53 \times 10^{-4}$ M), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,79 \times 10^{-5}$ M), H_3BO_3 ($1,85 \times 10^{-4}$ M), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($3,07 \times 10^{-5}$ M), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($7,28 \times 10^{-6}$ M), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($2,93 \times 10^{-6}$ M), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,29 \times 10^{-6}$ M), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2,06 \times 10^{-6}$ M) (Andersen, 2005), en una incubadora a 21 °C, $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con un fotoperíodo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad y en agitación continua para evitar su sedimentación. La cepa se subcultivó a medio fresco cada 15 días para evitar que llegase a la fase estacionaria. El crecimiento se monitoreó mediante conteo celular usando una cámara de Neubauer. Asimismo, la preservación a largo plazo se realizó en picos de flauta con BBM-agar 1% p/v repicando la cepa cada 6 meses. Cabe destacar que los picos de flauta se encuentran en una zona de la incubadora donde la incidencia de la luz es baja. De esta manera, el crecimiento celular es muy lento y, por lo tanto, se favorece la conservación de la cepa.

2.2. Preparación de la solución stock de cromo (VI)

Para la formulación de la solución de Cr (VI) se utilizó la sal dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (Biopack, p.a. A.C.S.), que fue preparada en agua destilada y posteriormente esterilizada mediante autoclave (121 °C por 20 min). Se prepararon 80 mL de una solución stock con una concentración final de 1,3 g/L de Cr (VI) (solución madre). Partiendo de la solución madre de dicromato de potasio de 1,3 g/L de Cr (VI) se realizaron diluciones en medio de cultivo de modo tal de trabajar con diferentes concentraciones finales de metal según el ensayo a realizar.

2.3 Cuantificación de cromo

La concentración de Cr (VI) se determinó mediante el método de la 1,5-difenilcarbazida (DPC), que presenta un límite de detección de 0,1 mg/L (American Public Health Association et al., 1999). El Cr (VI) interactúa con la DPC, reduciéndose a Cr (III), y se forma un complejo de color púrpura con un pico de absorbancia a 540 nm (Figura 2.1). La absorbancia se midió usando un espectrofotómetro (Shimadzu, UV-Vis 1800, Japón). Asimismo, se realizó una curva de calibración para la cuantificación de Cr (VI). La concentración total de cromo se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica (EAA) (Perkin Elmer Analyst 200) y por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Thermo Scientific, iCAP Qc). El límite de detección de la EAA y de la ICP-MS es de 0,2 mg/L y de 8,6 µg/L, respectivamente. Cabe mencionar que ambas técnicas son ampliamente utilizadas para la determinación de metales en soluciones acuosas y, además, son adecuadas para las concentraciones de Cr (VI) usadas en esta Tesis. En particular, la cuantificación por ICP-MS se realizó cuando la concentración inicial del metal fue de 1,3 mg/L de Cr (VI). Por otro lado, en los ensayos en los que se aumentó la concentración inicial de Cr (VI) a 100 mg/L, la determinación se hizo por EAA. Por último, la cuantificación de Cr (III) se calculó restando la concentración de Cr (VI) a la de cromo total.

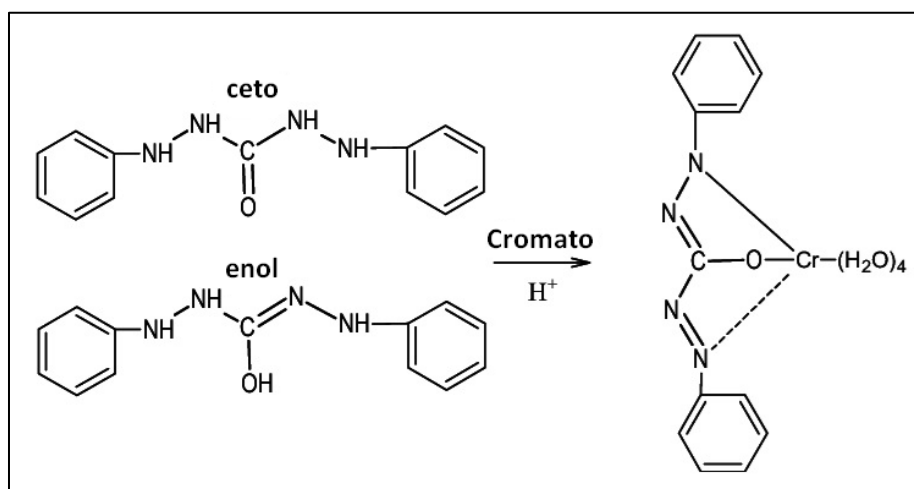


Figura 2.1. Reacción de la 1,5-difenilcarbazida (DPC) con el Cr (VI). Figura tomada de Salman (2011) y reproducida con autorización del Dr. Umer Shafique (Salman et al., 2011).

La determinación de Cr (VI) se realizó siguiendo el protocolo del *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (American Public Health Association et al., 1999), pero fue modificado para utilizar un volumen final de 1 mL. La solución de 5 mg/mL de DPC (0,5 % p/v) se preparó agregándole 5 mL de acetona a 25 mg de DPC, y se utilizó considerando que tiene una duración de 20 días preservada a 4 °C y en oscuridad. Brevemente, se tomó 1 mL del cultivo y se lo centrifugó a 15.000 g. Posteriormente, se trasvasaron 500 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf, al que previamente se le adicionó 430 µL de medio de cultivo (BBM), y la mezcla se homogeneizó por inversión. A continuación, se le incorporó 50 µL de H₂SO₄ 1N y luego 20 µL de la solución de DPC (concentración final 0,01 % p/v), mezclando mediante el uso de vortex luego de cada paso (Figura 2.2).

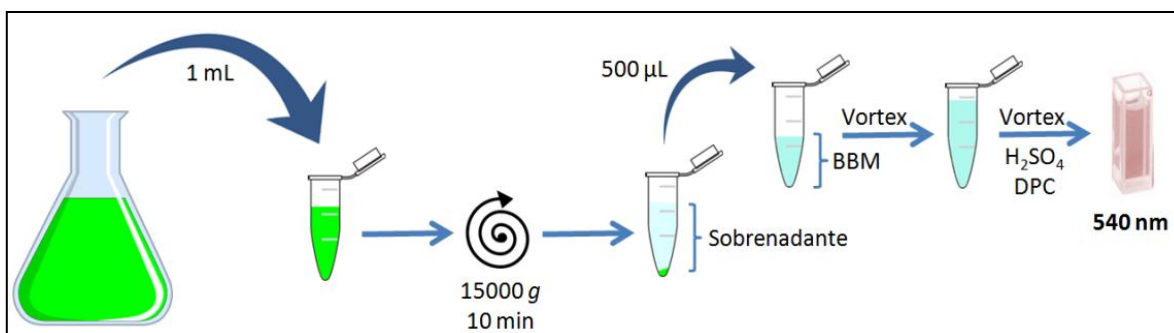


Figura 2.2. Esquema de la preparación de las muestras para la determinación de Cr (VI) mediante el uso de 1,5-difenilcarbazida (DPC).

En simultáneo se preparó la curva de calibración que abarcó el siguiente rango de concentraciones de Cr (VI): 0; 0,081; 0,1625; 0,325; 0,65 y 1,3 mg/L para la cual se usó una solución estándar de 5 mg/L de Cr (VI) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Preparación de la curva de calibración para la determinación de Cr (VI) mediante el método de la 1,5-difenilcarbazida (DPC).

Muestra	Cr (VI) (μL)	BBM (μL)	H_2SO_4 1N (μL)	DPC (μL)	Vol. final
Blanco	-	930	50	20	1 mL
0,081	12,5	917,5	50	20	1 mL
0,1625	25	905	50	20	1 mL
0,325	50	880	50	20	1 mL
0,65	100	830	50	20	1 mL
1,3	200	730	50	20	1 mL
Incógnita	500	430	50	20	1 mL

En la Figura 2.3 se muestra una curva de calibración característica para la determinación de la concentración de Cr (VI) mediante el método de la DPC. Cabe destacar que esta curva se obtuvo a partir de entre 18 y 33 réplicas por punto, presentando en la regresión lineal un ajuste con un R^2 de 0,9997, una pendiente de $0,6763 \pm 0,0005694$ y una ordenada al origen de $0,006905 \pm 0,003488$. Por lo tanto, se puede afirmar que es una técnica colorimétrica muy robusta para la determinación de Cr (VI).

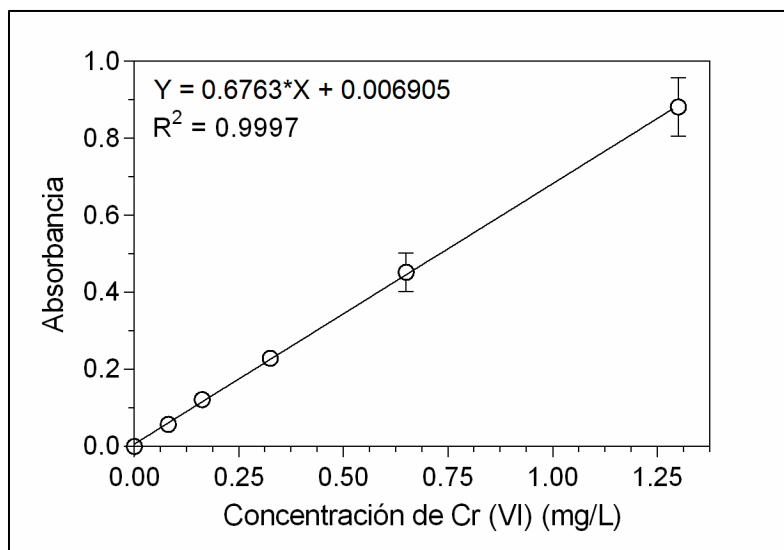


Figura 2.3. Curva de calibración característica para la determinación de Cr (VI) mediante el método de la 1,5-difenilcarbazida (DPC).

Adicionalmente, para la determinación del Cr total por EAA e ICP-MS los cultivos fueron filtrados usando un filtro de acetato de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$ de la marca Sartorius y, posteriormente, acidificados con ácido nítrico 0,5% p/V de concentración final.

Finalmente, la cuantificación del metal se realizó en el Departamento de Físicoquímica y Control de Calidad del Complejo Tecnológico Pilcaniyeu en el Centro Atómico Bariloche, que se encuentra bajo la dirección de la Dra. Ana Bohé.

2.4 Determinación de la dosis experimental de Cr (VI)

Para determinar la concentración de cromo a utilizar en la generación de la cepa resistente se realizó un ensayo de toxicidad para obtener el índice **CI50-72hs** (Concentración Inhibitoria Media: concentración del metal que reduce la tasa de crecimiento específica de la población en un 50% en 72 hs) (OECD, 2006). Este índice es de particular utilidad en estudios de toxicidad dado que permite determinar y/o evaluar la toxicidad de diferentes compuestos, como por ejemplo los metales, en los organismos. Previamente, se corroboró que la cepa a utilizar cumpliera con el criterio de aceptabilidad, es decir que, en las condiciones experimentales y sin el metal, la densidad celular aumentara al menos 16 veces en 72hs. Asimismo se realizó un ensayo preliminar (*range finding test*) para evaluar la sensibilidad de la cepa al Cr (VI) y definir el rango de concentraciones para el ensayo de toxicidad CI50-72hs. De esta manera, se expuso a la cepa a diferentes concentraciones de Cr (VI) relacionadas mediante diluciones en serie logarítmica (log en base 10): 0; 0,13; 1,3 y 13 mg/L. Partiendo de los resultados obtenidos del ensayo preliminar, se obtuvieron las concentraciones de no efecto y de efecto del metal, esto es la máxima concentración a la que se obtuvo un 0% de inhibición de la división celular y la mínima concentración que se aproximó al 100% de inhibición de la misma, respectivamente.

A continuación, para obtener el índice CI50-72hs la cepa de *S. dimorphus* fue expuesta a concentraciones crecientes de Cr (VI) relacionadas mediante diluciones en serie geométrica entre las concentraciones de efecto y no efecto obtenidas en el ensayo preliminar: 0; 0,8125; 1,625; 3,25; 6,5 y 13 mg/L. Luego de un período de incubación de 72 hs se procedió a cuantificar el crecimiento del cultivo mediante conteo en cámara de Neubauer. Para el cálculo de la CI50-72hs se compararon las tasas de crecimiento de los

distintos tratamientos (con cromo) con el control del ensayo (sin cromo) y, de esta manera, se determinó la tasa de inhibición producida por cada concentración de Cr (VI). Por último, se obtuvo la CI50 mediante el ajuste a una curva dosis-respuesta de regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism.

Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones experimentales: temperatura de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, luz continua, irradiancia fotosintéticamente activa (PAR) sobre la superficie del cultivo de $100\text{ }\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ y agitación manual 3 veces al día, realizadas por triplicado. En las Figuras 2.4 y 2.5 se muestra el diseño y una imagen real, respectivamente, de la cámara de iluminación que se utilizó para estos ensayos (Ramírez Romero & Mendoza Cantú, 2008).

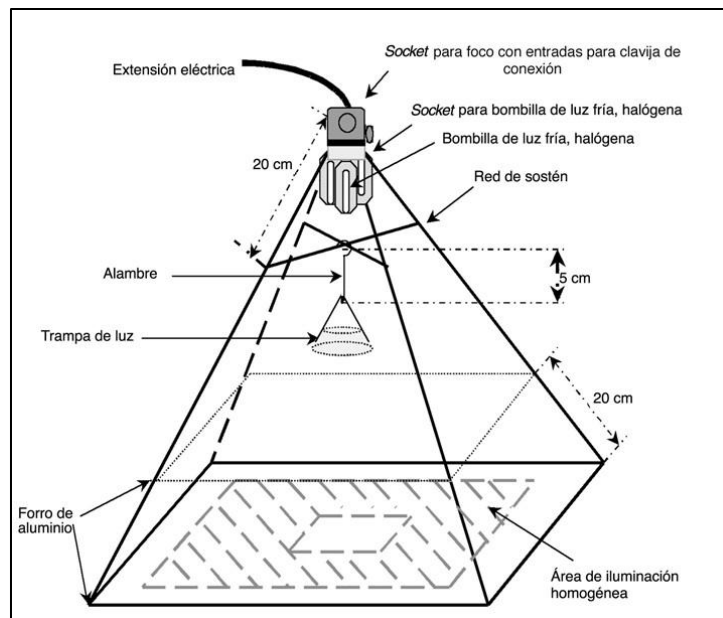


Figura 2.4. Diseño de la cámara de iluminación. Imagen tomada de Salgado (2004) y reproducida con autorización de la Dra. Ania Mendoza Cantú (Ramírez Romero & Mendoza Cantú, 2008). En el área marcada como “área de iluminación homogénea” se señala la zona donde siempre deberán ser colocados los viales de prueba dentro de la cámara. En esta banda la iluminación será homogénea proporcionando una intensidad luminosa de $100\text{ }\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

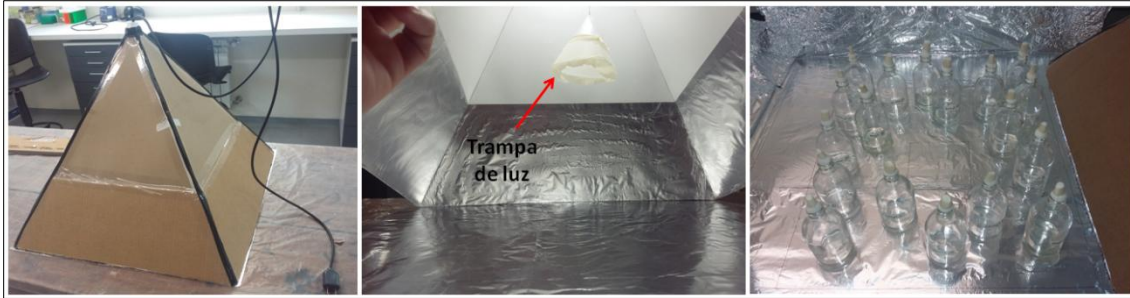


Figura 2.5. Imagen de la cámara de iluminación utilizada en los experimentos. La trampa de luz en combinación con el recubrimiento de aluminio son para garantizar la distribución homogénea de la iluminación sobre los viales de prueba.

2.5 Generación y caracterización de la cepa resistente a Cr (VI)

La concentración de Cr (VI) para generar la cepa resistente fue seleccionada en relación a la CI50, de manera de obtener una inhibición cercana al 50% sin sobre-estresar las células. En base a ello, se escogió la dosis de 1,3 mg/L (25 μ M) y se realizó un experimento de exposición controlada al metal siguiendo protocolos de la literatura (Corradi, Gorbi, Ricci, et al., 1995). La Figura 2.6 muestra un esquema donde se sintetizan los pasos seguidos para la generación de la cepa. Durante el ensayo se expuso un cultivo de $1,5 \times 10^6$ células/mL a 1,3 mg/L de Cr (VI) durante 95 días en las siguientes condiciones experimentales: volumen de 200 mL, fotoperíodo de 12 hs luz y 12 hs oscuridad, irradiancia de $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$, agitación continua en agitador con un buzo magnético, temperatura de $21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y aireación. En simultáneo se mantuvo un cultivo bajo las mismas condiciones experimentales, pero sin el agregado del metal (cepa control). Tanto la cepa tratada como la cepa control fueron subcultivadas a medio fresco cada 7 días para evitar que llegasen a la fase estacionaria. En el caso de la cepa tratada, además se le adicionaba el metal semanalmente para mantener la presión de selección. Una vez concluido el tiempo de exposición ambas cepas, control (**WT**: *Wild Type*) y resistente (**CRS**: *Chromium Resistant Strain*, según sus siglas en inglés), se cultivaron de manera rutinaria en medio sin cromo. Cabe destacar que ambas cepas se preservaron en picos de flauta con BBM-agar 1% p/v, repicándolas cada 6 meses, y que solamente han sido expuestas al metal durante los ensayos.

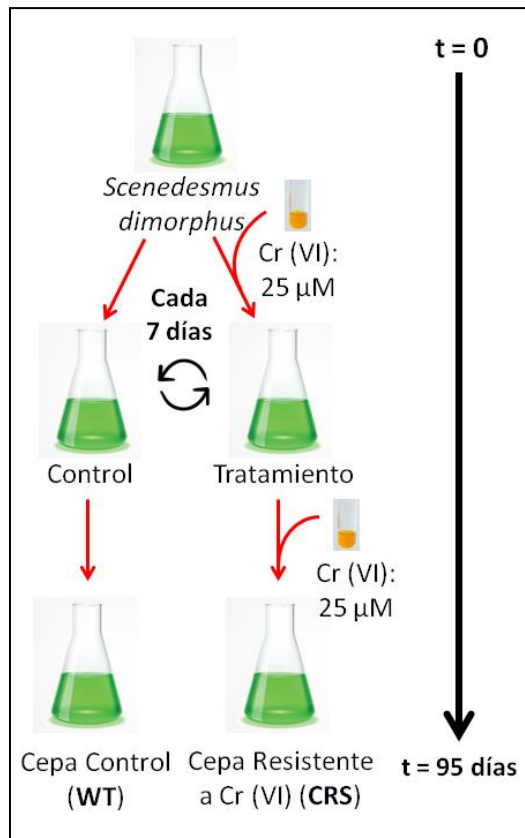


Figura 2.6. Esquema donde se muestran los pasos seguidos en la generación de la cepa resistente por exposición a cromo (VI).

2.5.1 Determinación de la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación celular

Una vez generada la cepa resistente, se comenzaron los experimentos de caracterización. Inicialmente, se realizaron curvas de crecimiento de las cepas CRS y WT mediante conteo diario de células en cámara de Neubauer. Las diferencias en el crecimiento se evaluaron comparando las tasas de crecimiento específicas (μ) y los tiempos de duplicación (T_2) de ambas cepas. Para esto se calculó, según la ecuación E.2.1, la tasa de crecimiento específica (μ) utilizando los datos de densidad celular (número de células por mililitro) registrados durante la fase exponencial (Andersen, 2005). Con el dato de tasa de crecimiento específica se obtuvieron los tiempos de duplicación (T_2) (ecuación E.2.2) de las dos cepas (Andersen, 2005).

$$\mu = \left(\ln \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \right) / \Delta_t \quad (\text{E.2.1})$$

donde N_t y N_0 son las densidades celulares a los tiempos t y 0 , y Δ_t es el intervalo de tiempo ($t_t - t_0$).

$$T_2 = \frac{0,6931}{\mu} \quad (\text{E.2.2})$$

Los experimentos se realizaron en Erlenmeyers de 500 mL conteniendo 200 mL de cultivo algal en BBM con una densidad celular inicial de 1×10^5 células/mL. Las cepas CRS y WT fueron expuestas a 0 y 1,3 mg/L de Cr (VI) por 37 y 52 días, respectivamente. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: temperatura de $21 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, irradiancia de $120 \text{ } \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 hs luz y 12 hs de oscuridad y en agitación continua para evitar su sedimentación. Las curvas se realizaron por triplicado y los conteos celulares se efectuaron diariamente. Cabe recordar que estos experimentos se realizaron luego de la generación de la cepa resistente.

2.5.2 Estudio de la resistencia de la cepa resistente (CRS)

La resistencia de CRS se evaluó de la siguiente forma: la cepa fue expuesta a 0; 1,3; 1,95 y 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs y se comparó su crecimiento con el de la cepa WT sometida a los mismos tratamientos con el metal. Los experimentos se realizaron en viales de 100 mL con 30 mL de células en BBM a una densidad de 1×10^5 células/mL. La densidad celular se determinó a las 120 hs mediante conteo celular. Adicionalmente, para tener un registro más detallado del crecimiento, se realizó un segundo experimento en las mismas condiciones experimentales pero solamente utilizando la concentración de 2,6 mg/L y la densidad celular se midió cada 24 hs.

2.5.3 Determinación de la tasa de mortalidad

Posteriormente a los ensayos de toxicidad, se evaluó la viabilidad de las células mediante tinción por exclusión (Yip & Auersperg, 1972) con safranina (concentración final 0,25 % p/v), y se las observó al microscopio. La safranina es un colorante catiónico que

puede atravesar libremente las membranas celulares (Vullo et al., 2000). Las células vivas excluyen activamente el colorante debido a la selectividad de las membranas celulares (Yip & Auersperg, 1972). Sin embargo, si la célula está muerta, la safranina se acumula en el interior celular ya que interactúa y queda retenida por moléculas cargadas de forma negativa como los ácidos nucleicos y los polisacáridos (Vullo et al., 2000). De esta forma, a las microalgas teñidas (rojas) se las considera células muertas.

La tasa de mortalidad se calculó mediante conteo de células totales y muertas en cámara de Neubauer y se utilizó la siguiente ecuación:

$$Tasa\ de\ mortalidad = \left(\frac{n^\circ\ células\ muertas}{n^\circ\ células\ totales} \right) \times 100 \quad (E.2.3)$$

Con el objeto de probar la eficacia de la técnica para detectar la presencia de células muertas y definir la dilución de safranina a utilizar se realizó un control positivo. Este consistió en un cultivo (1×10^6 células/mL) tratado con calor en un baño termostático a 100 °C durante 10 min para provocar la muerte de las células. Posteriormente las muestras se tiñeron con el colorante durante 5 minutos y se las observó al microscopio. Adicionalmente, como control negativo de mortalidad se usaron muestras del mismo cultivo pero no se les realizó el tratamiento con calor.

2.6 Efectos del Fe del medio de cultivo en la reducción del Cr (VI)

Para constatar el efecto del Fe en la reducción del Cr (VI) se realizó un experimento en el que se midió cada 24 hs la presencia de Cr (VI) en 4 medios de cultivos con diferentes concentraciones de Fe: BBM ($1,79 \times 10^{-5}$ M de Fe), BBM-Fe ($4,48 \times 10^{-6}$ M de Fe), BBM sin Fe (no contiene Fe) y Bristol (no contiene Fe), y se los expuso a 1,3 mg/L de Cr (VI) durante 96 hs. Adicionalmente se comparó el crecimiento a las 120 hs de las cepas WT y CRS en BBM y BBM-Fe en las condiciones experimentales descritas en la siguiente sección (Sección 2.7) y en ausencia del metal.

2.7 Efectos del metal sobre las cepas resistente (CRS) y *wild type* (WT)

Previamente a evaluar el efecto del metal sobre la cepa resistente, 1×10^5 células/mL fueron adaptadas a un medio de cultivo modificado, BBM con una concentración 4 veces menor de Fe ($4,48 \times 10^{-6}$ M de Fe) (BBM-Fe) durante 3 días. De esta manera se logró minimizar la reducción de Cr (VI) a Cr (III) por la interacción con el Fe (agente reductor) presente en el medio (James et al., 1997; Kim et al., 2002). Posteriormente las células fueron expuestas a 1,3 y/o 1,95 y/o 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs bajo las siguientes condiciones: densidad celular inicial de 1×10^5 células/mL; pH 6,8; temperatura de 21 °C; irradiancia de $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; fotoperíodo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad y agitación manual 3 veces al día para evitar la sedimentación. Los experimentos se realizaron en viales de 100 mL conteniendo 30 o 40 mL de BBM-Fe con la densidad celular previamente mencionada. Asimismo, en cada experimento se utilizaron controles, es decir cultivos de las cepas WT y CRS que se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los cultivos tratados con Cr (VI) pero sin el agregado del metal. Por último, para tener un registro de la concentración de BBM-Fe durante el ensayo, adicionalmente se preparó BBM-Fe al que se le adicionó cromo pero en ausencia de microalgas.

Para estudiar el efecto del cromo (VI) sobre las cepas WT y CRS se realizaron las siguientes observaciones y/o determinaciones:

2.7.1 Observaciones al microscopio de los cultivos en búsqueda de signos de estrés

Se observaron las cepas CRS y WT en un microscopio óptico (DM1000 Leica Microsystems, Alemania) luego de ser expuestas a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. Se realizaron observaciones a distintos aumentos, 400x y 1000x, de modo tal de evaluar cambios en el aspecto de los cultivos así como a nivel celular. Se hizo especial énfasis en la aparición de aglomerados celulares, cambios en la morfología y disociación de los cenobios. Se tomaron fotos de los cultivos con una cámara digital ICC50HD (Leica Microsystems, Suiza) y se registraron los cambios mediante la utilización del software LAS

EZ de Leica. Adicionalmente se realizaron observaciones por microscopía electrónica de barrido (Zeiss Crossbeam 350, Alemania) para evaluar cambios en la morfología y pared celular, en detalle, en los cultivos de las cepas CRS y WT. Las observaciones y análisis al microscopio electrónico se realizaron en el servicio de microscopía electrónica del Centro Atómico Bariloche.

Las muestras observadas por microscopia electrónica de barrido (SEM, según sus siglas en inglés) se prepararon mediante un protocolo estándar usando glutaraldehído con una posterior deshidratación con alcohol. Inicialmente, 5×10^6 células se fijaron en glutaraldehído 2,5% en buffer PBS 0,1 M pH 7 sobre un papel de filtro, de modo tal de adherirlas y/o fijarlas al mismo. Brevemente, se centrifugó un volumen del cultivo conteniendo 5×10^6 células a $2.290 \times g$ en rotor de ángulo variable (*swinging bucket*) en una centrífuga HERMLE Z 366 (HERMLE Labortechnik, Alemania) durante 30 min para obtener un pellet. A continuación, se descartó el sobrenadante, se le agregó 200 μ L de glutaraldehído 2,5% y se lo transfirió a un papel de filtro donde se dejó fijando la muestra durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó una vez la muestra con PBS 0,15 M, se retiró el exceso de PBS y se agregó etanol 70%. Se utilizaron concentraciones crecientes de etanol, partiendo de 70% hasta llegar a 100% para deshidratar las células de forma secuencial, luego de lo cual se las dejó secando *overnight*. Por último, a cada muestra se le realizó un bombardeo (*sputtering*) con oro durante 40 segundos para formar una delgada capa superficial de metal y se procedió a la adquisición de las imágenes.

2.7.2 Determinación de la inducción de estrés oxidativo: análisis de los niveles de ROS y de la actividad de catalasa

El estrés oxidativo generado por exposición al metal se evaluó de manera directa mediante la determinación de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, según sus siglas en inglés). Además, se estudió la actividad enzimática de la catalasa, enzima involucrada en la ruptura de H_2O_2 , uno de los principales productos del estrés oxidativo.

Para el análisis de los niveles intracelulares de ROS se usó un marcador fluorescente sensible a la oxidación, dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA). Este marcador es hidrofóbico por lo que puede atravesar libremente las membranas celulares. Sin embargo, en el interior celular es clivado por esterasas y esto impide que pueda salir nuevamente de la célula. En contacto con las ROS el marcador es oxidado y se torna fluorescente (Figura 2.7) (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

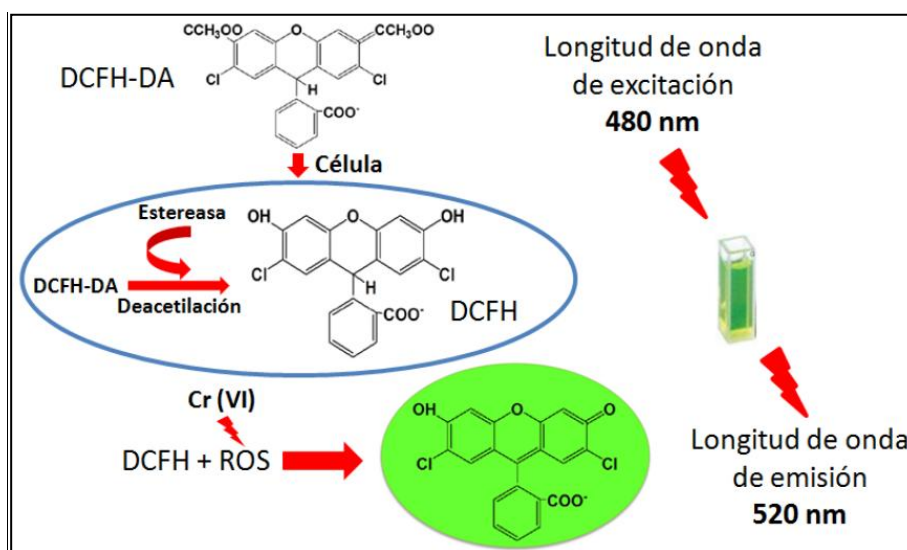


Figura 2.7. Reacción del marcador fluorescente dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) al ingresar a la célula e interactuar con las ROS. Las longitudes de onda de excitación y emisión son 480 nm y 520 nm, respectivamente.

Inicialmente, 50 mL de cultivos de las cepas CRS y WT se trataron con 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. Finalizado el ensayo, las células fueron centrifugadas a $2.290 \times g$ en rotor *swinging bucket* durante 30 min para obtener un pellet. Luego los pellets fueron resuspendidos en 1 mL de BBM-Fe y se los incubó con DCFH-DA $3 \mu\text{M}$ de concentración final durante 10 min en oscuridad. Posteriormente se centrifugaron nuevamente las muestras a $15.000 \times g$ por 10 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, se descartó el exceso de DCFH-DA junto con el sobrenadante y se congelaron los pellets a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. A continuación, para favorecer la lisis, se realizó un ciclo de congelamiento/descongelamiento. Cada muestra fue resuspendida en 500 μL de buffer fosfato-EDTA (buffer PE: 0,5 M fosfato: 0,1 M EDTA)

y se sonicaron las células usando un ultrasonificador (Omni International, Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer, USA) durante 3 minutos en hielo. Finalmente se agregaron 500 μ L de buffer PE y el sobrenadante (extracto) fue recuperado mediante centrifugación a 15.000 x *g* por 10 min a 4 °C. Los datos de fluorescencia se obtuvieron con una excitación de 480 nm longitud de onda, usando un espectrofluorómetro (Horiba_Fluoromax-4), y los resultados se presentaron en unidades de fluorescencia relativa. Para todas las muestras se realizó un espectro de emisión entre 500 y 600 nm. Los datos de fluorescencia se normalizaron al contenido de proteínas que se determinó mediante el reactivo de Bradford. En la Figura 2.8 se muestra un esquema de los pasos seguidos para la determinación de ROS.

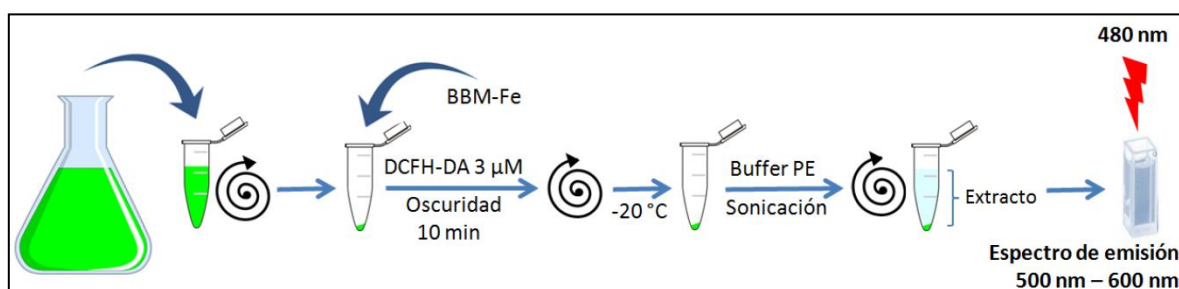


Figura 2.8. Esquema de la preparación de las muestras para la determinación de ROS mediante el uso de dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA).

Adicionalmente se tomaron imágenes de las cepas CRS y WT usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800, Japón). Las longitudes de onda de emisión y excitación fueron 485 y 530 nm, respectivamente. La preparación de las muestras hasta la incubación con DCFH-DA se realizó de manera similar a las de las determinaciones por espectrofluorometría. Brevemente, luego de la incubación con DCFH-DA (concentración final de 3 μ M), las muestras se centrifugaron nuevamente a 15.000 x *g* por 10 min a 4 °C, se descartó el exceso de DCFH-DA junto con el sobrenadante y se resuspendió a las células en 50 μ L de H₂O deionizada. Las tinciones con DCFH-DA se realizaron en muestras separadas para las mediciones espectrofluorométricas y las capturas de imágenes. Cabe destacar que las imágenes se tomaron bajo los mismos

parámetros, que fueron establecidos sobre la imagen que presentaba menor fluorescencia.

El análisis de la actividad enzimática de catalasa (CAT) se determinó mediante la desaparición de H_2O_2 (Kang et al., 1999). Los pellets se obtuvieron de la misma forma que en el ensayo de determinación de ROS con DCFH-DA, se congelaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 hs y luego fueron resuspendidos en $300\text{ }\mu\text{L}$ de buffer fosfato-EDTA. A continuación, las células fueron sonicadas con un ultrasonificador durante 3 min en hielo. Se las centrifugó a $15.000\text{ } \times g$ durante 10 min a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y el sobrenadante se recuperó para determinar la actividad de CAT. Luego se preparó una mezcla de reacción conteniendo: $490\text{ }\mu\text{L}$ de H_2O deionizada, $200\text{ }\mu\text{L}$ de buffer fosfato:EDTA (PE), $300\text{ }\mu\text{L}$ del sobrenadante (conteniendo el extracto enzimático) y $10\text{ }\mu\text{L}$ H_2O_2 $0,1\text{M}$ (concentración final $1\mu\text{M}$), que se agregaron y mezclaron en una cubeta. Por último, la actividad enzimática se midió en espectrofotómetro evaluando la disminución de la absorbancia a 240 nm , ocasionada por la desaparición del H_2O_2 . La actividad enzimática de CAT se expresó en función del contenido de proteína de cada muestra. En la Figura 2.9 se muestra un esquema de los pasos seguidos para la determinación de la actividad enzimática.

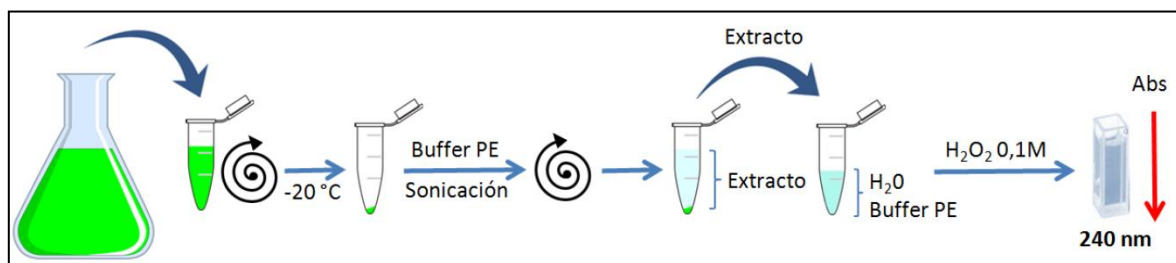


Figura 2.9. Esquema de la preparación de las muestras para realizar la determinación de la actividad enzimática de catalasa.

2.7.3 Análisis de la acumulación de lípidos

La acumulación de lípidos se analizó por el método colorimétrico de la sulfo-fosfovanillina (SPV) (Mishra et al., 2014). La SPV reacciona con los dobles enlaces de los ácidos

grasos insaturados, generando un compuesto coloreado que presenta un pico de absorción a 530 nm. Un detalle de la reacción y formación del compuesto coloreado se muestra en la Figura 2.10. La solución estándar de lípidos y la de SPV se prepararon según Mishra (2014) (Mishra et al., 2014). Brevemente, la solución de SPV se prepara de la siguiente forma: a 75 mg de vainillina se le adicionan 1 mL de etanol absoluto, luego 9 mL de agua y por último 40 mL de ácido fosfórico concentrado, quedando una solución 0,15 % p/v.

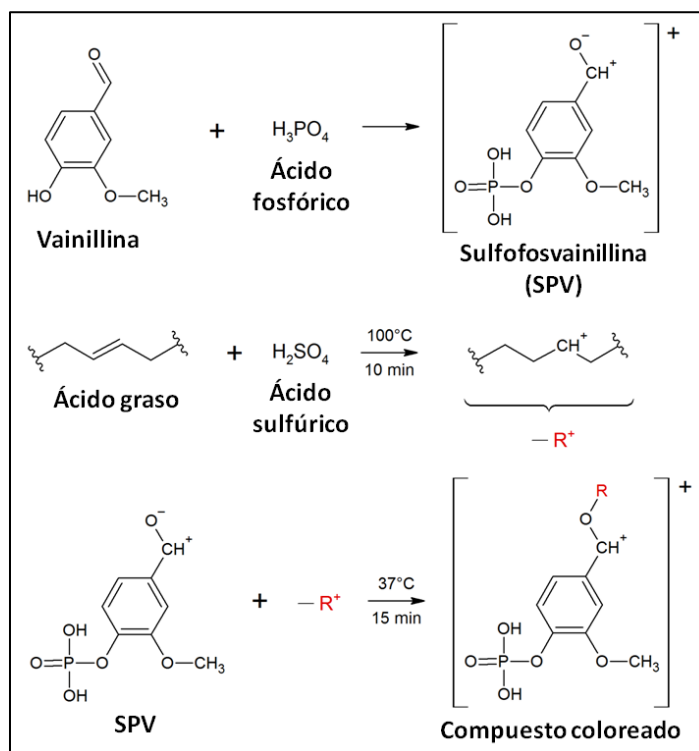


Figura 2.10. Reacción de la formación del compuesto coloreado para la determinación de lípidos usando sulfo-fosfo-vanillina (SPV).

Inicialmente, 40 mL de cultivo de ambas cepas fueron expuestos a 0; 1,95 y 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 horas. Finalizado el ensayo los pellets se obtuvieron de igual forma que en los experimentos anteriores (Sección 2.6.2). Posteriormente, se trasladó cada pellet a un tubo de vidrio con tapa a rosca, se le agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se lo calentó a $100^\circ C$ por 10 min. A continuación, cada muestra se enfrió en baño de hielo durante 5 min, se le agregó 2,5 mL de la solución de SPV a cada una y se

la incubó a 37 °C durante 15 min. Finalmente, se realizó una curva de calibración a 530 nm para la cuantificación de los lípidos usando aceite de maíz como estándar. En la Figura 2.11 se muestra un esquema de los pasos seguidos para la determinación de lípidos.

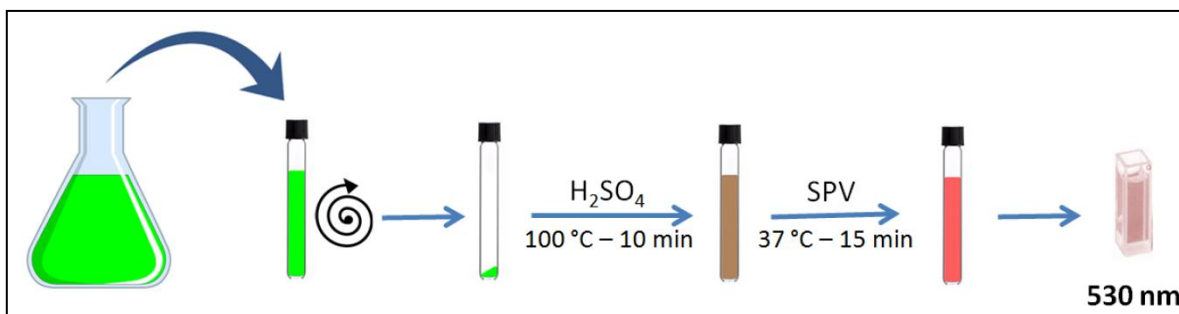


Figura 2.11. Esquema de la preparación de las muestras para la determinación de lípidos usando sulfo-fosfo-vanillina (SPV).

2.7.4 Determinación del coeficiente de absorción particulado y análisis de los pigmentos

Los cambios en las propiedades de absorción de la luz de los cultivos de *Scenedesmus dimorphus* se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la técnica "filter pad technique" (**QFT**: *Quantitative Filter Technique*, según sus siglas en inglés) (Mitchell et al., 2003; Mitchell, 1990; Roesler, 1998). Esta técnica permite detectar cambios *in vivo* en la absorción del cultivo y, por lo tanto, en el cloroplasto y en los tilacoides, a nivel de composición de pigmentos y también en la morfología y el empaquetamiento de los mismos (Berner et al., 1989; Falkowski & LaRoche, 1991; Kirk, 1994). El efecto de empaquetamiento se define como la disminución en la absorción pigmentaria dentro de las células debido a cambios en la concentración intracelular de pigmentos o a cambios en el tamaño celular (Kirk, 1975; Morel & Bricaud, 1981). Por esto, la descripción del efecto de empaquetamiento nos puede brindar información de cambios en la morfología/tamaño de las células, así como a cambios debido a fotoaclimatación (Pérez et al., 2020).

Para la técnica QFT se utilizó un espectrofotómetro de doble haz (UV-Vis 1800) y a partir de los espectros de absorbancia obtenidos se calcularon los espectros de absorción *in vivo*. Los experimentos se realizaron luego de 120 hs de exposición a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI). Finalizado el ensayo, 40 mL de cultivo se filtraron usando un filtro de fibra de vidrio GF/F (Whatman) de $\sim 0,75 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y se realizó un barrido espectral entre 400 y 700 nm. En la Figura 2.12 se muestra un esquema de los pasos seguidos en la técnica QFT.

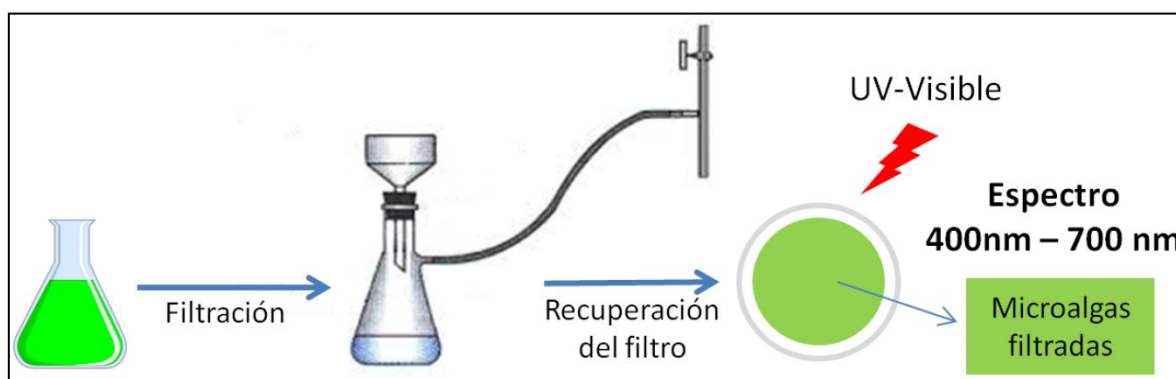


Figura 2.12. Esquema de la preparación de las muestras en la técnica "filter pad technique".

Los cambios en la concentración y composición pigmentaria de las cepas fueron evaluados mediante la extracción de los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores (clorofilas y carotenoides). Los experimentos se realizaron bajo dos condiciones de luz, $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ denominada **HL** (*Higher Light*, según sus siglas en inglés) y $35 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ denominada **LL** (*Lower Light*, según sus siglas en inglés). Luego de 120 hs de un tratamiento con 0 y 1,95 mg/L con Cr (VI), se centrifugó 40 mL del cultivo a $2.290 \times g$ en un rotor *swinging bucket* durante 30 min. Posteriormente, el sobrenadante se descartó, los pellets se trasvasaron a tubos Eppendorf y se congelaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 hs. Luego, para favorecer la extracción, se realizó un ciclo de congelamiento/descongelamiento. Los pigmentos se extrajeron con metanol absoluto durante 1 h a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación, se realizó un barrido espectral entre 350 y 750 nm para cada muestra. Se calcularon las concentraciones de clorofila *a* y *b* y de carotenoides usando las ecuaciones descriptas en

Wellburn (1994) (Wellburn, 1994). En la Figura 2.13 se muestra un esquema de los pasos seguidos para la extracción de pigmentos.

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/mL}) (C_a) = 15,66 * A_{666} - 7,34 * A_{653} \quad (\text{E.2.4})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g/mL}) (C_b) = 27,05 * A_{653} - 11,21 * A_{666} \quad (\text{E.2.5})$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/mL}) = (1000 * A_{470} - 2,84 * C_a - 129,2 * C_b) / 221 \quad (\text{E.2.6})$$

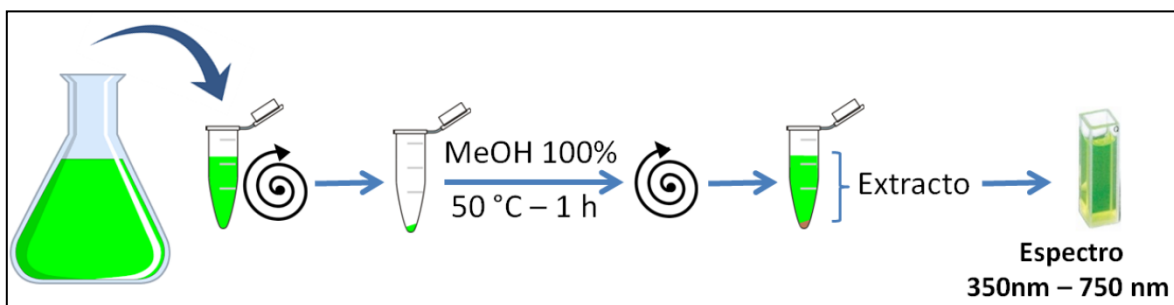


Figura 2.13. Esquema de la preparación de las muestras para la extracción de pigmentos mediante el uso de metanol.

2.7.5 Producción de exudados por exposición a cromo y análisis del crecimiento de las cepas resistente (CRS) y wild type (WT)

Se evaluó el efecto de los exudados producidos por las dos cepas en el crecimiento de las cepas WT y CRS mediante dos experimentos diferentes que constaron de dos etapas: 1) la generación de los exudados y 2) la exposición de las cepas al Cr (VI) en presencia de los exudados. Para la obtención de los exudados, se cultivaron las dos cepas durante 120 hs expuestas a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI). Las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 2.290 x g en un rotor *swinging bucket* por 30 min en tubos Falcon estériles de 50 mL (de 3 a 6 tubos Falcon por cepa, dependiendo del volumen final que se necesitara). Los exudados (sobrenadantes) de cada cepa fueron recuperados y se combinaron las réplicas (3 a 6 réplicas, según el ensayo) en un Erlenmeyer de 500 mL. En todos los casos, se corroboró la ausencia de células en los exudados a través de observación microscópica a 400 X de magnificación, en el microscopio especificado en

secciones anteriores. A continuación, se determinó la concentración de Cr (VI) en cada exudado generado. Previamente a la segunda etapa, y de forma similar a todos los ensayos de exposición a Cr (VI), las cepas fueron adaptadas en medio BBM-Fe durante 3 días. Una vez expuesto a los exudados la densidad celular de los cultivos fue medida cada 24 horas mediante conteo en la cámara de Neubauer. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

En el primer experimento se evaluó el efecto de los exudados de cada una de las cepas en el crecimiento de las dos cepas (Figura 2.14). De esta manera, los exudados producidos (210 mL) fueron: exudado de WT con Cr (VI) (**WT Cr EX**) y exudado de CRS con Cr (VI) (**CRS Cr EX**). A continuación, los 210 mL de cada exudado (WT Cr EX y CRS Cr EX) se separaron en 2 Erlenmeyers (105 mL) y cada uno fue inoculado con las células de CRS y de WT hasta obtener una densidad de 1×10^5 cél/mL. Por último, esos 105 mL fueron divididos en 3 viales con 35 mL cada uno (triplicados). El experimento tuvo una duración de 5 días. A continuación, se detallan los 4 tratamientos:

WT + WT Cr EX

WT + CRS Cr EX

CRS + WT Cr EX

CRS + CRS Cr EX

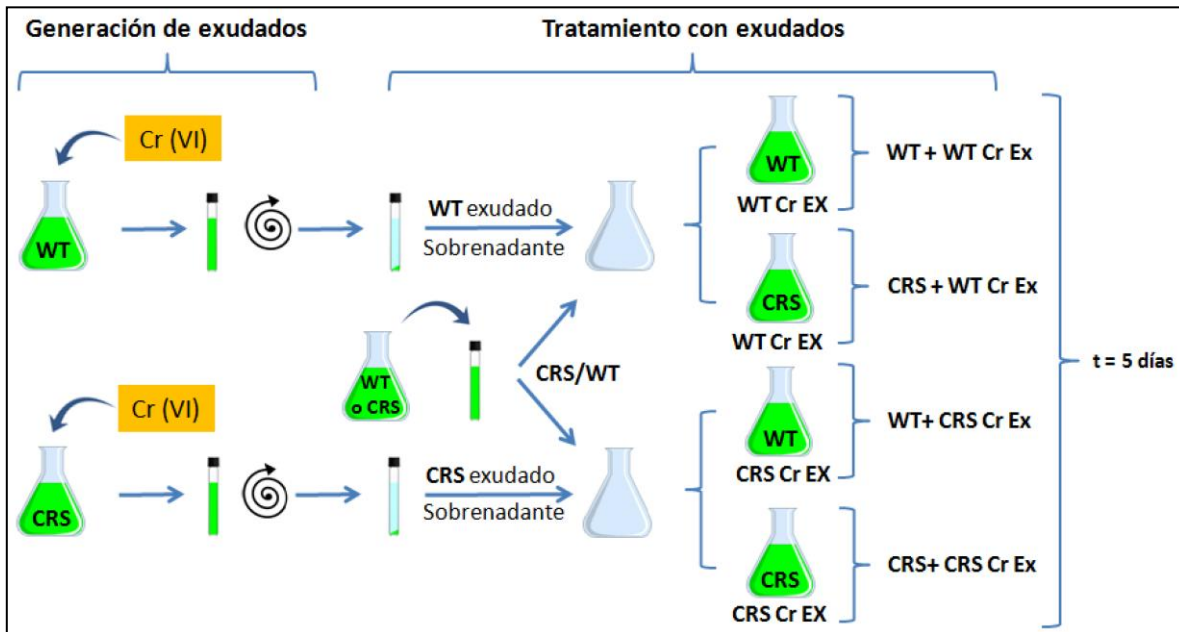


Figura 2.14. Esquema de la generación de los exudados de cada cepa y su uso en los tratamientos.

El segundo experimento se enfocó en el crecimiento de la cepa WT con 2 tipos de exudados (Figura 2.15). De esta manera, los exudados producidos (105 mL) fueron: exudado de WT sin el metal (**WT EX**) y exudado de CRS con Cr (VI) (**CRS Cr EX**). Al finalizar el periodo de 120 hs de la etapa inicial, la concentración final de Cr (VI) fue dosada en 1,85 mg/L para ser utilizada en la segunda etapa del experimento. A continuación, los 105 mL de cada exudado (WT EX y CRS Cr Ex) fueron inoculados con las células de la cepa WT hasta obtener una densidad de 1×10^5 cél/mL y fueron divididos en 3 viales con 35 mL cada uno (triplicados). Además, se hicieron los siguientes tratamientos como controles: la cepa WT (1×10^5 cél/mL) fue tratada con 0 y 1,85 mg/L de Cr (VI) durante 11 días. La duración del ensayo se extendió a 11 días en función de los resultados del experimento anterior, los cuales se muestran en la sección 3.11. A continuación, se detallan los 4 tratamientos:

WT + **WT EX** (cepa WT en presencia de exudado de la misma cepa crecida sin Cr (VI)).

WT + **CRS Cr EX** (cepa WT en presencia de exudado de la cepa CRS crecida 1,95 mg/L de Cr (VI), siendo el remanente del metal 1,85 mg/L)

WT + Cr (VI) (con 1,85 mg/L Cr (VI)) (cepa WT en un tratamiento estándar con Cr (VI)).

WT sin Cr (VI) (cepa WT sin tratamiento).

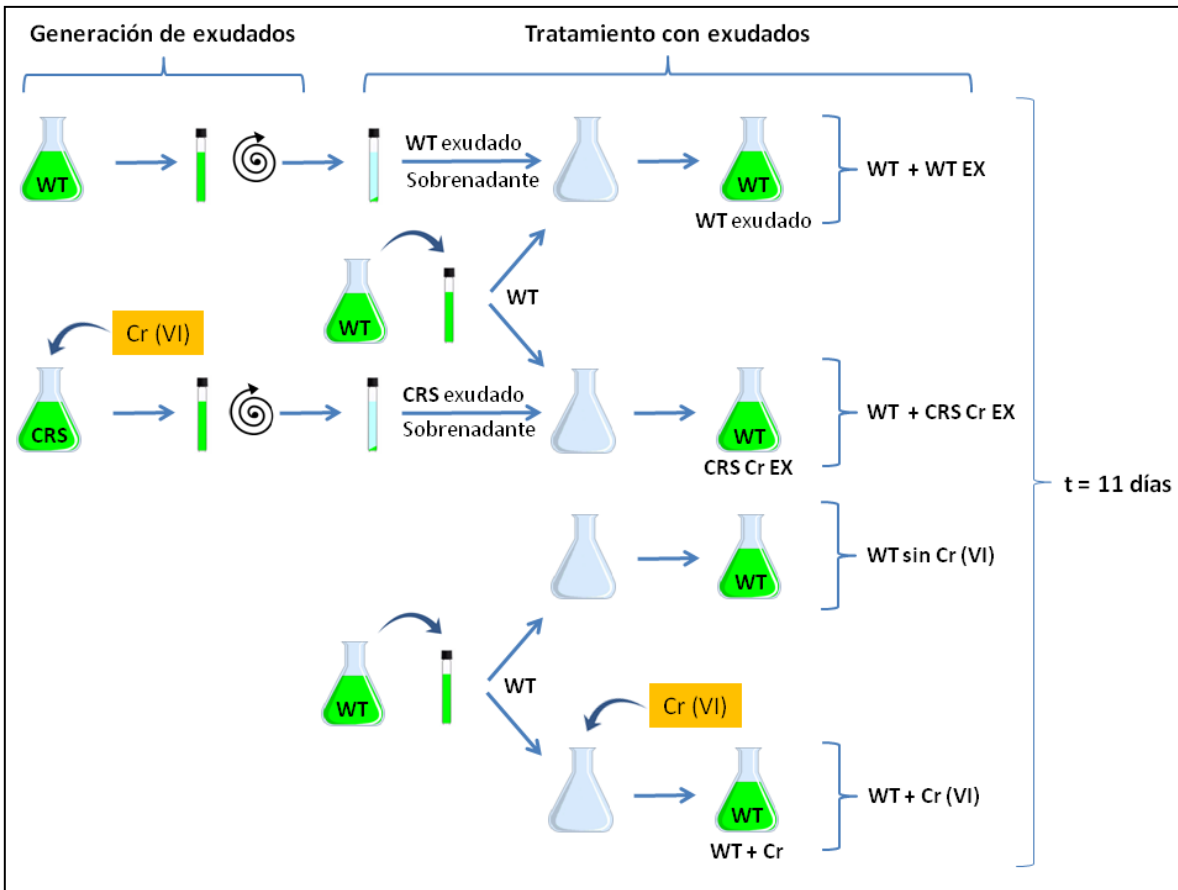


Figura 2.15. Esquema de la generación de los exudados de cada cepa y su uso en los tratamientos.

2.7.6 Análisis de los grupos funcionales y de las macromoléculas de la pared celular

Se estudió el efecto del metal en los grupos funcionales y en la síntesis de macromoléculas presentes en la pared celular en las cepas WT y CRS. Luego de un tratamiento con 1,95 mg/L de Cr (VI) por 120 hs, se tomó un volumen que contuviese el mismo número de células totales para todos los tratamientos y se lo trasvasó a un tubo Falcon. De esta manera se garantizó el trabajar con un número de células equivalentes

para cada tratamiento. A continuación, se centrifugaron las muestras a 2.290 x *g* en un rotor *swinging bucket* durante 30 min. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets se resuspendieron en 30 µL de BBM-Fe. Los experimentos se realizaron siguiendo la metodología propuesta y descrita en Ferraro (2018) (Ferraro et al., 2018). Brevemente, 5 µL de cada pellet fueron depositados sobre el cristal del UATR y secados con un flujo de nitrógeno gaseoso. Cabe destacar que el pellet contenía el mismo número de células totales para todos los tratamientos. Se tuvo la precaución de que el cristal estuviese completamente cubierto por la muestra previamente a realizar la determinación. Los espectros de FTIR se colectaron usando un UATR *SpectrumTwo spectrometer* (Perkin-Elmer, Reino Unido) en el rango de 400–4000 cm⁻¹. Los datos obtenidos se procesaron usando el software Origin. La asignación e identificación de los picos correspondientes a los diferentes grupos funcionales se realizó en base a lo reportado en bibliografía (Giordano et al., 2001; Heraud et al., 2007; Wagner et al., 2010).

2.8 Ensayos de remoción de cromo

Se realizaron experimentos de remoción de Cr (VI) usando cultivos de algas en estado estacionario. Cabe destacar que se trabajó con cultivos en estado estacionario para poder obtener una mayor densidad celular y evitar tener que concentrar un volumen muy grande para aumentar la biomasa. Los ensayos de remoción se hicieron en viales de 100 mL conteniendo 10 mL de células diluidas en BBM-Fe. Las cepas CRS y WT fueron expuestas a 100 mg/L de Cr (VI) a pH 2 y 6,8 durante 24 hs y 10 días, respectivamente. Luego del tratamiento con el metal la suspensión de algas fue filtrada usando un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm de la marca Sartorius. Para la determinación de cromo por EAA, el filtrado fue acidificado con ácido nítrico 50% p/V obteniéndose una concentración final de 0,5 % p/V. En función de los resultados se calcularon la eficiencia y la capacidad de remoción (*q*) según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Eficiencia de remoción} = \left(\frac{\text{Cr en biomasa}}{\text{Cr inicial}} \right) * 100 \quad (\text{E.2.7})$$

$$Cr \text{ en biomasa} = Cr \text{ inicial} - Cr \text{ total en filtrado} \quad (\text{E.2.8})$$

$$\text{Capacidad de remoción } (q) = mg \text{ de cromo} / g \text{ de biomasa seca} \quad (\text{E.2.9})$$

Cabe destacar que en las ecuaciones E.2.7 y E.2.8 la unidad de concentración del metal es mg/L, así como también el término “Cr inicial” hace referencia a la concentración de cromo que se adicionó a cada tratamiento en el inicio del ensayo.

El peso seco (g biomasa seca) necesario para calcular la capacidad de remoción de las cepas WT y CRS se determinó mediante secado en estufa. Brevemente, 30 mL de cultivos de densidad celular de 12×10^6 células/mL se trasvasaron a crisoles de tara conocida y se evaporó el medio de cultivo en estufa a 60 °C durante 48 horas. El peso seco se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Peso seco } (g) = [((\text{Peso células} + \text{crisol}) - \text{Peso crisol}) * 1000] / 30 \quad (\text{E.2.10})$$

Cabe destacar que todas las unidades de la ecuación E.2.10 están expresadas en gramos (g).

2.9 Análisis estadísticos

Todos los experimentos se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como las medias \pm el desvío estándar (SD). Los análisis estadísticos y las diferencias significativas se analizaron mediante ANOVA de una vía con test Tukey para comparaciones múltiples, ANOVA de dos vías con test Sidak para comparaciones múltiples y prueba t de Student para muestras desapareadas. En todos los casos el nivel de significancia fue de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se efectuaron usando el software Prism (GraphPad Software, USA).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Ensayo preliminar y determinación del índice CI50-72hs

Inicialmente, para determinar la concentración de Cr (VI) a utilizar en el ensayo de generación de la cepa de *S. dimorphus* resistente se realizó un ensayo para calcular la CI50-72hs. La CI50-72hs es un índice que se define como la concentración del metal que reduce la tasa de crecimiento específica de la población en un 50% en 72 hs (OECD, 2006). Siguiendo las normas de la OECD, previo a realizar un ensayo de toxicidad, se corroboró que la cepa a utilizar cumpliera con el criterio de aceptabilidad. Esto significa que, en las condiciones experimentales pero sin el tóxico, el crecimiento aumentara al menos 16 veces en 72hs. En este caso la cepa de *S. dimorphus* creció unas 130, 24 y 24 veces partiendo de una densidad inicial de 1×10^4 ; 1×10^5 ; 1×10^6 células/mL, respectivamente (Tabla 3.1). En base a esto, se optó por realizar los ensayos utilizando una densidad inicial de 1×10^4 células/mL.

Tabla 3.1. Selección de la densidad celular según el criterio de aceptabilidad de la OECD (2006) (OECD, 2006). La densidad celular se determinó mediante conteo celular a las 72hs.

δ_{inicial} (n° cél/mL)	Duración	δ_{final} (n° cél/mL)	Tasa de crecimiento
1×10^4	72 hs	$1,3 \times 10^6$	Aumentó 130 veces
1×10^5	72 hs	$2,4 \times 10^6$	Aumentó 24 veces
1×10^6	72 hs	$2,4 \times 10^7$	Aumentó 24 veces

A continuación, se efectuó un ensayo preliminar para determinar el rango de concentraciones a utilizar en el ensayo CI50-72hs. Este experimento nos da un indicio de la sensibilidad de nuestro organismo al evaluar su respuesta en un amplio rango de concentraciones del contaminante. Mediante el ensayo preliminar pudimos definir las concentraciones de no efecto y de efecto del metal, esto es la máxima concentración a la que se obtuvo un 0% de inhibición y la mínima concentración que se aproximó al 100% de inhibición del crecimiento, siendo estas 0 y 13 mg/L de Cr (VI), respectivamente (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Ensayo preliminar: Tasa de crecimiento (μ) e inhibición del crecimiento de *S. dimorphus* ante la exposición a Cr (VI). La cepa fue expuesta a 0; 0,13; 1,3 y 13 mg/L de Cr (VI) durante 72 hs. La densidad celular se determinó mediante conteo celular. SD: desviación estándar. El experimento se realizó por triplicado.

	0 mg/L		0,13 mg/L		1,3 mg/L		13 mg/L	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Tasa de crecimiento (μ)	1,49	0,04	1,36	0,03	1,20	0,10	0,16	0,16
Inhibición del crecimiento (%)	0,00	0,00	9,47	2,20	20,07	6,92	89,27	10,24

Por último, se realizó un ensayo para determinar la CI50-72hs, la cual se obtuvo mediante el ajuste a una curva dosis-respuesta de regresión no lineal y fue de 1,80 mg/L de Cr (VI) (Figura 3.1). De esta manera, se decidió utilizar para la generación de la cepa una concentración de 1,3 mg/L de Cr (VI) (siendo esta menor a la CI50). De este modo, se garantizó mantener una presión de selección que no sobre-estrese a la cepa durante el ensayo.

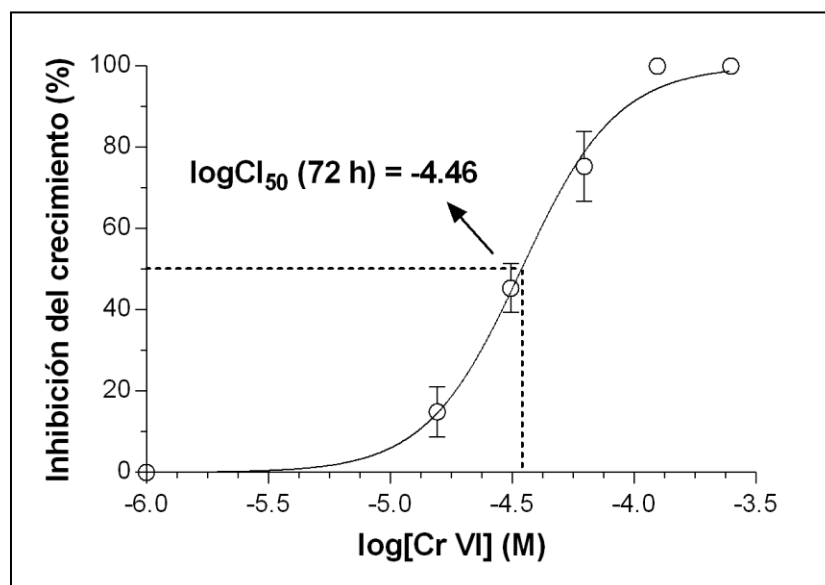


Figura 3.1. Determinación de la CI50-72hs mediante el ajuste a una curva dosis-respuesta de regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism. *S. dimorphus* fue expuesta a 0 mg/L (0 M); 0,8125 mg/L ($1,563 \times 10^{-5}$ M); 1,625 mg/L ($3,125 \times 10^{-5}$ M); 3,125 mg/L ($6,250 \times 10^{-5}$ M); 6,5 mg/L ($1,250 \times 10^{-4}$ M) y 13 mg/L ($2,500 \times 10^{-4}$ M) de Cr (VI) durante 72 hs. La densidad celular se determinó cada 24 hs mediante conteo celular. El experimento se realizó por triplicado.

3.2. Generación de la cepa resistente

Se generó una cepa resistente a Cr (VI) mediante la exposición controlada de *S. dimorphus* salvaje al metal durante 95 días. La dosis de Cr (VI) fue de 1,3 mg/L suministrado en forma de dicromato de potasio. Las cepas, control (sin cromo) y tratamiento (con cromo) se mantuvieron en agitación y con aireación como se muestra en la Figura 3.2. El monitoreo del experimento se realizó cada 7 días mediante conteo celular, momento en el cual ambas cepas eran subcultivadas a medio fresco y se le adicionaba nuevamente 1,3 mg/L de Cr (VI) al cultivo tratado. En la Figura 3.3 se puede observar el crecimiento durante todo el ensayo. Cuando el comportamiento del cultivo tratado equiparó al de la cepa control, es decir que alcanzó reiteradas veces una densidad celular similar, se decidió terminar el ensayo. También podemos ver de forma macroscópica cómo la coloración fue una referencia de dicho comportamiento, ya que puede ser un indicio de la densidad celular (Figura 3.4). Adicionalmente, el color también es representativo del estado fisiológico de las microalgas, ya que es un reflejo de la condición en la que se encuentran el cloroplasto y los pigmentos, y por lo tanto, del metabolismo de las células. En el panel A de la Figura 3.4 se observa una coloración equivalente dado que son imágenes del t_{inicial} (inóculo). Por otro lado, el panel B de la Figura 3.4 muestra que en la mitad del ensayo, a $t_{42 \text{ días}}$, el color fue muy diferente, siendo de un verde más intenso en la cepa control (que en este caso se corresponde con una mayor densidad celular) y de un verde más claro en la cepa tratada con Cr (VI) (que puede reflejar, al menos en parte, la menor densidad celular observada en la Figura 3.3). Por último, al final del ensayo, $t_{95 \text{ días}}$, se puede observar un color verde similar en ambas cepas (Figura 3.4 C), en concordancia con las densidades celulares similares de ambas cepas observadas en la Figura 3.3. A partir de ese momento, denominamos a la cepa control como **WT** (por sus siglas en inglés, *Wild Type*) y a la cepa generada como **CRS** (por sus siglas en inglés, *Chromium Resistant Strain*). Cabe destacar que, desde entonces, ambas cepas siempre se han mantenido en picos de flauta en condiciones similares y que solamente han sido expuestas al metal durante los ensayos.

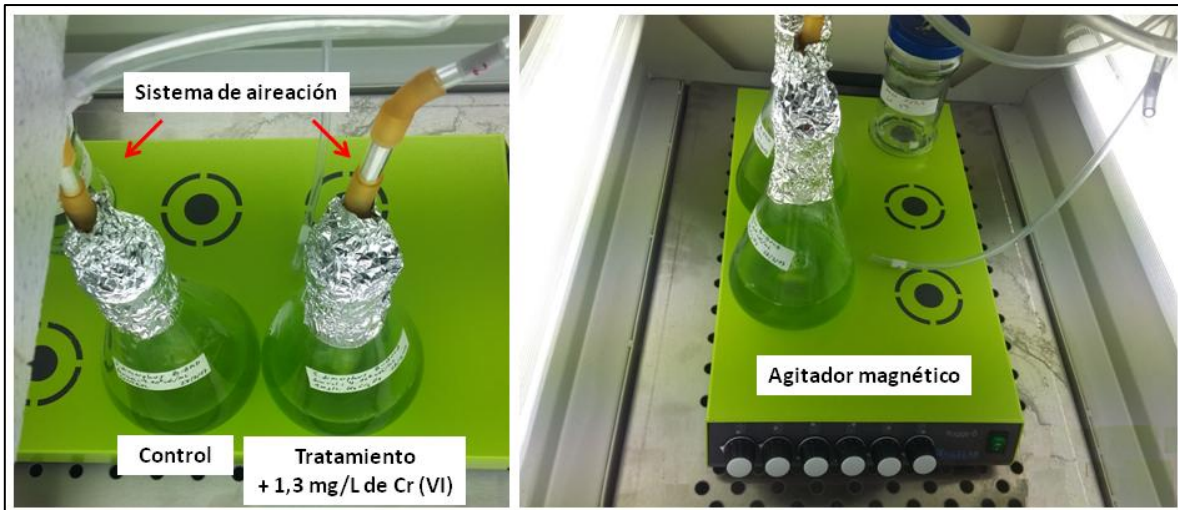


Figura 3.2. Imagen del ensayo de la generación de la cepa resistente. Se puede observar el sistema de aireación y el agitador magnético que se utilizaron.

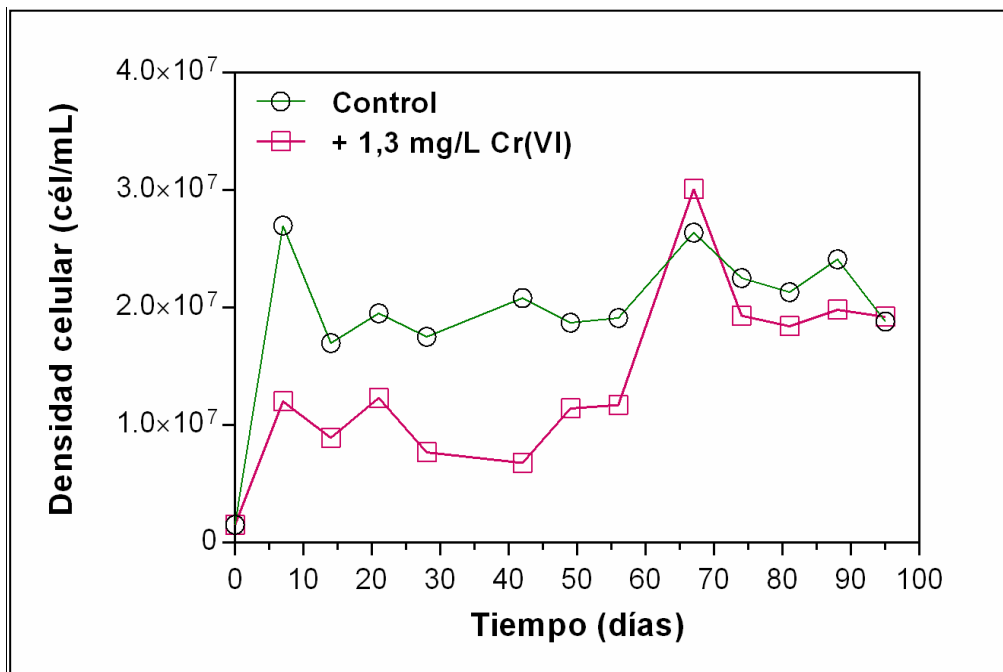


Figura 3.3. Generación de la cepa de *S. dimorphus* resistente a cromo (CRS). Crecimiento de las cepas control y tratada (1,3 mg/L de Cr (VI)) durante el ensayo. La densidad celular se determinó mediante conteo celular. Cada tratamiento consta de una sola réplica.

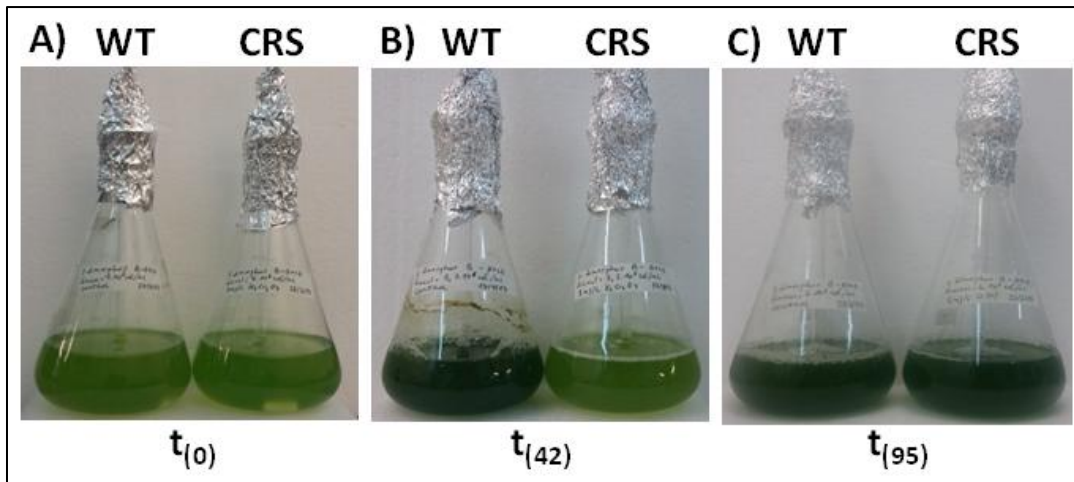


Figura 3.4. Generación de la cepa de *S. dimorphus* resistente a cromo (CRS): Apariencia y coloración de los cultivos. Imágenes al inicio ($t = \text{día } 0$), en el medio ($t = \text{día } 42$) y al final ($t = \text{día } 95$) del ensayo.

3.3 Determinación de la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación de la cepa resistente (CRS)

Una vez obtenida la cepa CRS, se procedió a caracterizarla en función de la tasa de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (T_2). Se realizaron curvas de crecimiento durante 37 y 52 días sin y con el agregado de Cr (VI), respectivamente. Cabe destacar que en este ensayo la dosis de 1,3 mg/L de Cr (VI) se adicionó por única vez al inicio de la curva. En la Figura 3.5 A se puede observar que, cuando no fueron expuestas a Cr (VI), ambas cepas presentaron una tasa de crecimiento similar, siendo de 0,6 y 0,7 para WT y CRS, respectivamente. Adicionalmente, ante la ausencia del metal, ambas tuvieron un tiempo de duplicación de 1 día. No obstante, cuando la cepa WT fue tratada con Cr (VI) su tasa de crecimiento disminuyó a la mitad, siendo de 0,32 y el tiempo de duplicación aumentó al doble (2 días) (Figura 3.5 B). Por el contrario, la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación de CRS no se vieron afectados ante la presencia del metal.

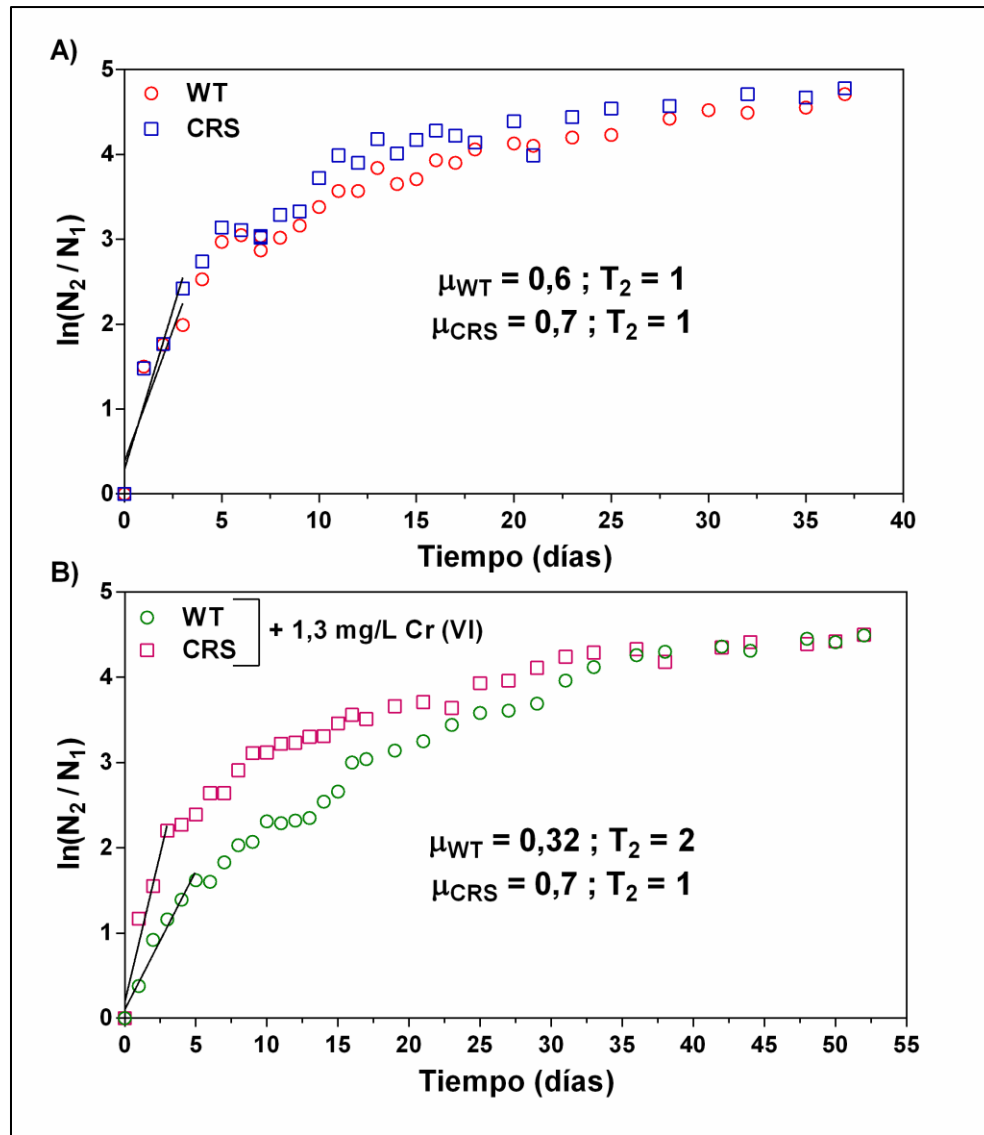


Figura 3.5. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (T_2) de las cepas WT y CRS. Curvas de crecimiento en ausencia de cromo (A) y expuestas a 1,3 mg/L de Cr (VI) (B) durante 37 y 52 días, respectivamente. El Cr (VI) se adicionó por única vez al inicio de la curva. La densidad celular se determinó cada 24 hs mediante conteo celular. $N_{(t)}$, densidad en el tiempo t. El experimento se realizó por triplicado.

3.4 Caracterización de la cepa resistente (CRS): Estudio de la resistencia al cromo y determinación de la tasa de mortalidad

Para evaluar la resistencia de la cepa CRS se expuso a las dos cepas, CRS y WT, a 0; 1,3; 1,95 y 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs y se determinó la densidad celular final. En

la Figura 3.6 se puede ver que en ausencia del metal ambas cepas llegaron a una densidad celular final similar. No obstante, cuando fueron tratadas con Cr (VI), independientemente de la dosis, la cepa CRS creció entre 3 y 3,5 veces más que la cepa WT, siendo este incremento estadísticamente significativo (ANOVA, $p < 0,05$). En base a estos resultados se decidió utilizar la concentración de 1,95 mg/L de Cr (VI) para los siguientes experimentos de caracterización. Esta dosis fue seleccionada para poder exacerbar las diferencias de los efectos del metal (respecto de la dosis de 1,3 mg/L) y a la vez poder evaluar efectos en la cepa WT. La dosis de 2,6 mg/L se descartó para casi todos los experimentos porque resultó ser demasiado tóxica para la cepa WT. Esto puede ser visualizado claramente en la Figura 3.7, donde se graficó la progresión del crecimiento de las dos cepas ante la exposición de ambas cepas a de 0 y 2,6 mg/L de Cr (VI). En dicha figura, queda en evidencia la toxicidad de la dosis de 2,6 mg/L de Cr (VI) para la cepa WT, cuyos valores promedio de densidad celular a los diferentes tiempos de conteo no presentaron diferencias significativas con respecto al valor de densidad celular inicial.

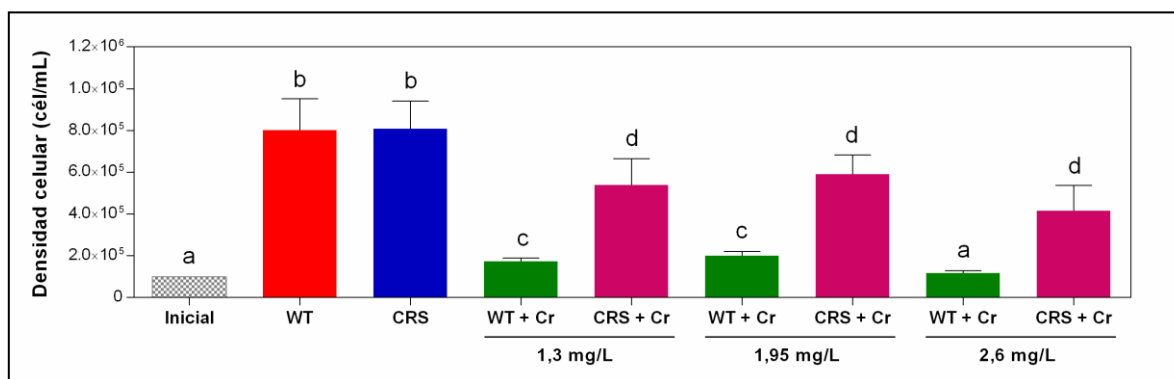


Figura 3.6. Densidad celular de las cepas WT y CRS al ser expuestas a 0 mg/L, 1,3 mg/L, 1,95 mg/L y 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. La densidad celular se determinó mediante conteo celular. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. Cada experimento representa el valor promedio de entre 3 y 22 réplicas: 22 réplicas para los controles WT y CRS; 3 réplicas, 22 réplicas y 6 réplicas para los tratamientos con 1,3; 1,95 y 2,6 mg/L de Cr (VI), respectivamente.

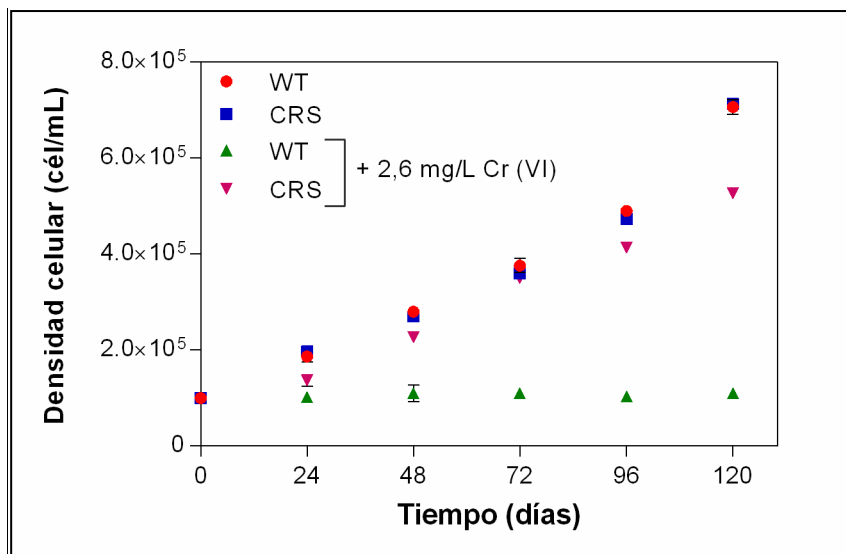


Figura 3.7. Crecimiento de las cepas WT y CRS al ser expuestas a 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. La densidad celular se determinó cada 24 hs mediante conteo celular. El experimento se realizó por sextuplicado.

Luego de los ensayos de toxicidad se procedió a evaluar la mortalidad en los cultivos ante la exposición al Cr (VI) realizando una tinción con safranina. Inicialmente, para probar la eficacia de la técnica y definir la dilución del colorante para realizar las tinciones, se hicieron experimentos utilizando un control positivo. Para ello se trató un cultivo con calor (100 °C durante 10 min) para provocar la muerte de las células, posteriormente se las tiñó con safranina y se las observó al microscopio (Figura 3.8). La Figura 3.9 muestra los resultados de las tinciones con safranina. En ella se puede observar que, ante la ausencia del metal, las células de WT y CRS no se tiñeron con safranina, es decir que no se detectaron células muertas (rojas). Sin embargo, cuando la cepa WT fue tratada con 1,3 mg/L (Figura 3.10) y 2,6 mg/L (Figura 3.11) de Cr (VI), presentó células muertas. Por el contrario, cuando la cepa CRS fue expuesta al metal (Figuras 3.10 y 3.11) no se observaron células muertas.

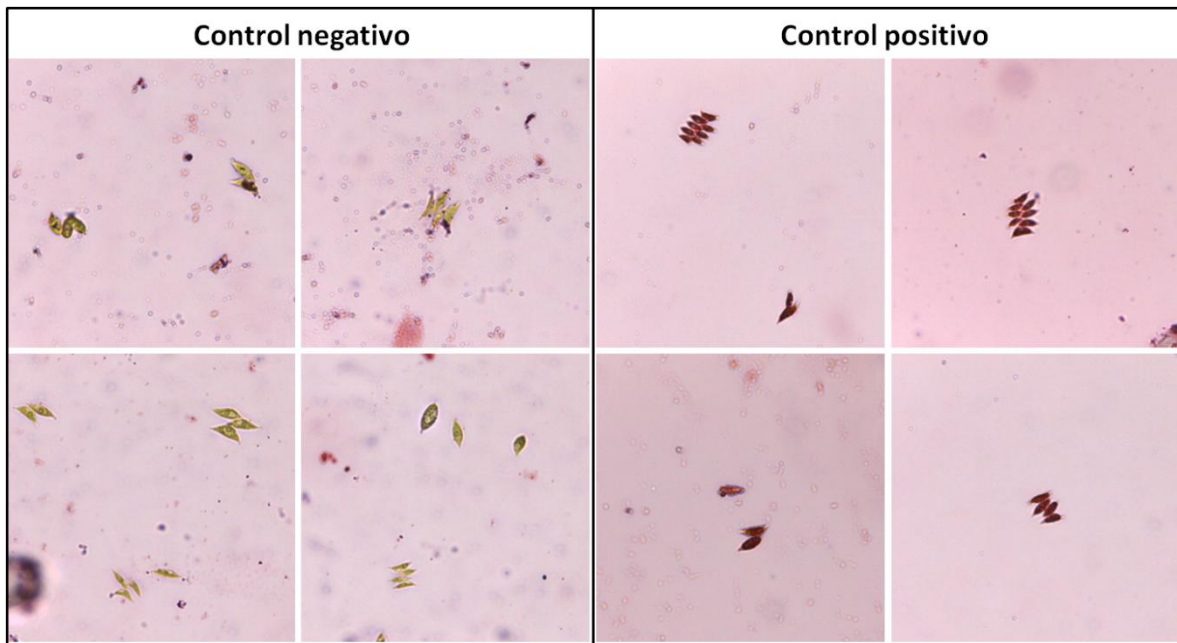


Figura 3.8. Puesta a punto de la tinción con safranina 0,25% p/V para detectar la presencia de células muertas. Se utilizó como control positivo un cultivo de la cepa WT, el cual se calentó a 100 °C durante 10 min. El control negativo fueron muestras del mismo cultivo teñido con safranina, pero sin el tratamiento con temperatura. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 400x.

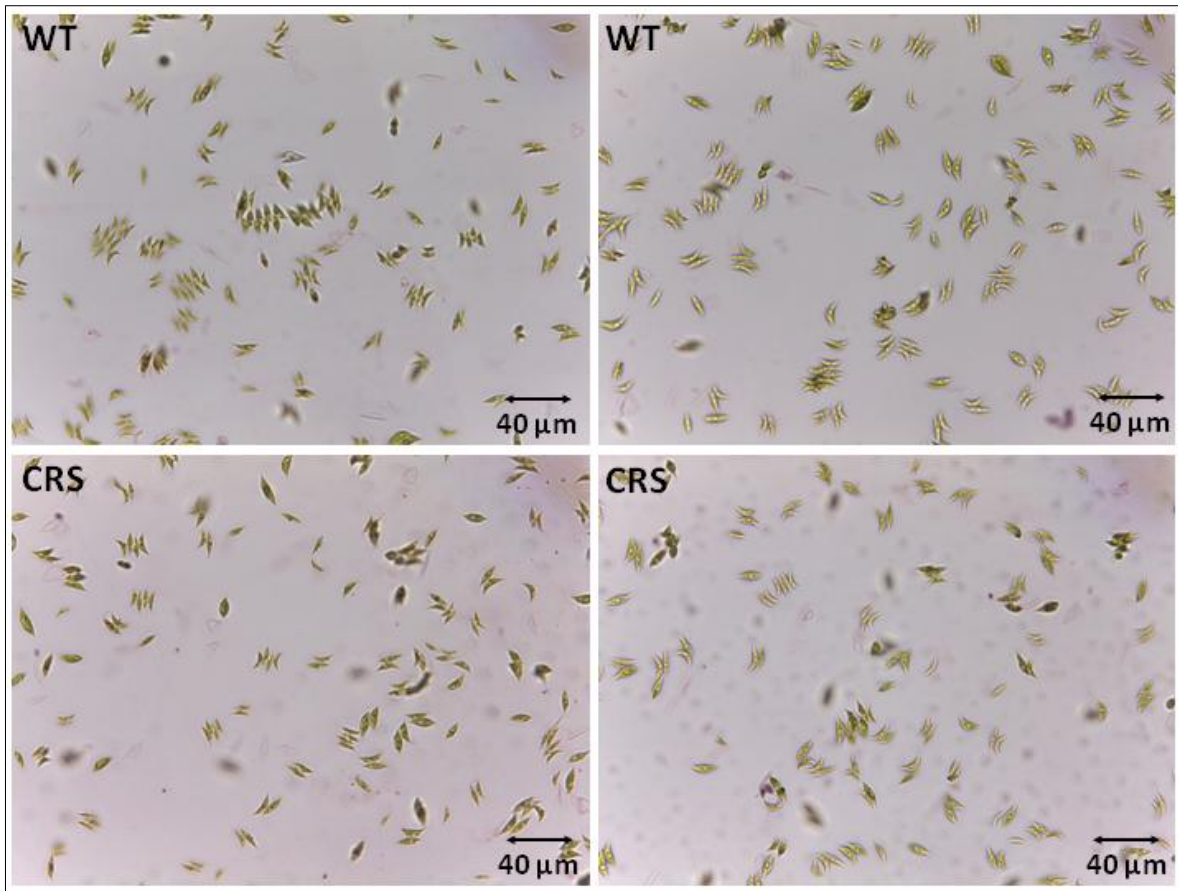


Figura 3.9. Viabilidad de las células en ausencia de cromo. Imágenes de las cepas WT y CRS crecidas en ausencia de Cr (VI) y teñidas con safranina (0,25 % p/V) una vez finalizado el ensayo a las 120 hs. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 400x. Barras de escala = 40 µm. Los dos paneles superiores se corresponden a la cepa WT y los dos paneles inferiores pertenecen a la cepa CRS.

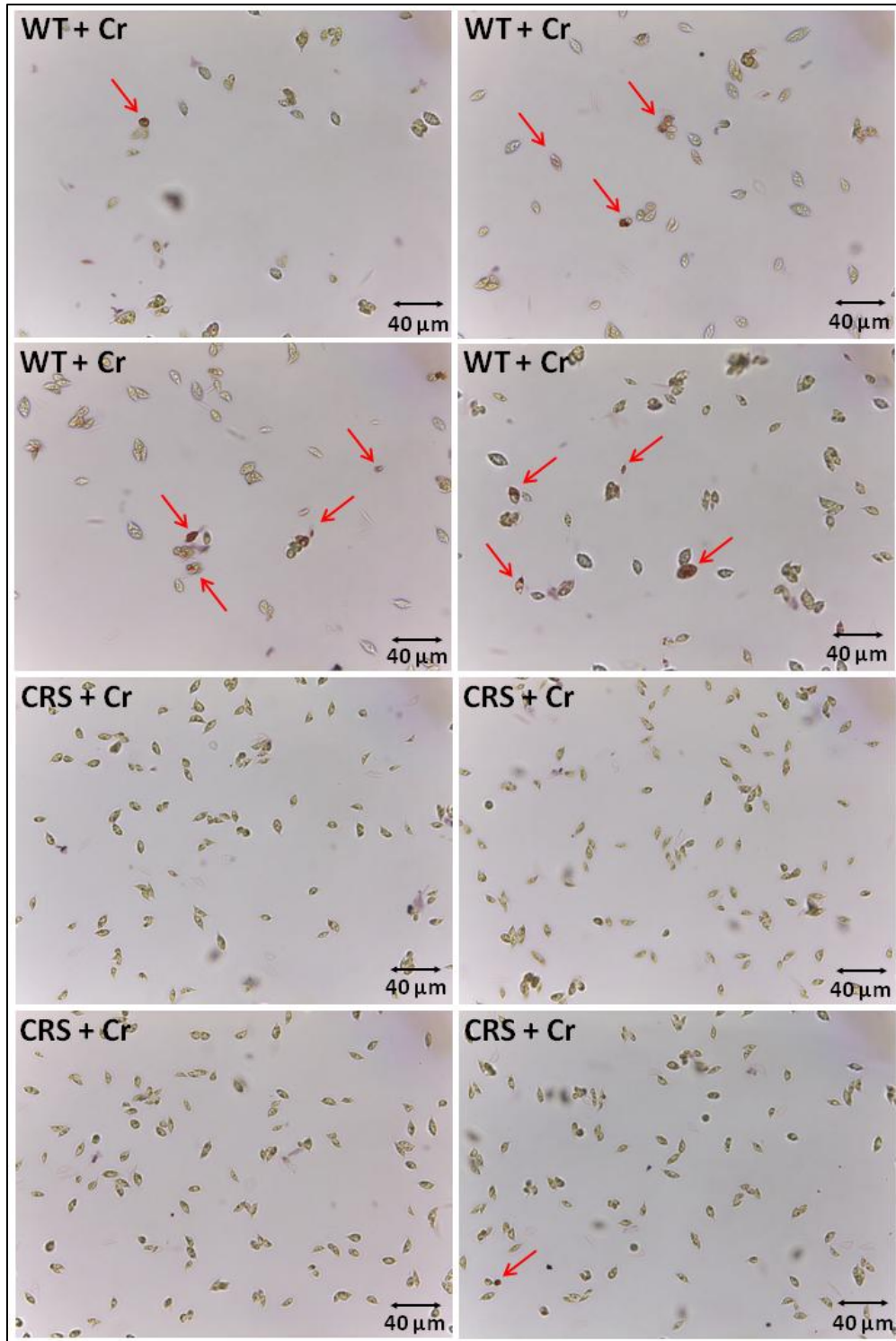


Figura 3.10. Efecto del cromo en la viabilidad de las células. Imágenes de las cepas WT y CRS teñidas con safranina (0,25 % p/V) expuestas a 1,3 mg/L Cr (VI) durante 120 hs. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 400x. Los dos paneles superiores se corresponden a la cepa WT + Cr y los dos paneles inferiores pertenecen a la cepa CRS + Cr. Las flechas indican las células muertas. Barras de escala = 40 μm.

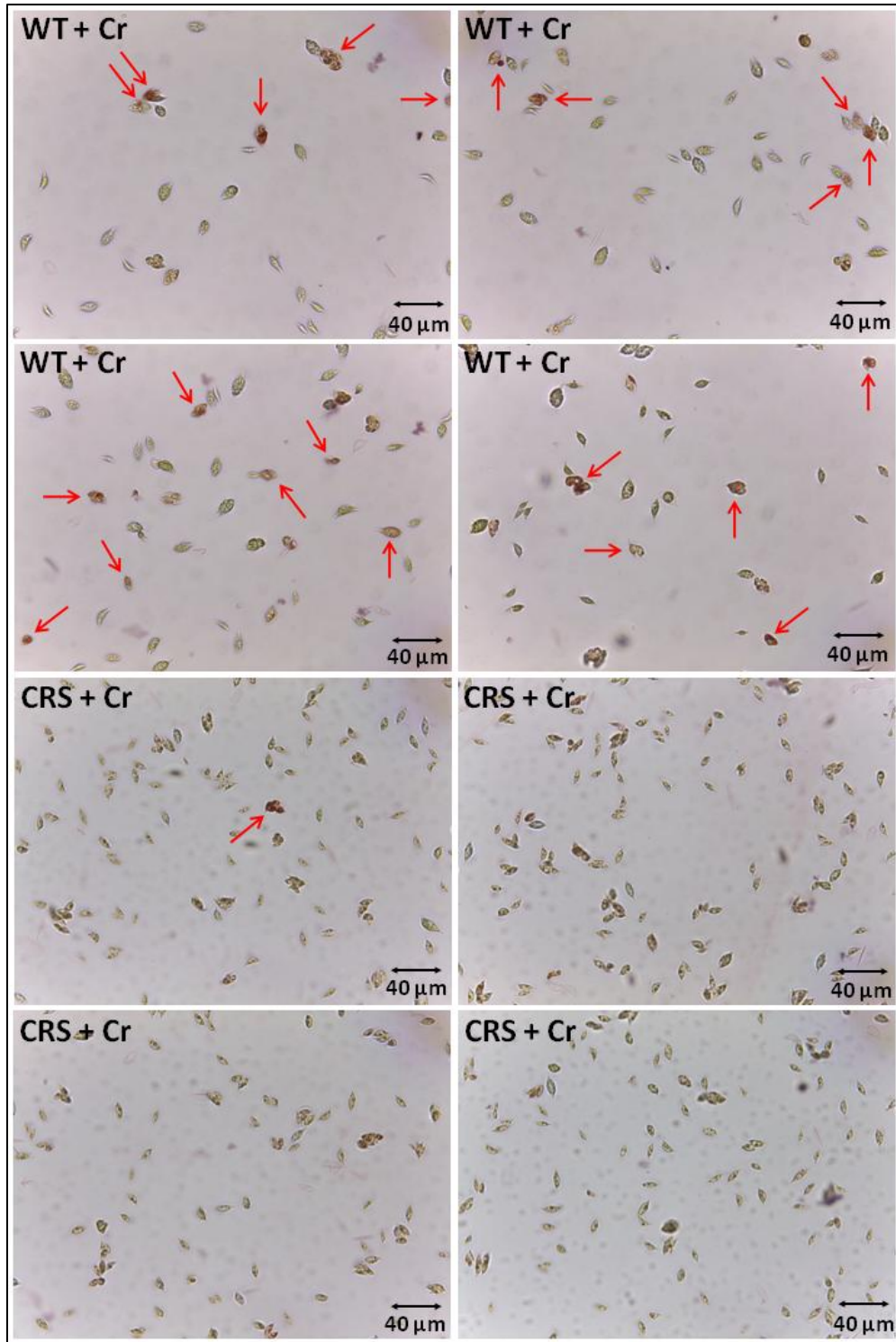


Figura 3.11. Efecto del cromo en la viabilidad de las células. Imágenes de las cepas WT y CRS teñidas con safranina (0,25 % p/V) expuestas a 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 400x. Los dos paneles superiores corresponden a la cepa WT + Cr y los dos paneles inferiores pertenecen a la cepa CRS + Cr. Las flechas indican las células muertas. Barras de escala = 40 μm.

La cuantificación de las tasas de mortalidad nos permitió confirmar que el efecto de Cr (VI) sobre la mortalidad de la cepa CRS fue prácticamente nulo. Contrariamente, cuando la cepa WT fue tratada con 1,3 mg/L y 2,6 mg/L de Cr (VI) las tasas de mortalidad resultaron ser 5,68% y 13,51%, respectivamente (Tabla 3.3). Nuevamente, ante la ausencia del metal no se detectaron células muertas en ninguna de las dos cepas. Estos resultados sugieren que, si bien el mayor efecto del Cr (VI) en la cepa WT es sobre la proliferación celular, también aumenta moderadamente la tasa de mortalidad. Además, la resistencia a Cr (VI) de la cepa CRS mantiene las tasas de división celular y de mortalidad en valores equivalentes al control sin metal.

Tabla 3.3. Tasa de mortalidad luego de la exposición al cromo. Las cepas WT y CRS fueron tratadas con 0 mg/L; 1,3 mg/L y 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. La tasa de mortalidad se determinó mediante la tinción con safranina 0,25 % p/V y el conteo de las células totales y las células muertas en cámara de Neubauer. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con una comparación múltiple de Sidak. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado. ND: no detectable. SD: desviación estándar.

	WT		CRS	
	Promedio (%)	SD	Promedio (%)	SD
Sin Cr (VI)	ND ^a	-	ND ^a	-
1,3 mg/L Cr (VI)	5,68 ^b	3,59	0,50 ^a	0,44
2,6 mg/L Cr (VI)	13,51 ^c	1,73	ND ^a	-

3.5 Efecto del Cr (VI) en la morfología de las cepas *wild type* (WT) y resistente (CRS)

3.5.1 Microscopia óptica

Las cepas WT y CRS fueron observadas al microscopio óptico en busca de cambios en la morfología celular luego de ser tratadas con 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. En los dos paneles superiores de la Figura 3.12 se evidencia que la morfología de la cepa CRS es idéntica a la de la cepa WT cuando no fueron expuestas al metal. Ambas cepas presentaron la forma fusiforme típica de la especie y se pudo apreciar la presencia de cenobios de 2 y 4 células. No obstante, el 3er panel de la Figura 3.12 muestra que, luego

del tratamiento con Cr (VI), en la cepa WT se produjeron cambios drásticos en su morfología. Las células perdieron la forma típica de la especie, aumentaron de tamaño y se redondearon, los cenobios desaparecieron, hubo una pérdida de la coloración característica y hubo muchas células despigmentadas. Asimismo, se observó la aparición de vacuolas cloroplásticas y grandes vacuolas citoplásmicas que podría deberse a un proceso de autofagia. Estos mismos detalles se pueden observar en los dos paneles superiores de la Figura 3.13, donde además hay numerosos signos de división celular, como por ejemplo la presencia de “colonias hijas” y “células fantasmas”¹. Por el contrario, cuando la cepa CRS fue expuesta al metal durante 120 hs presentó una morfología similar a la forma típica de la especie (Figura 3.12 cuarto panel). A pesar de que hubo cambios en la morfología y de que la coloración característica se modificó, estas alteraciones fueron más leves que las producidas en la cepa WT. Sin embargo, en la cepa CRS se pudieron apreciar numerosas “células fantasmas”, pero no “colonias hijas” (Figura 3.13, dos paneles inferiores). Estos resultados sugieren que la presencia de Cr (VI) provoca síntomas típicos de estrés en la cepa WT y que, como parte de la resistencia, estos síntomas de estrés se encuentran disminuidos en la cepa CRS.

¹ Cabe recordar que las especies pertenecientes al género *Scenedesmus* se reproducen de forma asexual mediante la formación de autoesporas. Por lo tanto, el término “colonias hijas” se refiere a células que se encuentran en algún estadio del proceso de división celular. De la misma forma, “células fantasmas” son restos incoloros de pared celular, sin contenido celular que quedaron luego de que una célula se dividió.

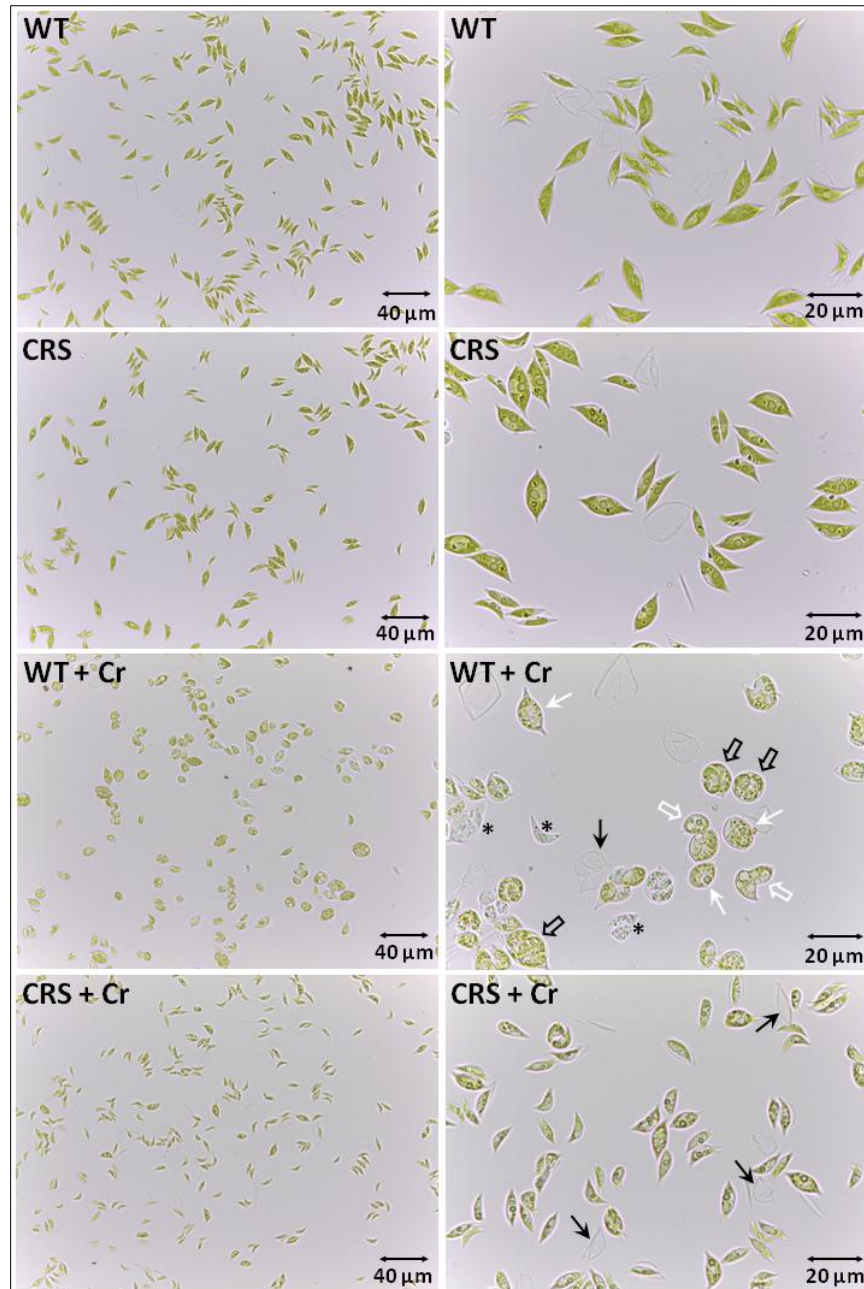


Figura 3.12. Efecto del cromo en la morfología de las células. Imágenes de las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI). Las imágenes fueron tomadas a 400 x y 1000 x de magnificación. Las células en ausencia del metal se encuentran en el primer y segundo panel y las tratadas con 1,95 mg/L de Cr (VI) se hallan en el tercer y cuarto panel. Las imágenes tomadas con una magnificación de 400x y 1000x se encuentran en los paneles izquierdos y derechos, respectivamente. Se señalan células representativas de distintos síntomas de estrés, aunque muchas células presentaban más de un síntoma. Flechas negras: “células fantasmas”, flechas blancas: células redondeadas y de gran tamaño, flechas negras abiertas: “colonias hijas”, flechas blancas abiertas: células con vacuolas autofágicas, asteriscos: células despigmentadas. Barras de escala = 40 μm y 20 μm . Aclaración: muchas células presentaban más de un síntoma, pero se señaló sólo uno a la vez.

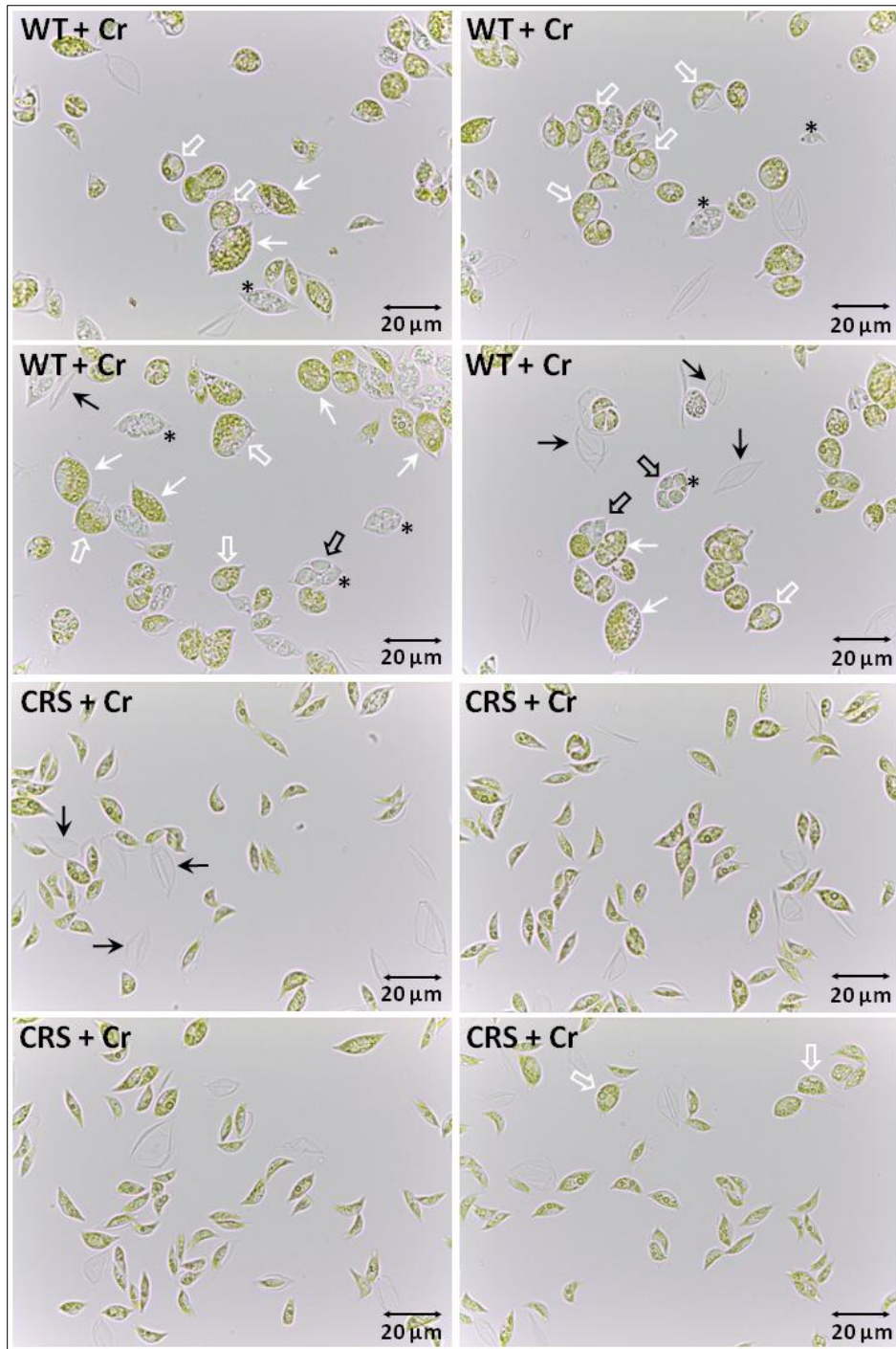


Figura 3.13. Efecto del cromo en la morfología de las células. Imágenes de las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 1,95 mg/L de Cr (VI). Las imágenes fueron tomadas a 1000 x de magnificación. Se señalan células representativas de distintos síntomas de estrés, aunque muchas células presentaban más de un síntoma. Flechas negras: “células fantasmas”, flechas blancas: células redondeadas y de gran tamaño, flechas negras abiertas: “colonias hijas”, flechas blancas abiertas: células con vacuolas autofágicas, asteriscos: células despigmentadas. Barras de escala = 20 μm. Aclaración: muchas células presentaban más de un síntoma, pero sólo se señaló uno a la vez.

3.5.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las cepas WT y CRS se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con el fin de detectar cambios que no se pudiesen visualizar mediante microscopía óptica. En las imágenes tomadas en SEM, se evidenció lo previamente observado por microscopía óptica. La Figura 3.14 muestra que, ante la ausencia del metal, WT y CRS fueron indistinguibles en lo que respecta a sus morfologías. Asimismo, cuando ambas cepas fueron expuestas a 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 horas, en la cepa WT se pudo apreciar un aumento del tamaño y un redondeo de las células, perdiendo así la forma típica de la especie (Figura 3.15, paneles de la izquierda). En el caso de la cepa CRS, cuando fue tratada con el metal, su tamaño y su forma no se modificó tan drásticamente, siendo las células más parecidas a la cepa control (Figura 3.15, paneles de la derecha).

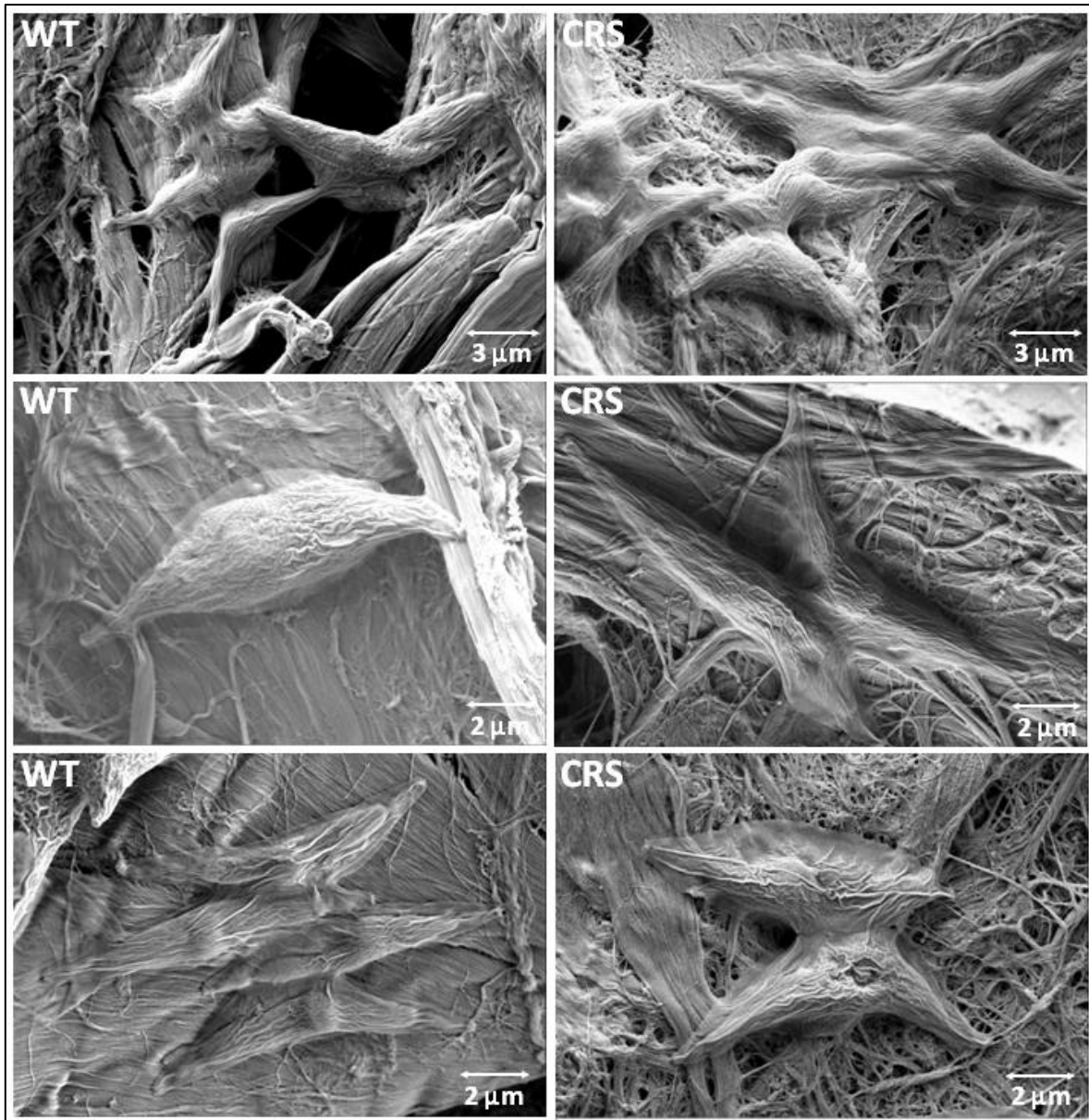


Figura 3.14. Morfología de las cepas WT y CRS en ausencia del metal. Imágenes obtenidas en SEM de las cepas WT y CRS luego de 120 hs de cultivo en las condiciones experimentales típicas, pero sin ser expuestas a Cr (VI). Las imágenes tomadas con una magnificación de 5000x y 7500x se encuentran en los paneles de la primera y en los paneles de la segunda y tercera fila, respectivamente. Barras de escala = 2 μm y 3 μm .

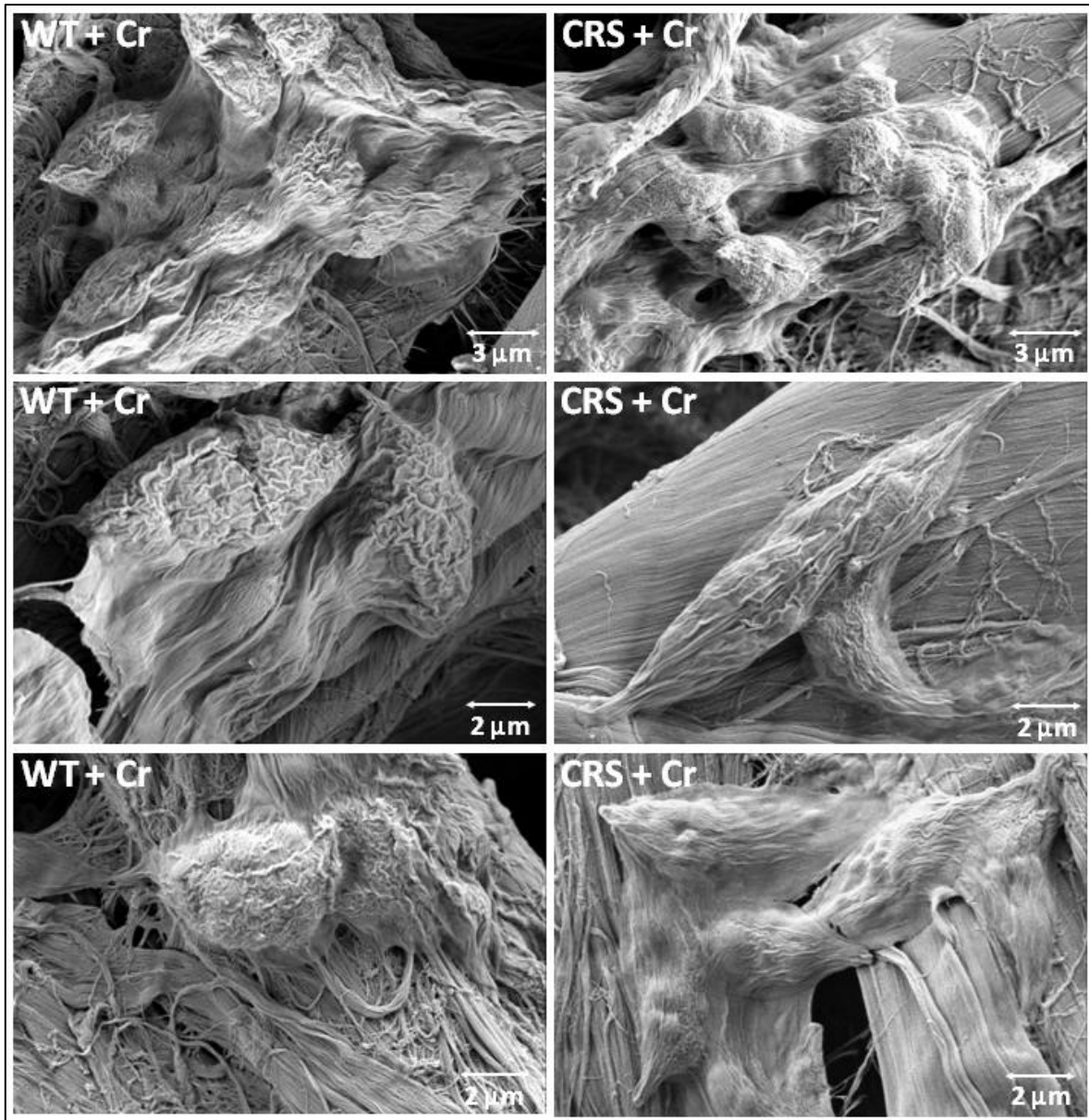


Figura 3.15. Morfología de las cepas WT y CRS en presencia del metal. Imágenes obtenidas en SEM de las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 1,95 mg/L de Cr (VI). Las imágenes tomadas con una magnificación de 5000x y 7500x se encuentran en los paneles de la primera fila y en los paneles de la segunda y tercera fila, respectivamente. Barras de escala = 2 μm y 3 μm .

3.6 Efectos del medio de cultivo en la reducción del Cr (VI)

Para evitar la reducción de Cr (VI) a Cr (III) debido principalmente a la presencia del Fe en el medio de cultivo, y de esta manera subestimar los efectos del Cr (VI), se decidió utilizar un medio BBM con una concentración de Fe reducida a $4,48 \times 10^{-6}$ M (BBM-Fe). Para demostrar la reducción de Cr (VI) por el Fe se utilizaron 4 medios de cultivo que presentaban diferentes concentraciones de Fe: BBM ($1,79 \times 10^{-5}$ M), BBM sin Fe (no contenía Fe), BBM-Fe ($4,48 \times 10^{-6}$ M) y Bristol (no contenía Fe), y se los expuso a 1,3 mg/L de Cr (VI) durante 96 hs. En la Figura 3.16 se observa la desaparición progresiva de Cr (VI) que fue reducido a Cr (III) en los 4 medios de cultivo. De esta manera se evidenció que, ante la ausencia de Fe (BBM sin Fe y Medio Bristol), la reducción de Cr (VI) fue inexistente durante todo el ensayo, mientras que en el medio BBM y BBM-Fe la reducción a las 96 hs fue de aproximadamente de un 50 % y un 11%, respectivamente.

El crecimiento de ambas cepas de *S. dimorphus* (WT y CRS) en medios de cultivo sin Fe fue muy lento (resultados no mostrados), lo cual era esperable ya que dicho metal es un micronutriente esencial para el crecimiento de las microalgas. Por otra parte, la reducción de Fe en el medio BBM-Fe produjo una disminución significativa en el crecimiento que resultó similar en ambas cepas, WT y CRS (Figura 3.17). En base a estos resultados, para los subsecuentes experimentos de toxicidad, se decidió utilizar BBM-Fe, sacrificando crecimiento en pos de poder apreciar los efectos del Cr (VI) producidos por la concentración deseada.

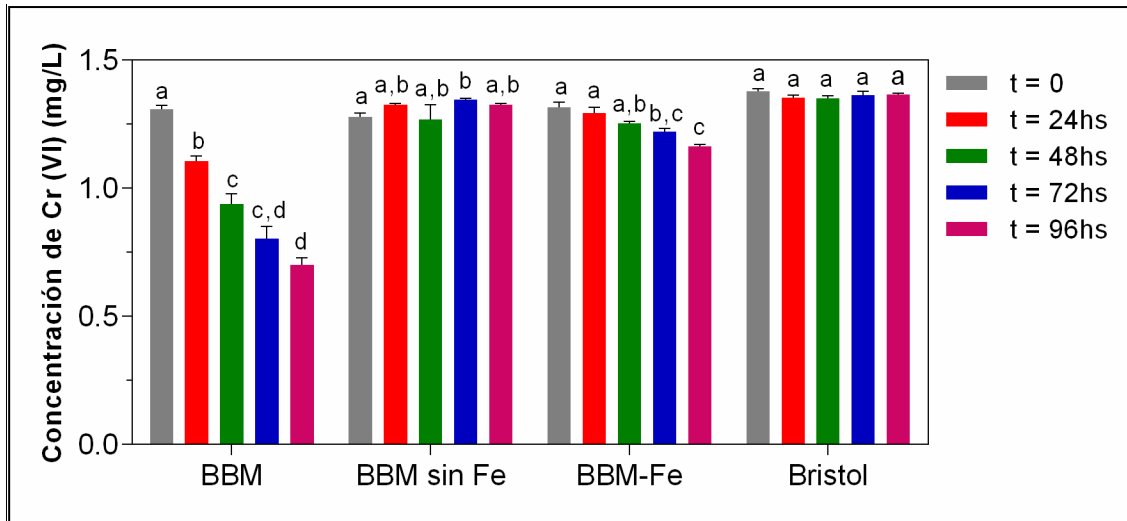


Figura 3.16. Efecto del Fe presente en el medio de cultivo en la reducción del Cr (VI) a Cr (III). Los 4 medios de cultivo BBM, BBM sin Fe, BBM-Fe y Bristol fueron expuestos a 1,3 mg/L de Cr (VI) durante 96 hs. La concentración de Cr (VI) se determinó cada 24 hs mediante el método de la difenilcarbazida (DPC). El análisis estadístico se realizó para cada tratamiento mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado.

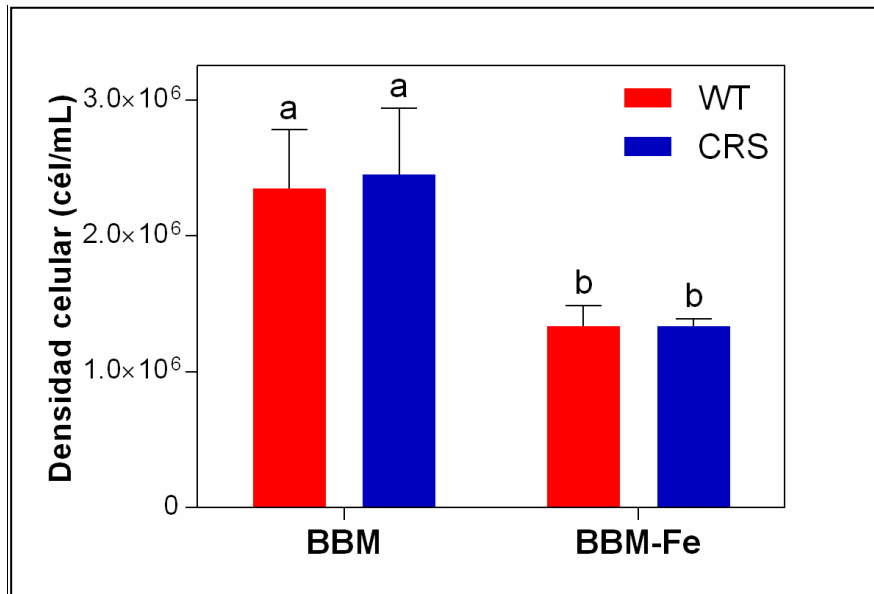


Figura 3.17. Efecto del Fe presente en el crecimiento de las cepas WT y CRS. Densidad celular de las cepas WT y CRS en BBM y BBM-Fe, luego de ser expuestas a 0 mg/L, 1,3 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. La densidad celular se determinó mediante conteo celular. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con una comparación múltiple de Sidak. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado.

3.7 Efecto del cromo en la inducción de estrés oxidativo: especies reactivas del oxígeno (ROS)

Uno de los efectos reportados del cromo en las microalgas es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, según sus siglas en inglés). Para estudiar la producción de ROS, se utilizó el marcador fluorescente DCFH-DA luego de que las cepas WT y CRS fueran expuestas a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 horas. La generación de ROS se determinó de forma cuali y cuantitativa mediante microscopía de fluorescencia y espectrofluorimetría, respectivamente. En la Figura 3.18 se puede ver una imagen del experimento al comienzo, tiempo $t = 0$ hs.



Figura 3.18. Imagen de la disposición de los viales en la incubadora durante el experimento. Esta foto es representativa de todos los ensayos realizados bajo condiciones experimentales similares: densidad celular inicial de 1×10^5 células/mL; pH 6,8; fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 hs de oscuridad; irradiancia de $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$; volumen de 30 ó 40 mL; 3 réplicas por tratamiento.

En lo que respecta a la microscopía de fluorescencia, si bien es un método cualitativo, el brillo es un indicativo de la intensidad en la fluorescencia, es decir de la producción de ROS, a mayor brillo mayor presencia de ROS. Asimismo, cabe destacar que todas las fotos fueron tomadas con los mismos parámetros, los cuales se establecieron sobre la imagen que presentaba menos fluorescencia. La Figura 3.19 muestra que, ante la

ausencia del metal, la cepa WT tuvo una producción basal levemente menor que la cepa CRS, lo que se vio reflejado en que las células WT tenían menos brillo. Sin embargo, cuando ambas cepas fueron expuestas al Cr (VI), se pudo apreciar que la intensidad en la fluorescencia de la cepa WT + Cr fue mayor que la observada en la cepa CRS, es decir que la producción de ROS fue superior en la cepa WT + Cr (Figura 3.20, dos paneles superiores). Además, se evidenció que la cepa WT + Cr presentó un número mayor de células con una alta fluorescencia en comparación con la cepa CRS + Cr. Contrariamente, la cepa CRS + Cr no se diferenció de su respectivo control, dado que no mostró un incremento en la intensidad de la fluorescencia (Figura 3.20, dos paneles inferiores).

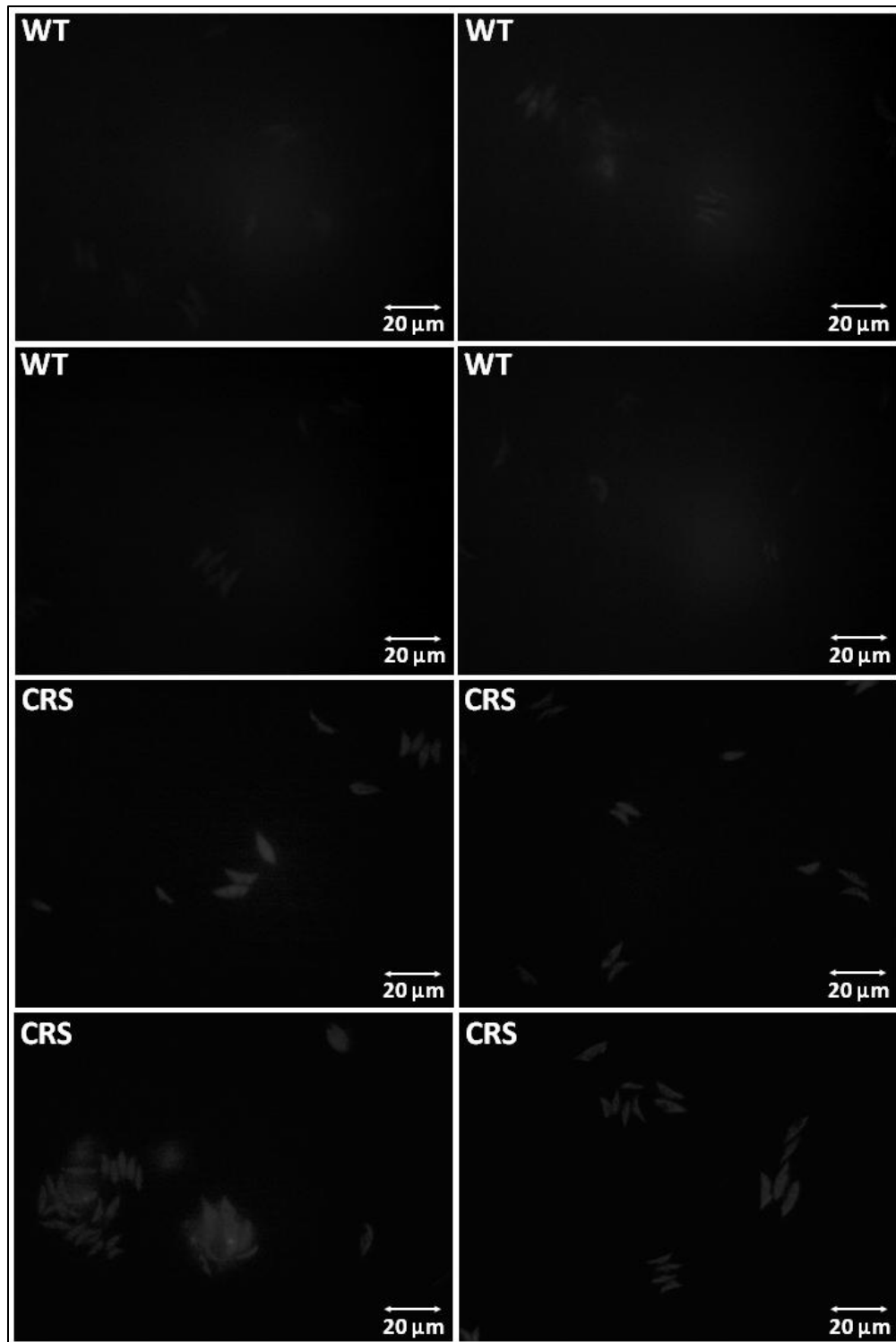


Figura 3.19. Efecto del cromo en la generación de ROS. Imágenes de las cepas WT y CRS en ausencia del cromo luego de finalizado el ensayo a las 120 hs. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia con una magnificación de 1000x. Los parámetros para la obtención de las fotos fueron establecidos sobre la imagen que presentaba menos fluorescencia. Barras de escala = 20 μm .

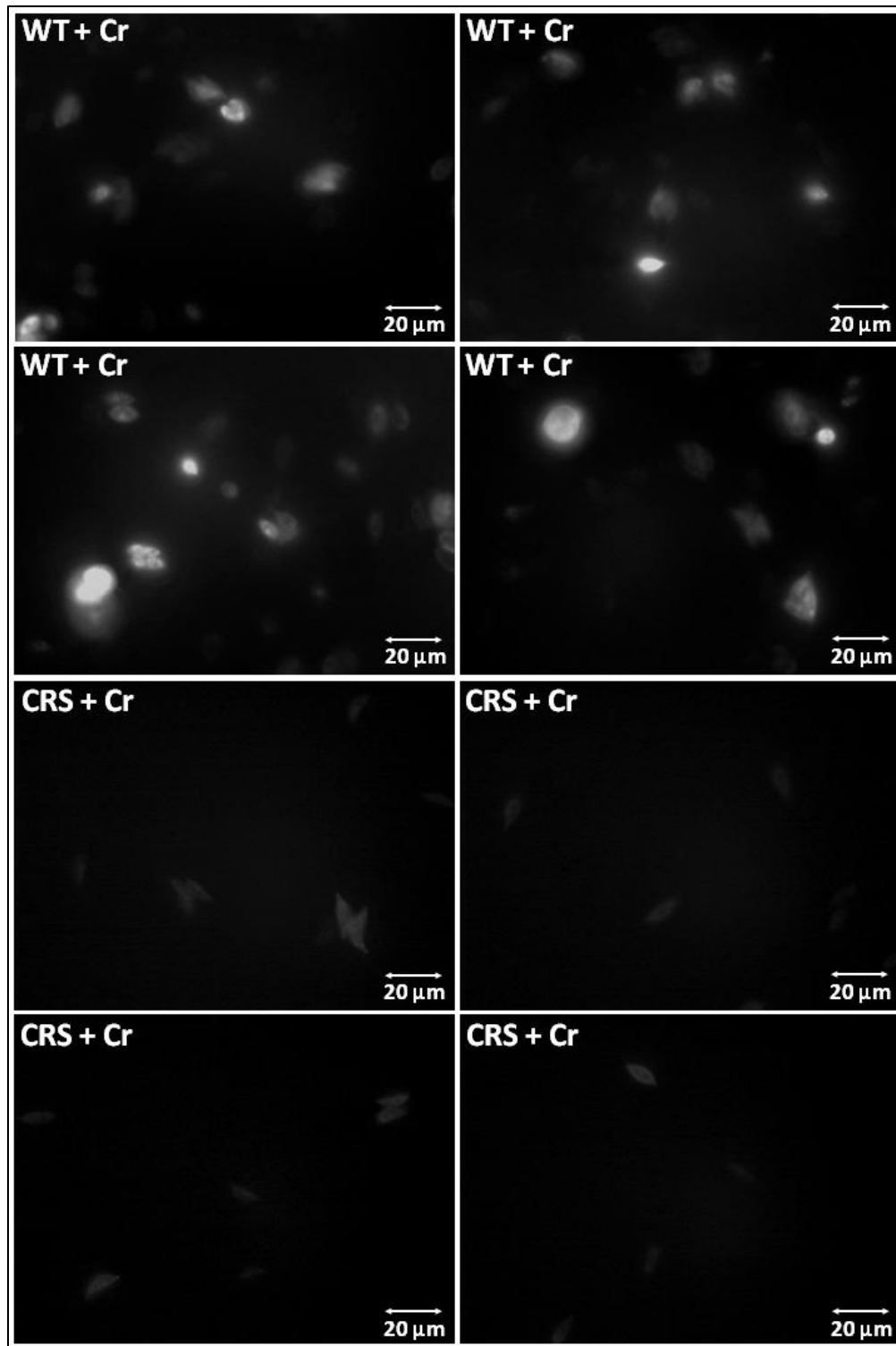


Figura 3.20. Efecto del cromo en la generación de ROS. Imágenes de las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 1,95 mg/L de Cr (VI). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia con una magnificación de 1000x. Los parámetros para la obtención de las fotos fueron establecidos sobre la imagen que presentaba menos fluorescencia. Barras de escala = 20 μm.

A continuación, se realizó un análisis cuantitativo de la fluorescencia mediante espectrofluorimetría. La Figura 3.21 muestra un comportamiento similar al observado en las imágenes de microscopía. Nuevamente, la cepa WT + Cr presentó una mayor concentración de ROS que el resto de los tratamientos, siendo este incremento estadísticamente significativo (ANOVA, $p < 0,05$). Este aumento representa aproximadamente un 27% más de ROS que lo producido por la cepa CRS + Cr. Además, la cepa CRS + Cr mostró una acumulación de ROS similar a la de su respectivo control (ausencia del metal), en concordancia con lo observado en la microscopía de fluorescencia.

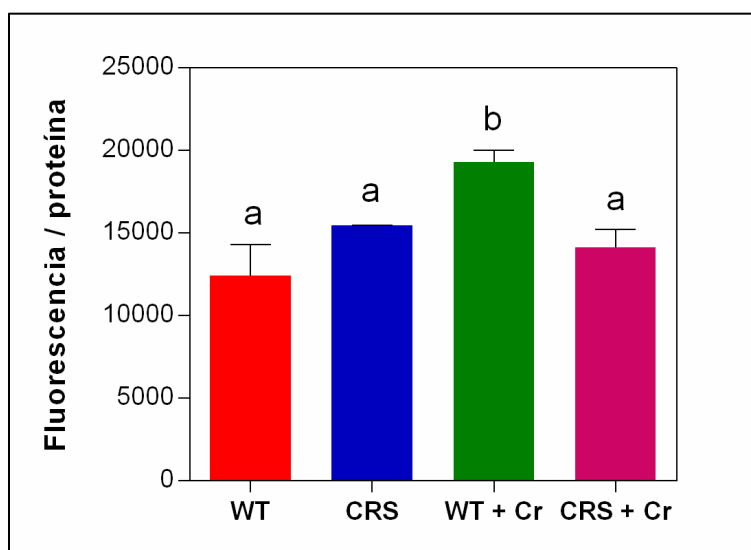


Figura 3.21. Efecto del cromo en la generación de ROS en las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI). El gráfico de barras representa la producción de ROS expresada en unidades relativas de fluorescencia y normalizado por el contenido de proteína de cada muestra. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado.

Para poder visualizar más fácilmente las diferencias en la producción de ROS entre las cepas CRS y WT, las intensidades de fluorescencia de las cepas expuestas al metal fueron normalizadas a sus respectivos controles. En la Figura 3.22 se puede ver que la cepa WT + Cr presentó aproximadamente un 50% más de ROS que su respectivo control,

mientras que la cepa CRS + Cr mostró una producción de ROS similar al de la cepa CRS sin cromo. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo producido por Cr (VI) es menor en la cepa CRS, como parte de la resistencia a dicho metal adquirida por esta cepa durante el período de adaptación.

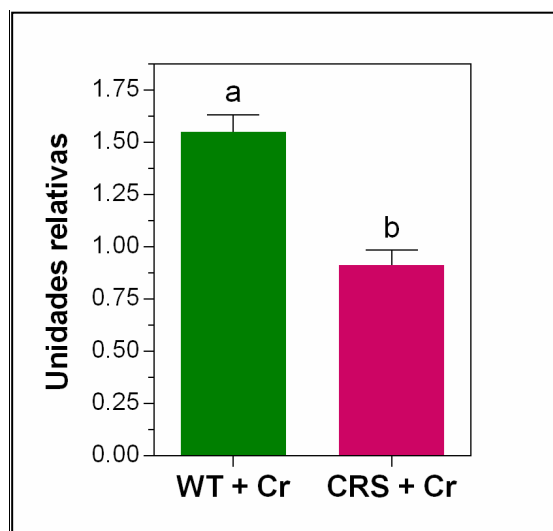


Figura 3.22. Efecto del cromo en la generación de ROS en las cepas WT y CRS. El gráfico de barras se desprende de la Figura 3.21 y representa el pico máximo de fluorescencia de las cepas WT y CRS tratadas con cromo y normalizados a sus respectivos controles, {WT + Cr (VI) / WT} y {CRS + Cr (VI) / CRS}. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student para muestras desapareadas. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado.

3.8 Efecto del cromo en la actividad enzimática de la catalasa

Se ha reportado que el Cr (VI) puede ocasionar un aumento en la actividad antioxidante de las células algales y que dicha respuesta antioxidante puede ser enzimática, mediada por enzimas como la catalasa, entre otras (Kováčik et al., 2015; Rai et al., 2013). Por esta razón, se estudió el efecto del Cr (VI) en la actividad enzimática de la catalasa luego de un tratamiento de 120 horas con 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI). En la Figura 3.23 se puede observar que no hubo diferencias en la actividad enzimática entre las dos cepas y los distintos tratamientos (ANOVA, $p > 0,05$). Estos resultados sugieren que las

diferencias observadas en la acumulación de ROS entre las cepas WT y CRS no se deben a cambios en la actividad catalasa. Cabe destacar que el contenido de proteína que se utilizó para normalizar los datos fue similar en todos los tratamientos (datos no mostrados).

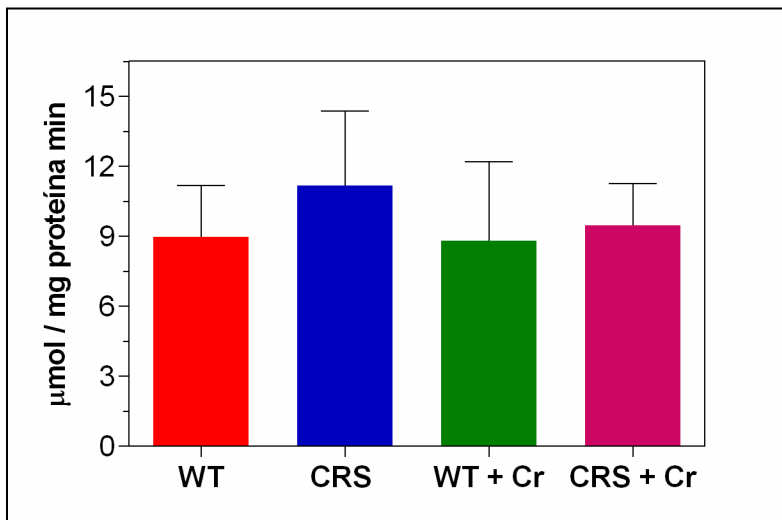


Figura 3.23. Efecto del cromo en la actividad enzimática de la catalasa en las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI). Los datos están normalizados por el contenido de proteínas de cada muestra. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey usando un valor $p < 0,05$. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El experimento se realizó por triplicado.

3.9 Efecto del cromo en la acumulación de lípidos

Distintos tipos de estrés inducen la acumulación de material de reserva en algas, siendo los lípidos neutros, principalmente triglicéridos, una de las principales macromoléculas que presenta un incremento. Por lo tanto, se estudió el efecto del cromo en la acumulación de lípidos luego de exponer a las cepas WT y CRS a 0; 1,95 y 2,6 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. La cuantificación se realizó mediante la técnica de la SPV para lo cual se efectuó, inicialmente, una curva de calibración usando aceite de maíz como estándar (Figuras 3.24 y 3.25).

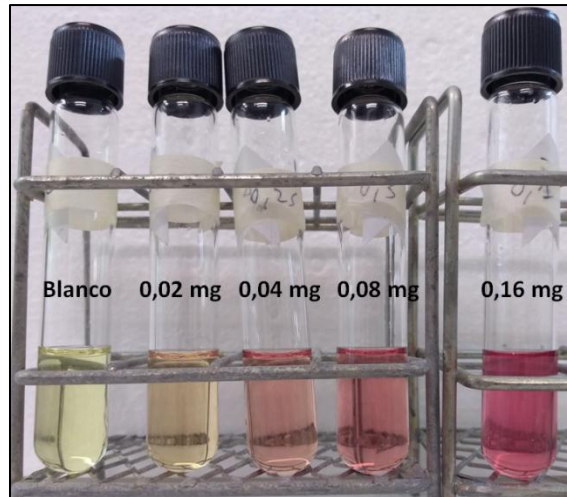


Figura 3.24. Imagen de la curva de calibración utilizada para la determinación de lípidos totales mediante la técnica de la sulfo-fosfo-vanillina (SPV).

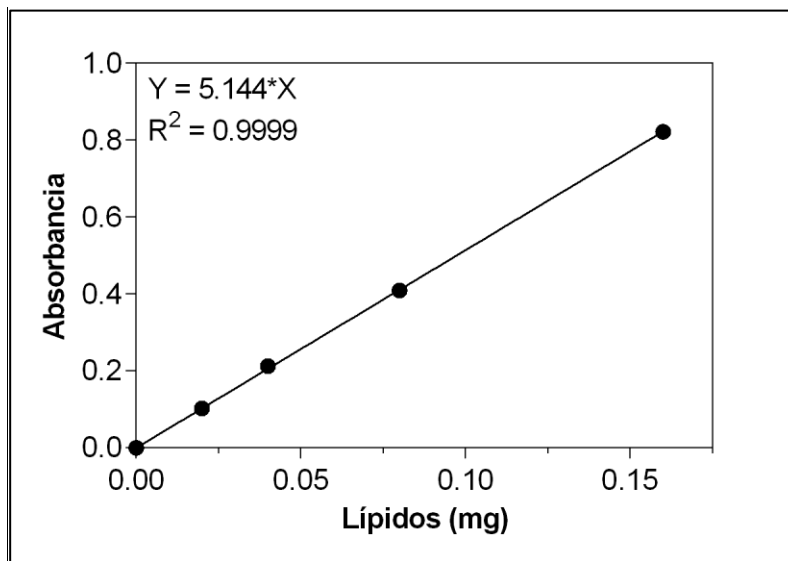


Figura 3.25. Curva de calibración para la determinación de lípidos totales mediante la técnica de la sulfo-fosfo-vanillina (SPV).

La Figura 3.26 muestra que las cepas WT y CRS presentaron niveles basales de lípidos similares cuando no fueron expuestas al cromo. Sin embargo, cuando las cepas fueron tratadas con las 2 concentraciones de Cr (VI) (1,95 y 2,6 mg/L), en la cepa WT se produjo un incremento en la acumulación de lípidos de hasta dos veces superior al de la cepa CRS, siendo este aumento estadísticamente significativo (ANOVA, $p < 0,05$). Por el contrario, nuevamente la cepa CRS parece no presentar signos de estrés (según esta

técnica de medición) cuando es tratada con Cr (VI), ya que mantuvo niveles de lípidos parecidos a los de su respectivo control. Si bien en algas el aumento de lípidos, principalmente triglicéridos, es sólo uno de los síntomas de estrés, estos resultados junto con la determinación de ROS sugieren que, en las condiciones experimentales evaluadas, la cepa CRS es afectada en menor medida que la cepa WT.

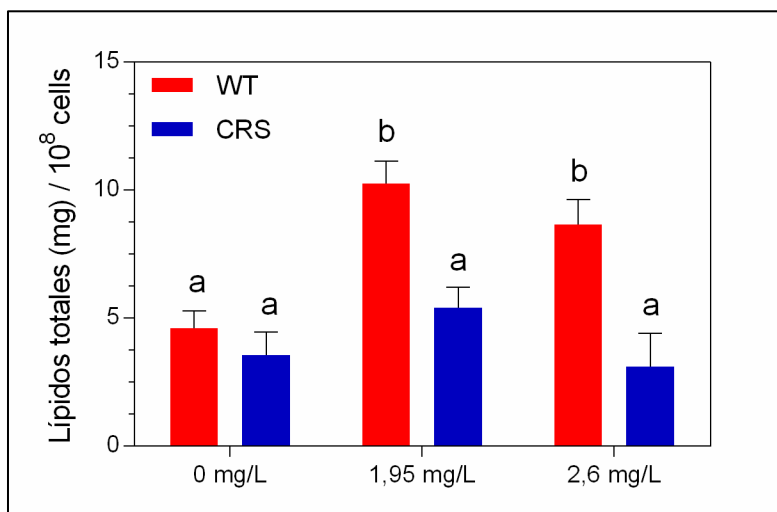


Figura 3.26. Efecto del cromo en la síntesis de lípidos totales en las cepas WT y CRS luego de 120 hs de exposición a 0, 1,95 y 2,6 mg/L de Cr (VI). Los datos están normalizados por el contenido de proteínas de cada muestra. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con una comparación múltiple de Sidak. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado.

3.10 Efecto del cromo en el cloroplasto

Una de las organelas más estudiadas en lo que respecta a los efectos del cromo en las microalgas es el cloroplasto (Ali et al., 2008; Perreault et al., 2009; Rodríguez et al., 2007; Volland et al., 2012). Con el propósito de evaluar posibles diferencias en esta organela entre las cepas CRS y WT en presencia de Cr (VI), se evaluaron la concentración y composición pigmentaria y las propiedades de absorción de la luz de los cultivos utilizando la técnica “*filter pad technique*” (QFT: *Quantitative Filter Technique*, según sus siglas en inglés) (Mitchell et al., 2003; Mitchell, 1990; Roesler, 1998), luego de ser expuestos a 0 y

1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. Esta técnica permite detectar cambios *in vivo* en la absorción del cultivo y por ende en el cloroplasto y en los tilacoides, no sólo a nivel de pigmentos, sino también en lo que respecta a la morfología y el empaquetamiento² de los mismos (Berner et al., 1989; Falkowski & LaRoche, 1991; Kirk, 1994). En la Figura 3.27 se observa una imagen de los filtros con las muestras que se analizaron en espectrofotómetro. Con esta técnica no se observaron diferencias entre las cepas WT y CRS en su composición pigmentaria ante la ausencia del metal (Figura 3.28 A y B). Sin embargo, la exposición a 1,95 mg/L de Cr (VI) produjo cambios significativos en la amplitud de absorción en las dos cepas, ya que se observó una disminución en los coeficientes de absorción en todo el espectro en comparación con sus respectivos controles (Figura 3.28 A). Por otra parte, al normalizar los espectros por el pico rojo de clorofila *a* (665 nm), se evidenció que en ambas cepas tratadas se produjo un incremento de los pigmentos accesorios correspondientes a la zona de 400 – 500 nm (carotenoides: carotenos y xantófilas) (Figura 3.28 B).

² El empaquetamiento de pigmentos se refiere a la disminución en la absorción de los pigmentos dentro de las células/cloroplastos/antenas en comparación con los mismos pigmentos en solución.

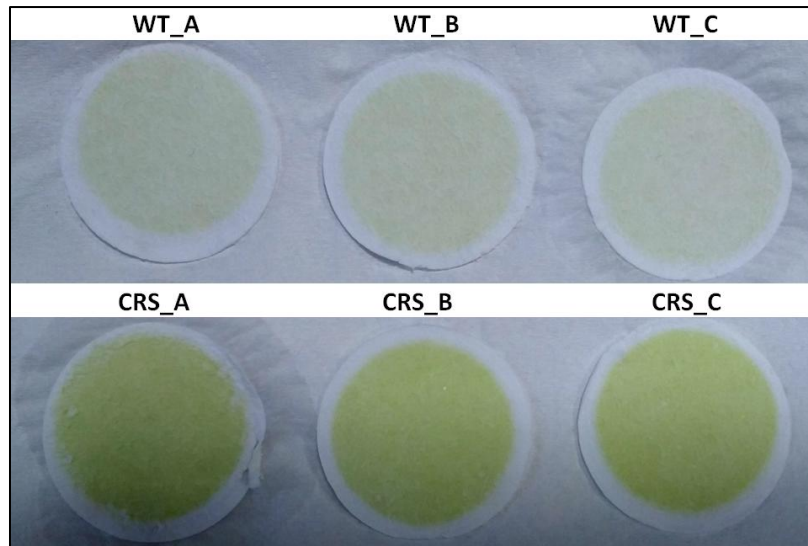


Figura 3.27. Imagen de los filtros con las muestras que fueron analizadas por espectrofotometría usando la técnica *“filter pad technique”*. Cabe destacar que la coloración de las fotos se corresponde con las células filtradas y es representativo de la densidad celular del cultivo, mientras que en los espectros (Figura 3.28 A) los datos de absorción están normalizados por el número de células. Cada cepa consta de 3 réplicas que se representan en los 3 filtros como A, B y C.

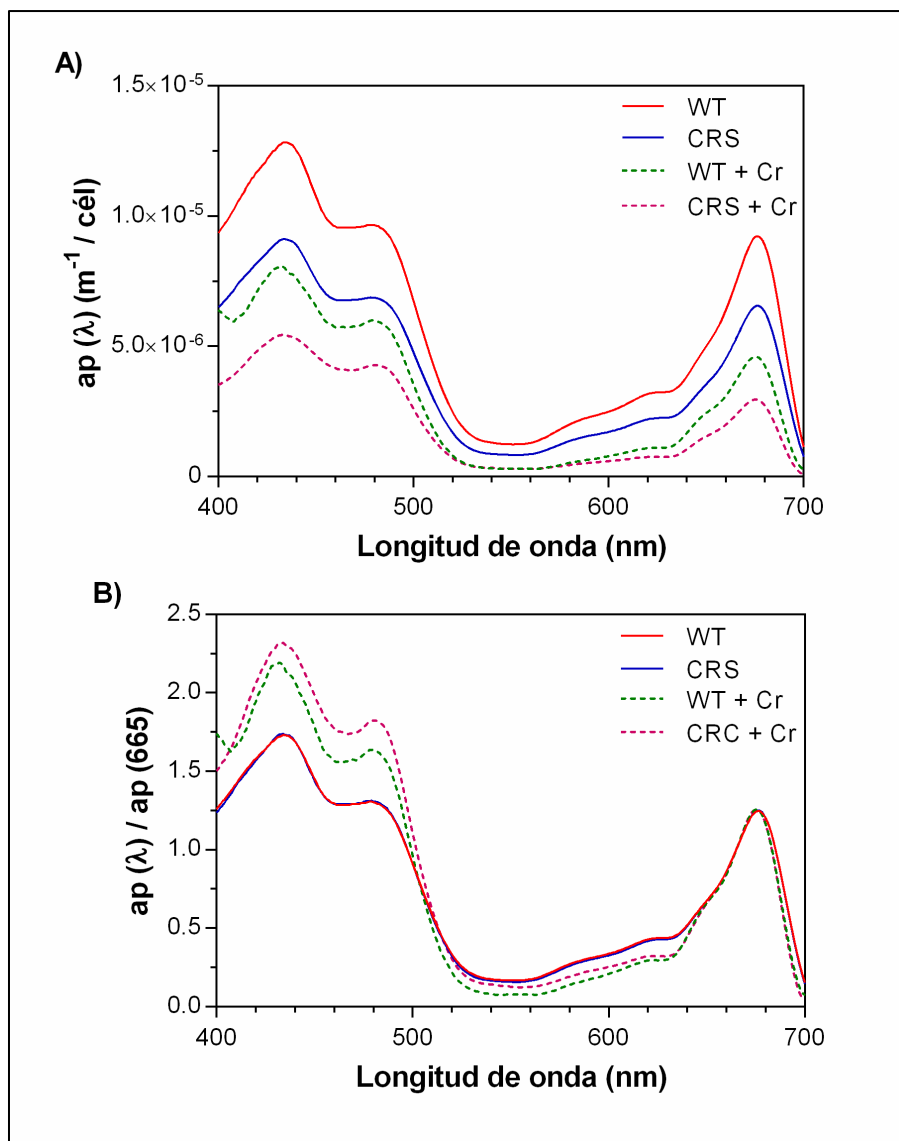


Figura 3.28. Efecto del cromo en el cloroplasto y en los pigmentos: Análisis de la absorción particulada *in vivo* mediante la técnica “*filter pad technique*”. Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. A) Espectros normalizados por número de células. B) Espectros normalizados por el pico de clorofila *a* (665 nm). Los barridos espectrales se realizaron entre 400 y 700 nm. Cada espectro es el promedio de 3 réplicas.

Para confirmar si los efectos observados en los experimentos de absorción particulada se debían a cambios en la morfología y estructura del cloroplasto y/o en la composición y concentración intracelular pigmentaria se procedió a la extracción y análisis espectrofotométrico de los pigmentos en dilución. Se realizó un experimento en las mismas condiciones experimentales que para el análisis de absorción particulada, es decir

se expuso a las dos cepas a 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 horas. La Figura 3.29 muestra la coloración de los extractos a los cuales se les hizo un espectro de absorción. Análogamente al experimento de absorción particulada, las cepas WT y CRS presentaron un espectro similar en amplitud y forma ante la ausencia del metal (Figura 3.30 A). Además, se observó una drástica disminución en los espectros de absorción cuando ambas cepas fueron tratadas con Cr (VI) (Figura 3.30 A). Nuevamente, cuando se normalizaron los espectros al pico rojo de la clorofila a (665 nm), se observó un incremento en la zona de los pigmentos accesorios para las cepas tratadas (Figura 3.30 B). En particular, los picos que se ven aumentados bajo tratamiento con Cr (VI) son aquellos que poseen máximos de absorción en 415, 436 y 466 nm, que se pueden atribuir a los pigmentos violaxantina ($\lambda_{\text{máx}}$: 415 nm, 436 nm, 466 nm), β -caroteno ($\lambda_{\text{máx}}$: 470 nm) y feofitina ($\lambda_{\text{máx}}$: 417 nm) (producto de degradación de la clorofila) (Figura 3.30 B).

Por un lado, la similitud entre los espectros obtenidos en el análisis de particulado y en la extracción de pigmentos sugiere que los cambios producidos por el Cr (VI) se producen a nivel del contenido de los pigmentos, y no a nivel de su empaquetamiento en el cloroplasto. Por otra parte, el aumento en el contenido de carotenoides relativo a clorofila en la cepa CRS incubada con Cr (VI) sugiere que dichos pigmentos protectores pueden estar cumpliendo un rol en la reducción de los síntomas de estrés oxidativo que esta cepa experimenta en las condiciones experimentales en comparación con la cepa WT.

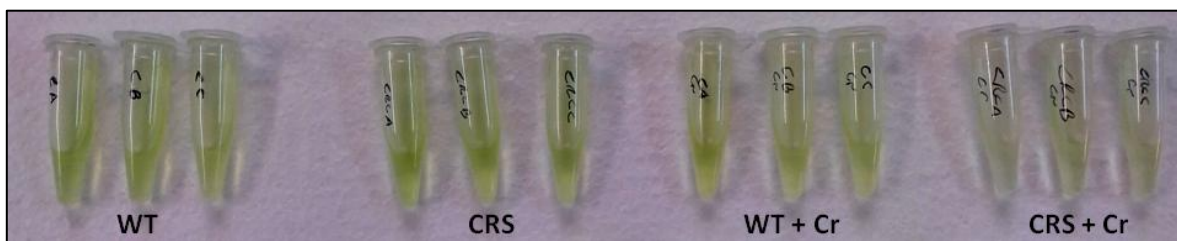


Figura 3.29. Imagen de los extractos de las muestras que fueron analizadas por espectrofotometría. Cabe destacar que la coloración de las fotos se corresponde a los pigmentos extraídos y es representativo de la densidad celular del cultivo, mientras que en los espectros (Fig. 3.30 A) los datos están normalizados por el número de células.

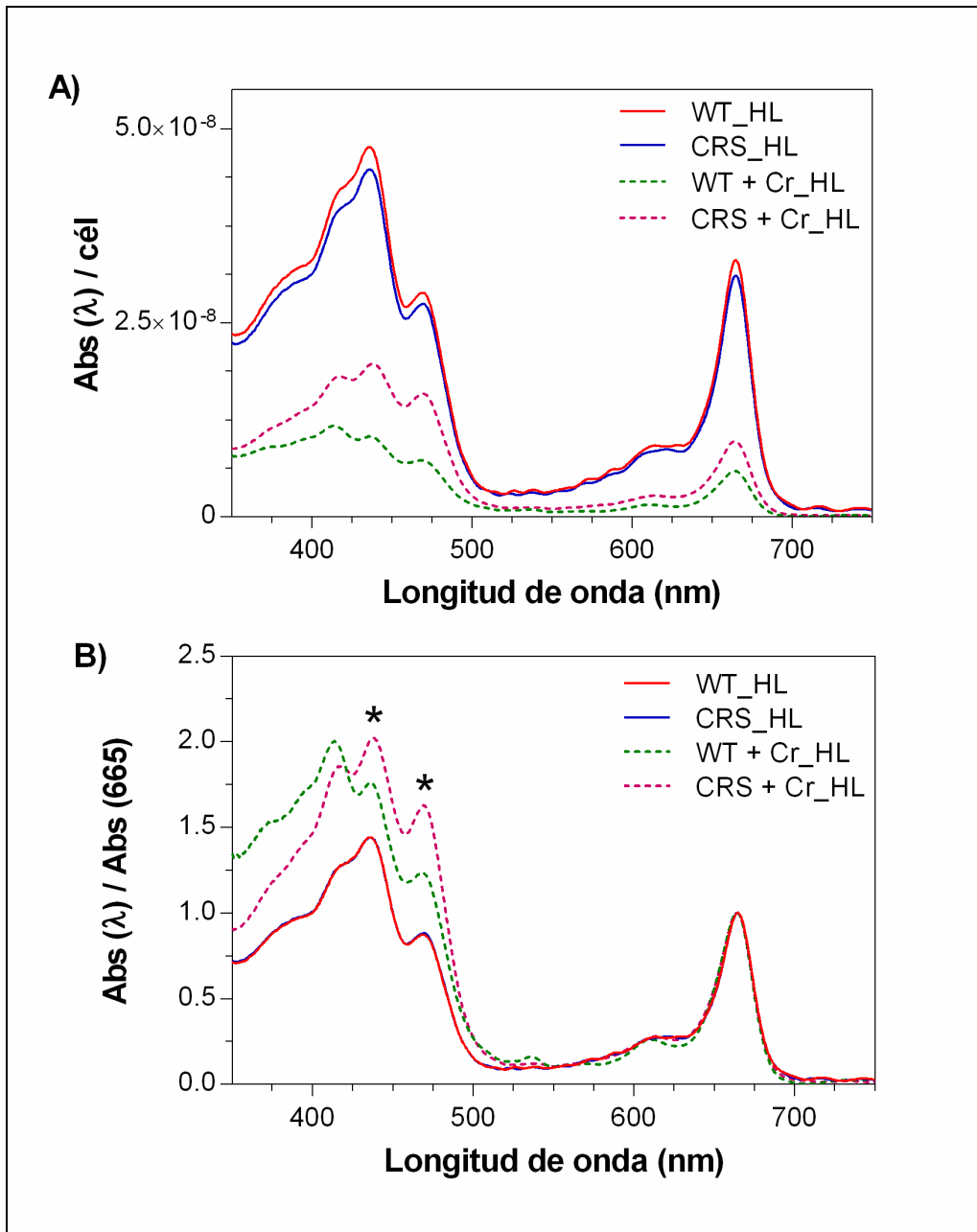


Figura 3.30. Efecto del cromo en el cloroplasto: Análisis de pigmentos en HL (*Higher Light*, según sus siglas en inglés). Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. El experimento se realizó en **HL**: 80 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (A) Espectros normalizados por número de células. (B) Espectros normalizados por el pico de clorofila *a* (665 nm). Los barridos espectrales se realizaron entre 350 y 750 nm. Cada espectro es el promedio de 3 réplicas. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey, con un valor $p < 0,05$. Los asteriscos indican deferencias entre los tratamientos **WT + Cr** y **CRS + Cr** en los picos con máximos en 417 nm, 437 nm y 470 nm, de acuerdo a los análisis estadísticos mostrados en la Figura 3.32.

Considerando que los organismos fotosintéticos están expuestos a la posibilidad de sufrir estrés foto-oxidativo (producido por la luz), se evaluó la posibilidad de un efecto combinado (ya sea aditivo o sinérgico) entre el estrés generado por cromo y aquel generado por luz. Debido a que el estrés por luz es mayor cuanto mayor es la intensidad de luz (Baroli & Melis, 1996; Niyogi, 1999), se evaluó el efecto del Cr (VI) sobre cultivos crecidos a una intensidad de luz menor a la utilizada previamente. De esta manera, a los experimentos descritos anteriormente, realizados a una intensidad lumínica de $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (considerado como *Higher Light (HL)*, según sus siglas en inglés), se sumaron otros en los cuales se disminuyó la irradiancia a $35 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (considerado *Lower Light (LL)*, según sus siglas en inglés).

En la Figura 3.31 A se muestra que nuevamente los espectros de absorción de ambas cepas sin el metal fueron similares. Sin embargo, ante la presencia del cromo hubo una disminución en el pico rojo de la clorofila *a* (665 nm) y un aumento en los carotenos en la cepa WT. Por otro lado, en la cepa CRS + Cr se produjo una drástica disminución en el espectro de absorción en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 3.31 A). Cuando se normalizaron los espectros por el pico de 665 nm (clorofila *a*), se observó que en la cepa WT + Cr hubo un incremento en la absorción en la zona de 400 a 500 nm (Figura 3.31 B). Este aumento es representado por los picos de 415, 436 y 466 nm y, al igual que en los ensayos de HL, se los puede atribuir a la violaxantina, al β -caroteno y a la feofitina (Figura 3.31 B). Por el contrario, la cepa CRS + Cr presentó un espectro muy similar a su respectivo control (Figura 3.31 B).

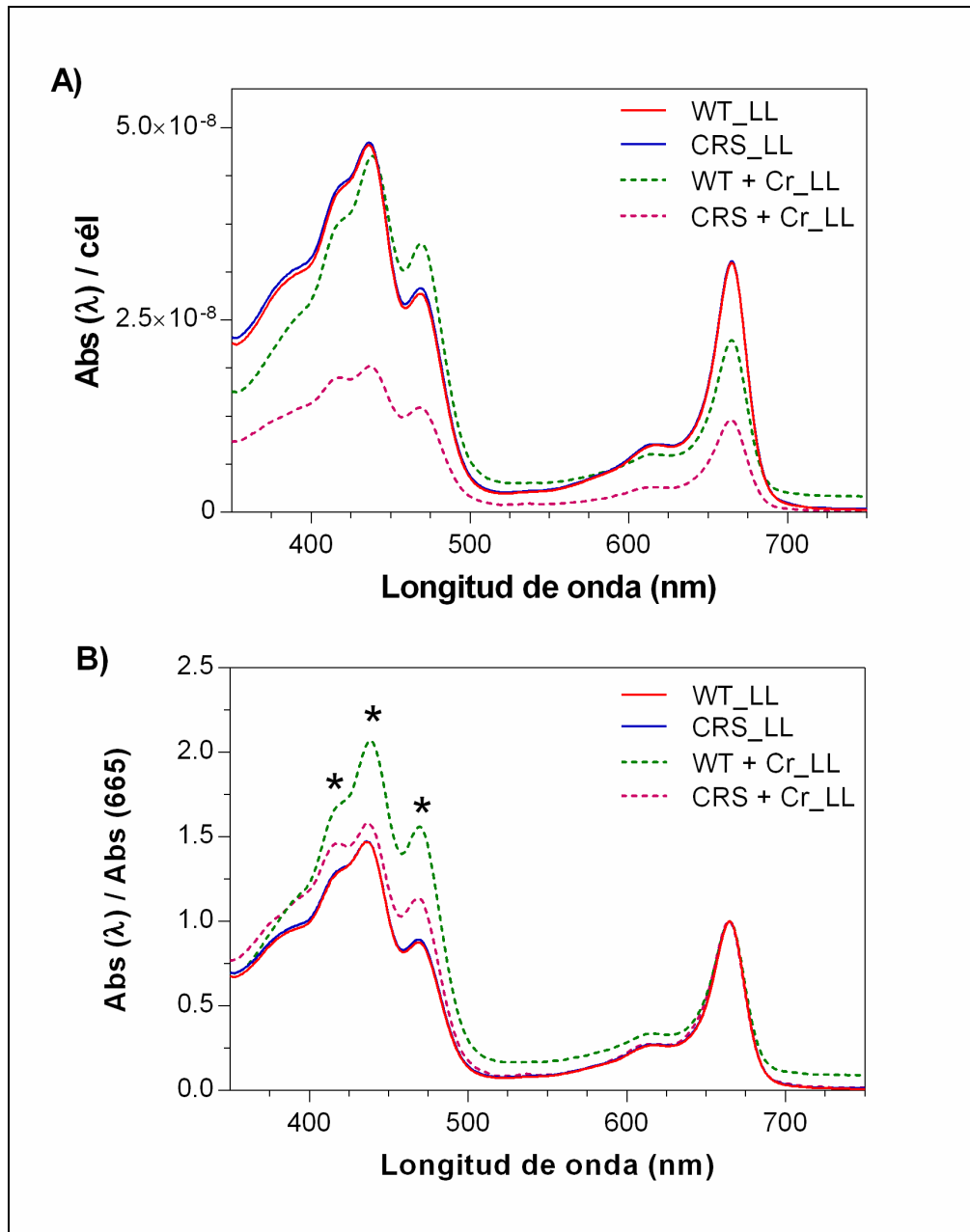


Figura 3.31. Efecto del cromo en el cloroplasto: Análisis de pigmentos en LL (*Lower Light*, según sus siglas en inglés). Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. El experimento se realizó en LL: 35 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A) Espectros normalizados por número de células. B) Espectros normalizados por el pico de clorofila *a* (665 nm). Los barridos espectrales se realizaron entre 350 y 750 nm. Cada espectro es el promedio de 3 réplicas. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey, con un valor $p < 0,05$. Los asteriscos indican deferencias entre los tratamientos **WT + Cr** y **CRS + Cr** en los picos 417 nm, 437 nm y 470 nm, de acuerdo a los análisis estadísticos mostrados en la Figura 3.32.

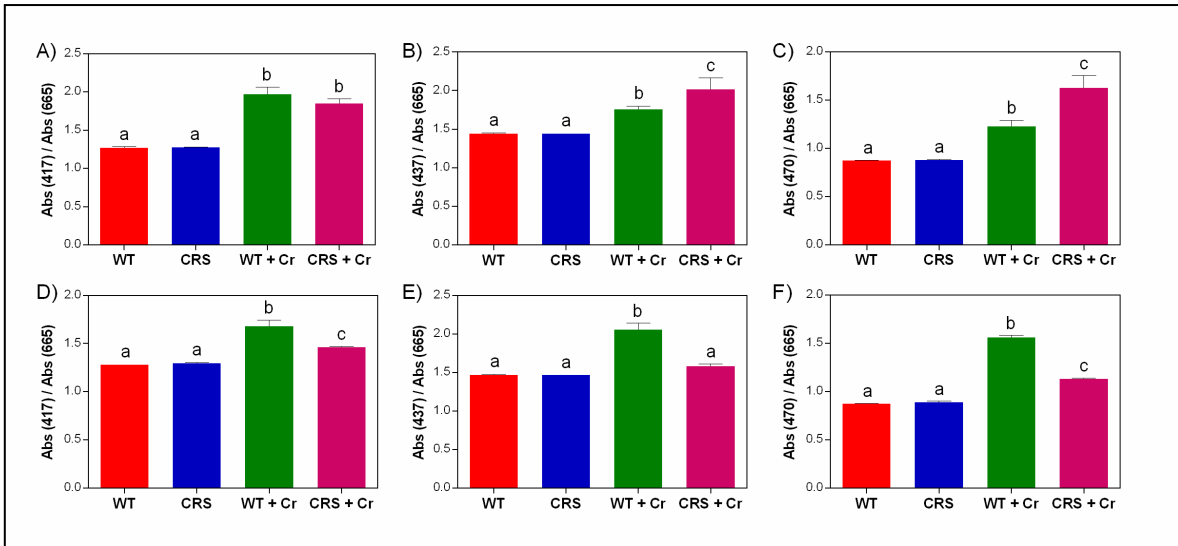


Figura 3.32. Análisis estadístico de los 3 coeficientes obtenidos en las Figura 3.30 B y 3.31 B: Abs (417), Abs (437), y Abs (470) están normalizados al pico de clorofila *a* (665). A), B) y C) son los coeficientes de los experimentos en *Higher Light*; D), E) y F) son los coeficientes de los experimentos de *Lower Light*; A) y D) Abs (417) / Abs (665); B) y E) Abs (437) / Abs (665); C) y F) Abs (470) / Abs (665). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$.

Adicionalmente a los cambios en los pigmentos en los experimentos de LL, se determinó la densidad celular de los controles y los tratamientos a las 120 hs. En la Figura 3.33 se reporta el crecimiento de ambas cepas, WT y CRS, con y sin cromo, una vez finalizado el experimento. Nuevamente, la cepa CRS + Cr se comportó de forma similar a su respectivo control ya que presentó una densidad celular equivalente. Por el contrario, la cepa WT ante la presencia del metal disminuyó drásticamente su crecimiento en comparación a su control.

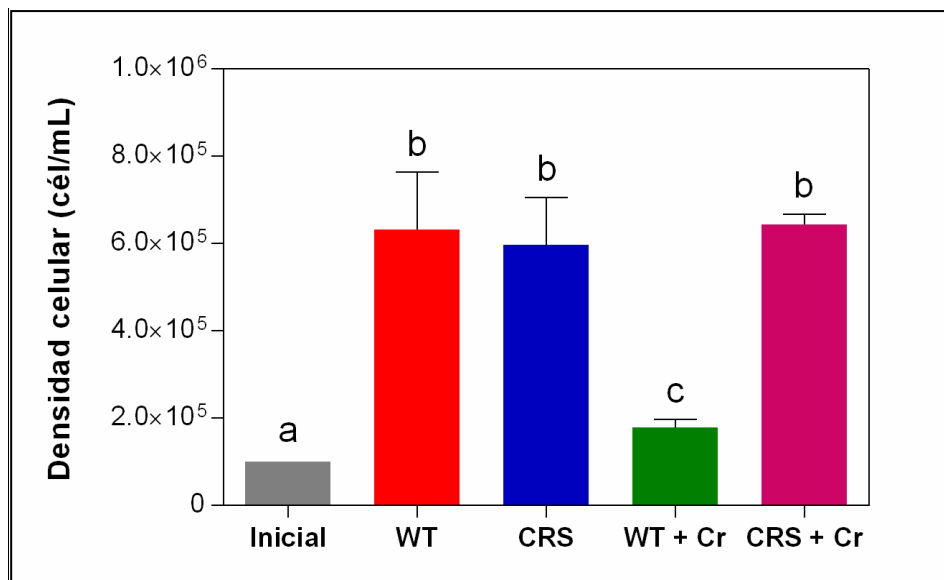


Figura 3.33. Crecimiento de las cepas WT y CRS en el experimento de luz reducida. Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. El experimento se realizó en LL: $35 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*Lower Light*, según sus siglas en inglés). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por sextuplicado.

En función de los resultados anteriores (Figuras 3.30 A y 3.31 A) se reagruparon y combinaron los espectros por cepa y tratamiento en nuevos gráficos. En la Figura 3.34 se observa que las cepas WT y CRS ante la ausencia del metal presentaron un espectro de absorción similar en las dos condiciones de irradiancias LL y HL. Sin embargo, cuando ambas cepas fueron expuestas a Cr (VI), la cepa WT sufrió una disminución en el pico de 417 nm y un aumento significativo en los picos de 437 y 470 nm en la condición de LL. Por otra parte, se observa que la cepa CRS mantuvo la forma espectral pero se produjo una disminución en la absorción en la zona de 400 – 500 nm cuando el experimento se realizó a una menor irradiancia (LL).

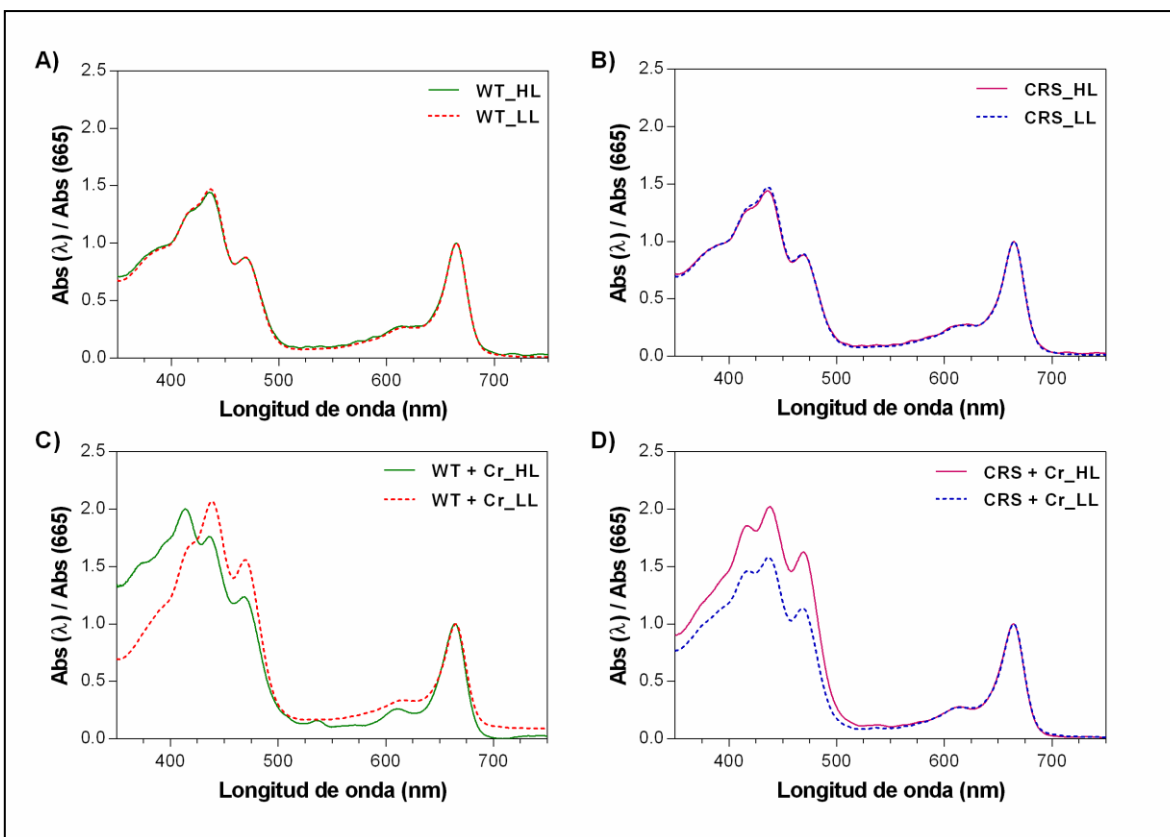


Figura 3.34. Efecto del cromo en el cloroplasto y en los pigmentos: Análisis de pigmentos. Los cultivos de WT y CRS fueron expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. Los experimentos se realizaron en **HL**: $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y **LL**: $35 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A) y B) WT y CRS bajo HL y LL en ausencia del metal. C) y D) WT y CRS bajo HL y LL en presencia del Cr (VI). Los espectros están normalizados por el pico de clorofila *a* (665 nm). Cada espectro es el promedio de 3 réplicas. Los gráficos se realizaron utilizando los espectros de las Figuras 3.30 B y 3.31 B.

Por último, en función de los cambios observados en los espectros de absorción, se cuantificaron las concentraciones de clorofila *a* y *b* y de carotenoides. La Tabla 3.4 muestra que ambas cepas en ausencia del metal y en los dos tratamientos de intensidad de luz (HL y LL) presentaron concentraciones similares de clorofila *a* y *b* y de carotenoides. En el caso de los tratamientos con Cr (VI), en HL se evidencia que la cepa CRS + Cr presentó un aumento de 4 veces y 2,4 veces más de carotenoides que la WT + Cr cuando los datos se normalizaron al número de células o a la suma de las dos clorofilas, *a* y *b*, respectivamente. En la condición LL la situación se invirtió y en la cepa WT + Cr se produjo un incremento de 4,5 veces y 2,4 veces más que la cepa CRS + Cr, cuando los datos fueron

normalizados por célula y los carotenoides fueron normalizados a las clorofilas *a* y *b*, respectivamente.

En su conjunto, los resultados obtenidos en HL y LL sugieren que la respuesta de los pigmentos a la toxicidad del Cr (VI) varía en base a las condiciones experimentales, especialmente cuando la toxicidad de dicho metal se combina con los efectos de otros estímulos.

Tabla 3.4. Concentración de clorofila *a* y *b*, y carotenoides. Los datos son presentados como datos normalizados por número de células y, adicionalmente, los carotenoides están normalizados por el contenido de clorofila (carotenoides / (Chl *a* + Chl *b*)). Los datos se obtuvieron de los espectros de las Figuras 3.30 y 3.31. *concentración de pigmentos está expresada por 10⁶ células. El análisis estadístico se realizó para cada pigmento mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado. SD: desviación estándar.

	Concentración* de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> y de carotenoides totales en µg/célula							
	<i>Chl a</i>		<i>Chl b</i>		Carotenoides		Car/(<i>Chl a</i> + <i>Chl b</i>)	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
WT_HL	3,66 ^a	0,85	1,75 ^a	0,37	0,23 ^a	0,08	0,04 ^a	0,01
CRS_HL	3,44 ^a	0,15	1,62 ^a	0,09	0,25 ^a	0,01	0,05 ^a	0,00
WT + Cr_HL	0,62 ^b	0,05	0,40 ^b	0,04	0,08 ^b	0,02	0,08 ^a	0,02
CRS + Cr_HL	1,03 ^c	0,08	0,66 ^c	0,06	0,32 ^a	0,07	0,19 ^b	0,03
WT_LL	3,62 ^a	0,44	1,64 ^a	0,20	0,28 ^a	0,05	0,05 ^a	0,01
CRS_LL	3,62 ^a	0,25	1,69 ^a	0,08	0,28 ^a	0,02	0,05 ^a	0,00
WT + Cr_LL	2,42 ^d	0,45	1,41 ^a	0,36	0,72 ^c	0,24	0,19 ^b	0,05
CRS + Cr_LL	1,29 ^c	0,21	0,74 ^c	0,05	0,16 ^a	0,06	0,08 ^a	0,02

3.11 Efecto protector de los exudados de la cepa resistente (CRS) en la toxicidad del cromo

Una de las respuestas de las microalgas ante la exposición a metales tóxicos puede ser la liberación de exudados orgánicos que pueden quelar o reducir químicamente los metales, disminuyendo así su concentración o su toxicidad. Por esta razón, se evaluó si las cepas WT y CRS secretaban algún tipo de exudado capaz de mitigar el efecto tóxico del cromo. Inicialmente se realizó un experimento en el cual se expuso a las cepas WT y CRS a los exudados con cromo propios y a los de la otra cepa por un período de 120 horas.

Adicionalmente, en dichos exudados se determinó la concentración de Cr (VI), siendo esta de 1,76 mg/L para ambas cepas. En la Figura 3.35 se observa que los exudados con Cr (VI) de la cepa WT (**WT Cr EX**) parecen haber tenido un efecto inhibitorio en ambas cepas, ya que ninguna pudo reproducirse. Por otra parte, las cepas CRS y WT incubadas con el exudado con Cr (VI) de CRS (**CRS Cr EX**) (Figura 3.36) presentaron un crecimiento similar al que se observa cuando son tratadas con 1,95 mg/L de Cr (VI) en 120 hs (Figura 3.6). En este caso ambas curvas parecerían encontrarse en una etapa de crecimiento exponencial, aunque con tasas de crecimiento muy diferentes, de manera similar a lo observado en los experimentos de la Figura 3.6. Por lo tanto, para poder evaluar esta tendencia, se realizó otro experimento pero con una duración superior a las 120 hs. Además, teniendo en cuenta que el exudado con Cr (VI) de la cepa WT parece haber tenido un efecto inhibitorio en el crecimiento en ambas cepas, se decidió estudiar solamente el exudado con Cr (VI) de la cepa CRS (**CRS Cr EX**).

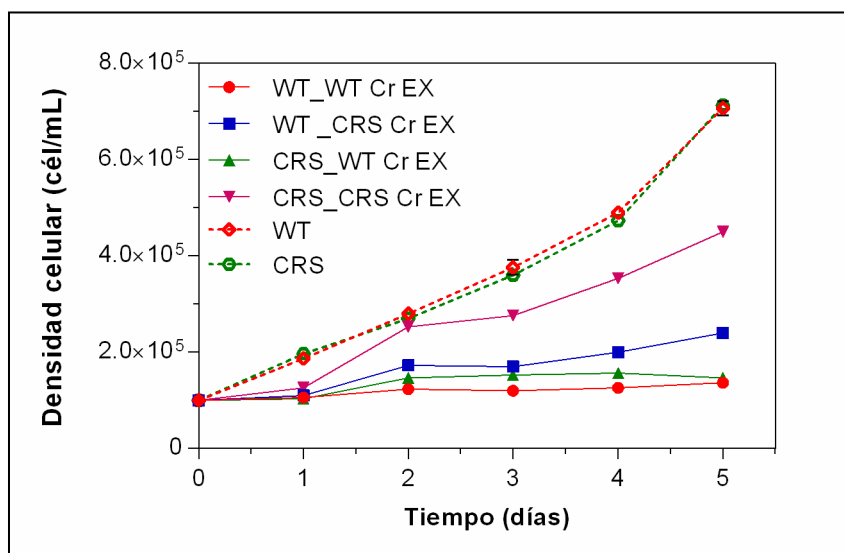


Figura 3.35. Efecto de los exudados con cromo de las cepas WT y CRS en la proliferación. Crecimiento de las cepas WT y CRS al ser expuestas a los exudados con cromo (**WT Cr EX** y **CRS Cr EX**) y en ausencia del metal durante 120 hs. La densidad celular se determinó cada 24 hs mediante conteo celular. El experimento se realizó por triplicado.

Por lo expuesto anteriormente, se realizó un segundo experimento para corroborar si el exudado con Cr (VI) de la cepa CRS (**CRS Cr EX**) tenía un efecto protector en la cepa WT pero, en este caso, se aumentó la duración del experimento a 11 días. En lo que respecta a la cepa WT con su propio exudado sin el agregado de cromo (**WT_EX**) presentó un crecimiento similar al control (**WT sin Cr (VI): cepa WT sin tratamiento**) (datos no mostrados). Es decir, que de esta manera se comprobó que no hubo un agotamiento del medio de cultivo durante la generación del exudado. Por otro lado, en la Figura 3.36 se observa que dicho tratamiento, **WT_CRS Cr Ex**, mostró una clara tendencia de crecimiento exponencial, mientras que la cepa WT sometida a un tratamiento estándar con Cr (VI) (**WT + Cr**) entró en estado estacionario en el día 9. Además, la Figura 3.37 muestra el crecimiento relativo de los tratamientos normalizados al crecimiento del control (WT sin el metal) en el día 11 del ensayo. Claramente se evidenció un crecimiento superior en la cepa **WT CRS Cr Ex** en comparación al que presentó la cepa **WT + Cr**. Estos resultados sugieren que los exudados de la cepa CRS en presencia de Cr (VI) poseen compuestos “protectores” que permiten un mejor crecimiento de la población celular de la cepa WT.

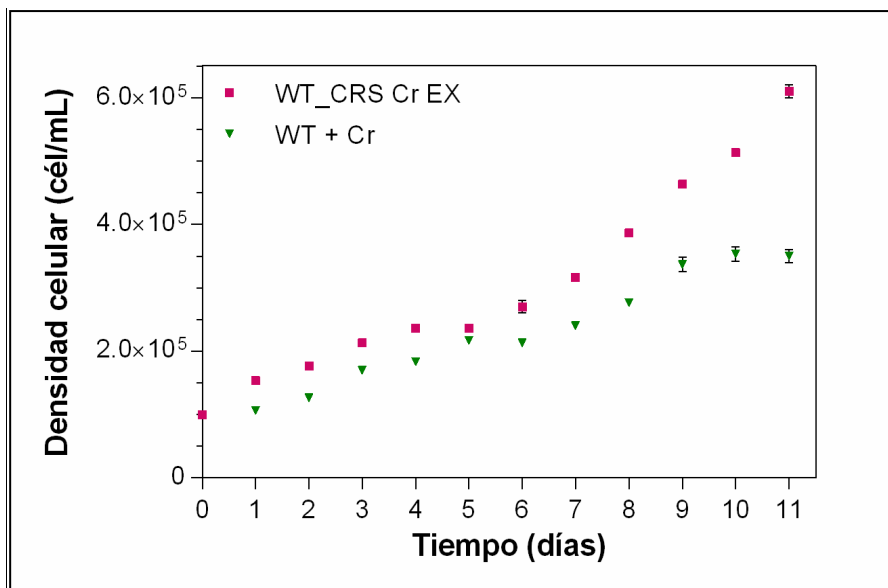


Figura 3.36. Efecto del exudado con cromo de la cepa CRS en la proliferación de la cepa WT. Crecimiento de la cepa WT al ser expuesta al exudado con cromo de la cepa CRS (**CRS Cr EX**) y a 1,95 mg/L de Cr (VI) (**WT + Cr**) durante 11 días. La densidad celular se determinó cada 24 hs mediante conteo celular. El experimento se realizó por triplicado.

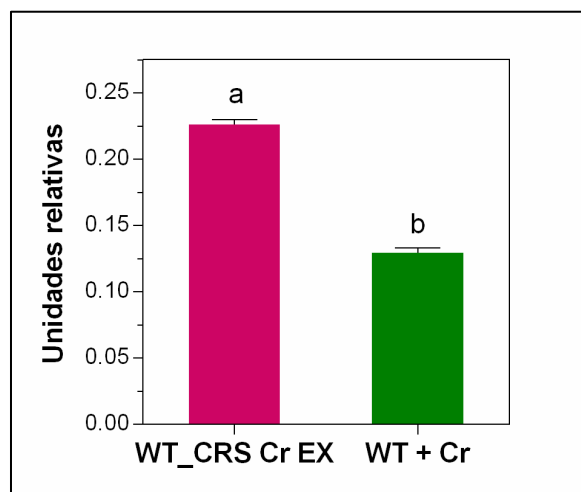


Figura 3.37. Efecto del exudado con cromo de la cepa CRS en la proliferación de la cepa WT. Densidad celular en el día 11 de los tratamientos **WT_CRS Cr EX** y **WT + Cr** normalizadas al crecimiento de la cepa WT en ausencia del metal (**control**). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student para muestras desapareadas. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado.

3.12 Efecto del cromo en los grupos funcionales de la pared celular

La primera barrera a la que se enfrenta el cromo en contacto con células de *S. dimorphus* es la pared celular. Por esta razón, se realizó un análisis de FTIR (siglas del inglés, *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*). Este tipo de análisis permite evaluar el efecto del Cr (VI) en los grupos funcionales y en la síntesis de las principales macromoléculas, ambos presentes en la pared celular. Las cepas WT y CRS fueron expuestas a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. La figura 3.38 muestra que en ausencia del metal ambas cepas presentaron un espectro similar y, además, típico según lo esperado para algas (Giordano et al., 2001; Heraud et al., 2007). Los grupos funcionales asociados a los picos de los espectros se detallan en la Figura 3.38. No obstante, cuando ambas cepas fueron tratadas con Cr (VI) los espectros se modificaron. En el caso de los picos correspondientes a las amidas I y II (1650 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$ y 1540 cm^{-1} $\delta(\text{N}-\text{H})$), los dos tratamientos con Cr (VI) presentaron una disminución de la intensidad, siendo más pronunciada en la cepa WT + Cr. Por el contrario, en las dos cepas expuestas al metal hubo un aumento en la intensidad de los carboxilatos (1370 cm^{-1} , $-\text{COO}^-$), aunque este incremento fue mayor en la cepa WT + Cr. Por último, se observó un aumento en diferentes picos correspondientes a polisacáridos (1150 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$, C-3-O-3-H y C-6-H2-O-6-H) en ambas cepas expuestas a Cr (VI). Al normalizar los espectros por el pico de amida I (Figura 3.39 y Tabla 3.5) se evidenció que la cepa WT + Cr presentó un incremento superior al de la cepa CRS + Cr en el pico de carboxilatos y en los picos que corresponden a polisacáridos ($1150\text{ cm}^{-1} - 1020\text{ cm}^{-1}$). Estos resultados sugieren que la presencia de Cr (VI) produce cambios en la presencia y/o exposición de grupos funcionales de la pared celular, particularmente en la cepa WT. Estos cambios pueden alterar la química del Cr (VI) subsiguiente y podrían guardar relación con su toxicidad.

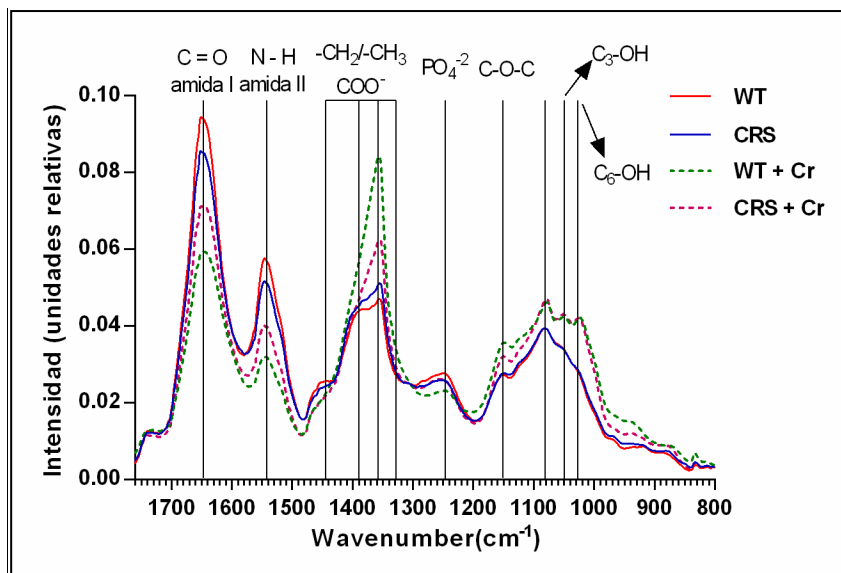


Figura 3.38. Efecto del cromo en la pared celular. Espectros del FTIR de los cultivos de WT y CRS luego de ser expuestos a 0 y 1,95 mg/L de Cr (VI). Las bandas asignadas fueron las siguientes: 1740 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$ ésteres de lípidos, amida I $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{O})$ y amida II $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{N}-\text{H})$ corresponden a proteínas, $\sim 1455 \text{ cm}^{-1}$ $\delta_{\text{as}}(-\text{CH}_2/-\text{CH}_3)$, $1370-1398 \text{ cm}^{-1}$ $\delta_{\text{s}}(-\text{CH}_2/-\text{CH}_3)\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, 1240 cm^{-1} $\nu(\text{P}=\text{O})$ fosfodiésteres de ácidos nucleicos, $1200-950 \text{ cm}^{-1}$ corresponden a la valencia y a la deformación de los anillos de los sacáridos (C-O, C-C, CH_2OH), específicamente 1150 cm^{-1} forma el estiramiento asimétrico de la unión glicosídica $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$ asignados a las vibraciones de C-3-O-3-H y C-6-H₂-O-6-H. La intensidad de los picos está expresada en unidades relativas. Cada espectro es el promedio de 3 pseudoréplicas y cada ensayo de FTIR fue realizado por triplicado.

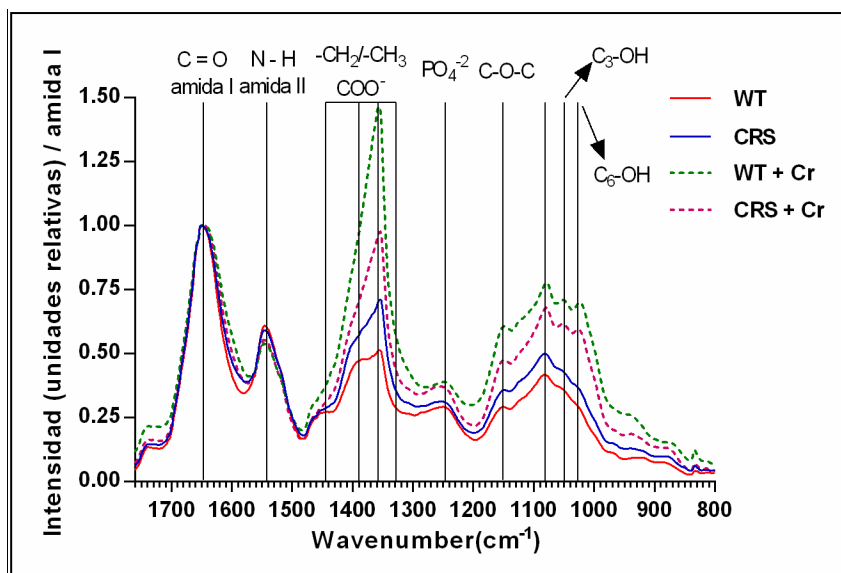


Figura 3.39. Efecto del cromo en la pared celular: Espectros de FTIR normalizados por proteína. La normalización de los espectros se realizó por el pico de amida I, 1650 cm⁻¹. Las bandas asignadas fueron las siguientes: 1740 cm⁻¹ ν(C=O) esteres de los lípidos, amida I ~1650 cm⁻¹ ν(C=O) y amida II ~1540 cm⁻¹ δ(N-H) corresponden a proteínas, ~1455 cm⁻¹ δ_{as}(-CH₂/-CH₃), 1370-1398 cm⁻¹ δ_s(-CH₂/-CH₃)ν_s(COO⁻), 1240 cm⁻¹ νP=O de los fosfodiesteres de los ácidos nucleicos, 1200-950 cm⁻¹ corresponden a la valencia y a la deformación de los anillos de los sacáridos (C-O, C-C, CH₂OH), específicamente 1150 cm⁻¹ forma el estiramiento asimétrico de la unión glicosídica ν_{as}(C-O-C), ~1050 cm⁻¹ y ~1020 cm⁻¹ asignado a las vibraciones de C-3-O-3-H y C-6-H₂-O-6-H. La intensidad de los picos está expresada en unidades relativas. Cada espectro es el promedio de 3 pseudoréplicas y cada ensayo de FTIR fue realizado por triplicado.

Tabla 3.5. Picos seleccionados de la Figura 3.39. Proteínas: amida I 1650 cm⁻¹ ν(C=O) y 1370 cm⁻¹ δ_s(-CH₂/-CH₃) ν_s(COO). Polisacáridos: 1150 cm⁻¹ estiramiento asimétrico de las uniones glicosídicas ν_{as}(C-O-C), 1050 cm⁻¹ y ~1020 cm⁻¹ asignados a las vibraciones de C-3-O-3-H y C-6-H₂-O-6-H.

Wavelength (cm ⁻¹)	Grupos de macromoléculas	Tratamientos			
		WT	WT + Cr (VI)	CRS	CRS + Cr (VI)
1650	Proteínas (amida I)	1,00	1,00	1,00	1,00
1370	Carboxilatos	0,48	1,28	0,64	0,86
1150	Polisacáridos	0,29	0,61	0,36	0,47
1050	Polisacáridos	0,36	0,71	0,43	0,62
1020	Polisacáridos	0,27	0,69	0,34	0,58

Picos elegidos normalizados al pico de proteína, amida I

3.13 Remoción de cromo

Uno de los principales objetivos con relación a la generación de una cepa resistente a Cr (VI), es el de evaluar su capacidad de remover el metal de fuentes contaminadas, como efluentes, cursos de agua, suelos, etc. Con el propósito de evaluar si la cepa CRS posee una capacidad de remoción de Cr (VI) superior a la del WT, inicialmente se midió el porcentaje de desaparición de dicho metal en los experimentos de toxicidad en las condiciones típicas de este trabajo, es decir 1,95 mg/L de Cr (VI), con una densidad celular inicial de 1×10^5 cél/mL, a pH 6,8 y durante 120 horas. La Figura 3.40 muestra que, al finalizar el tiempo de tratamiento con 1,95 mg/L de Cr (VI), la desaparición de Cr (VI) fue de aproximadamente un 15% para ambas cepas y de un 11% para el medio de cultivo sin células. Vale la pena recordar que la determinación de Cr (VI) se realizó por el método de la difenilcarbazida, que no detecta la presencia de Cr (III). Por esta razón, para poder discernir si la desaparición de Cr (VI) se debía a la reducción de Cr (VI) a Cr (III) o a la remoción del metal se realizaron determinaciones por ICP-MS³ (siglas del inglés, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), que permite determinar la concentración total de cromo (Cr (VI) + Cr (III)). De esta manera, a través de la resta entre el cromo total y el Cr (VI), se pudo estimar la concentración de Cr (III) y se corroboró que todo el cromo en estas condiciones experimentales permaneció en el medio de cultivo, ya que la concentración de Cr (VI) al inicio del ensayo fue equivalente a la de Cr total a las 120 horas (Figura 3.41).

³ La determinación de Cr total se realizó mediante ICP-MS ya que se estaba evaluando si había remoción del metal en condiciones experimentales en las que la concentración inicial de Cr fue muy baja (1,3 mg/L). Por lo tanto, de producirse algún cambio, esta técnica lo hubiese detectado ya que para esta determinación el límite de detección fue de 8,6 µg/L. Dicho de otra manera, el ICP-MS presenta un error muy chico en esta concentración del metal (1,3 mg/L), con lo cual puede medir diferencias entre 1,3 mg/L y 1,29 mg/L.

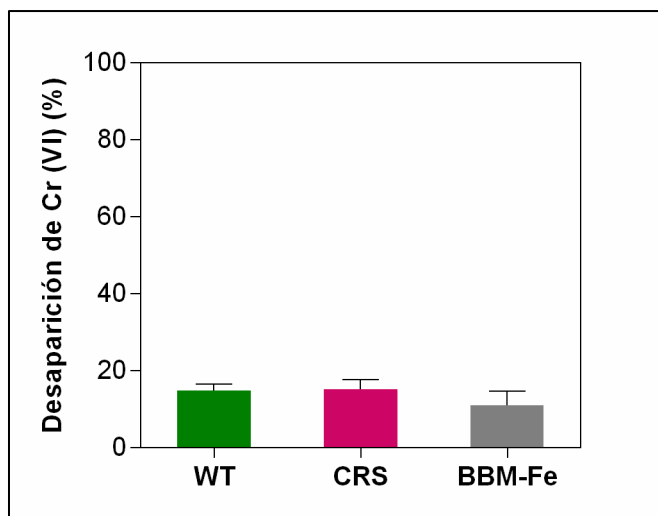


Figura 3.40. Determinación de cromo en el sobrenadante de las cepas WT y CRS luego del tratamiento con el metal. Los datos corresponden al promedio de 13 ensayos con 3 réplicas cada uno y realizados bajo las mismas condiciones experimentales: 1×10^5 células/mL de densidad celular inicial, 1,95 mg/L de Cr (VI), pH 6,8 y 120 hs de duración. La detección de Cr (VI) se realizó utilizando difenilcarbazida. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey usando un valor $p < 0,05$. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. BBM-Fe: medio de cultivo sin células.

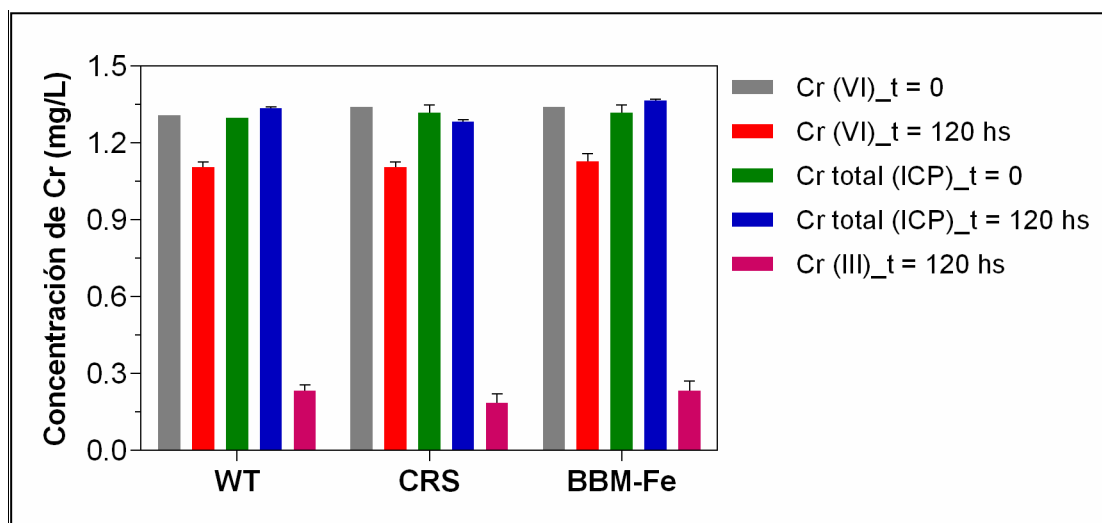


Figura 3.41. Determinación de cromo en el sobrenadante de las cepas WT y CRS luego del tratamiento con Cr (VI). Cultivos de una densidad de 1×10^5 células/mL fueron expuestos a 1,3 mg/L de Cr (VI) durante 120 hs. El Cr (VI) fue determinado mediante el método de la difenilcarbazida (DPC). El Cr total se cuantificó por ICP-MS. La concentración de Cr (III) se calculó a partir de la diferencia entre el Cr total y el Cr (VI). El experimento se realizó por duplicado. BBM-Fe: medio de cultivo sin células.

Habiendo comprobado que no hubo remoción de Cr (VI) por parte de las células en las condiciones experimentales típicas de los ensayos de toxicidad, (1×10^5 cél/mL; pH 6,8; 120 horas; 1,95 mg/L de Cr (VI)), se decidió utilizar condiciones más propicias para la remoción de metal. En base a condiciones experimentales reportadas en la literatura se modificaron las siguientes variables: densidad celular, pH y concentración y tiempo de exposición al metal. Es importante destacar que, en los ensayos de remoción, se produjo el aumento de la densidad celular ($2,4 \times 10^7$ células/mL) en simultáneo con un aumento en la concentración de Cr (VI), pero en realidad se disminuyó la dosis del metal por célula ($4,17 \times 10^{-6}$ mg de Cr/célula), la cual fue unas 4,7 veces menor que la de los ensayos de toxicidad (Tabla 3.6). De esta manera, se realizan los experimentos en condiciones de menor toxicidad y/o efecto.

Tabla 3.6. Comparación de las dosis de Cr (VI) por cada célula en experimentos de toxicidad y en experimentos de remoción.

	Densidad de células (células/mL)	Concentración de Cr (VI) (mg/mL)	Dosis de metal (10^{-6} mg Cr (VI)/célula)
Experimentos de toxicidad	$1,0 \times 10^5$	1,95	19,5
Experimentos de remoción	$2,4 \times 10^7$	100	4,17

En un primer ensayo las cepas WT y CRS fueron expuestas a 100 mg/L de Cr (VI) y en este caso se decidió mantener el pH del medio (6,8), aunque la duración fue de 10 días. La Figura 3.42 A muestra que, transcurrido el período de exposición al metal, la desaparición del Cr (VI) del medio de cultivo fue de aproximadamente 16%. Por este motivo, se decidió no determinar por espectroscopia de absorción atómica⁴ (EAA) la concentración de Cr total en el medio, ya que el valor de desaparición de Cr (VI) fue bajo, independientemente de si fue internalizado o removido por las células o reducido a Cr (III). Adicionalmente, en las cepas WT y CRS se evidenció un crecimiento de un 30 % al finalizar el ensayo en el décimo día (Figura 3.42 B).

⁴ La determinación de Cr total se realizó por EAA debido a que la concentración inicial de Cr fue de 100 mg/L y la sensibilidad de la técnica es suficiente para detectar remoción del metal en el sobrenadante.

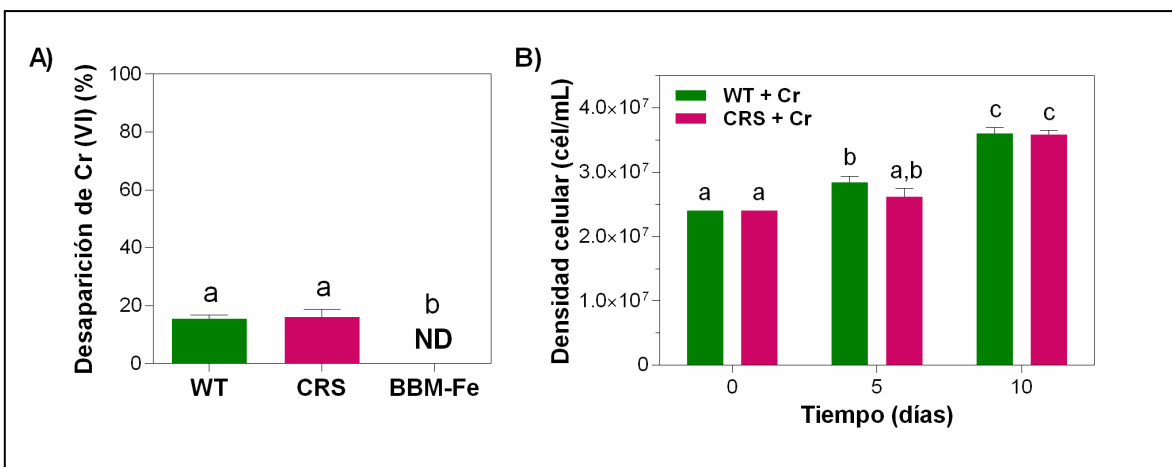


Figura 3.42. Experimento de remoción de cromo usando las cepas WT y CRS: pH 6,8. Cultivos de una densidad de $2,4 \times 10^7$ células/mL fueron expuestos a 100 mg/L de Cr (VI) a pH de 6,8 durante 10 días. A) Desaparición de Cr (VI) determinada mediante el método de la difenilcarbazida (DPC). B) Crecimiento de las dos cepas durante el ensayo. La densidad celular se determinó cada 5 días mediante conteo celular. ND: no detectable. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey (A) y mediante ANOVA de dos vías con una comparación múltiple de Sidak (B). Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por triplicado. BBM-Fe: medio de cultivo sin células.

Luego de los resultados obtenidos a pH 6,8, se realizó un segundo experimento a pH 2 con una duración de 24 horas. En este caso, en ambas cepas hubo una desaparición de Cr (VI) del medio de cultivo de aproximadamente 80% (Figura 3.43 A). Como la desaparición en este caso fue considerable, se determinó la concentración de cromo total en el medio de cultivo y se corroboró que ambas cepas presentaron un 70% de remoción de cromo total (Figura 3.43 B). Entonces, restando la concentración de Cr total (Figura 3.43 B) a la de Cr (VI) (Figura 3.43 A), se puede deducir que hubo un 10 % de Cr (III) en el medio de cultivo. A continuación, se calculó el peso seco para poder obtener la capacidad de remoción (q : mg de metal/gramo de biomasa seca) de las cepas WT y CRS, el cual es un índice que permite comparar la eficiencia de remoción de diferentes especies de microalgas en condiciones experimentales similares. En este caso, las dos cepas presentaron una capacidad de remoción (q) de 71 mg de Cr total por gramo de biomasa (Tabla 3.7). Estos resultados sugieren que la mayor resistencia a Cr (VI) de la cepa CRS no le confiere a esta cepa una ventaja en la remoción del metal. Por otra parte, ambas cepas

fueron eficientes en la remoción del metal sólo a pH 2, condición en la cual las células estaban muertas y la biomasa sólo actuó como biosorbente o intercambiador iónico.

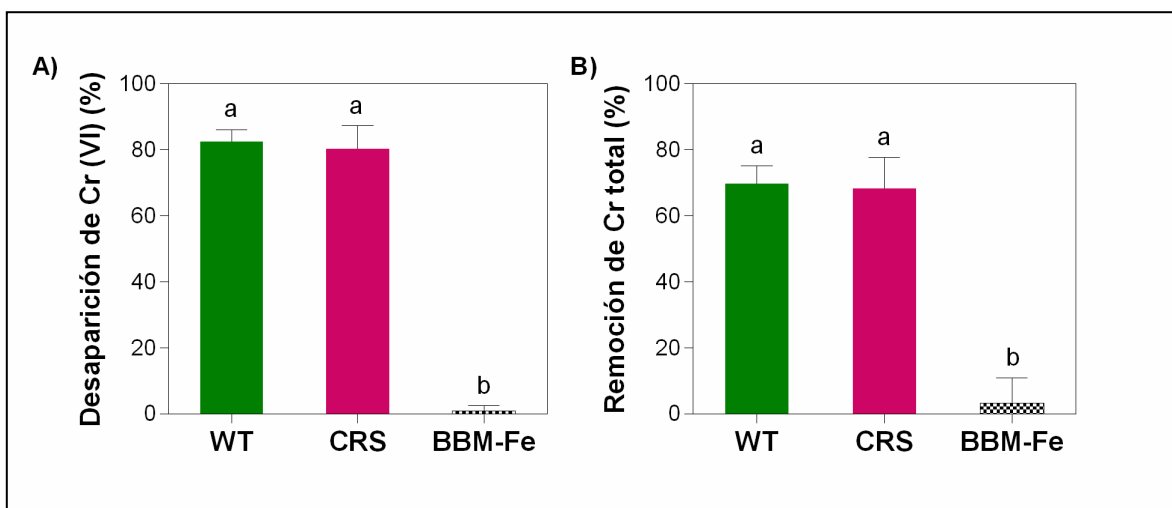


Figura 3.43. Experimento de remoción de cromo usando las cepas WT y CRS: pH 2. Cultivos de una densidad de $2,4 \times 10^7$ células/mL fueron expuestos a 100 mg/L de Cr (VI) a pH de 2 durante 24 horas. A) Desaparición de Cr (VI), determinada mediante el método de la difenilcarbazida. B) Remoción de cromo, cuantificación por espectroscopia de absorción atómica (EAA). La concentración de Cr (III) se calculó a partir de la diferencia entre el Cr (VI) y el Cr total. ND: no detectable. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Tukey. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por sextuplicado. BBM-Fe: medio de cultivo sin células.

Tabla 3.7. Peso seco y capacidad de remoción (q) de las cepas WT y CRS. Para la determinación de la capacidad de remoción cultivos de una densidad de $2,4 \times 10^7$ células/mL fueron expuestos a 100 mg/L de Cr (VI) a pH de 2 durante 24 horas. El análisis estadístico se realizó para cada parámetro mediante una prueba t de Student para muestras desapareadas. Las diferentes letras indican diferencias significativas con un $p < 0,05$. El experimento se realizó por sextuplicado.

Muestra	Peso seco (g/L)		Capacidad de remoción (q) (mg Cr total/g biomasa)	
	Promedio	SD	Promedio	SD
WT	0,46 ^a	0,00	71,25 ^a	1,14
CRS	0,43 ^a	0,01	71,62 ^a	5,58

Por último, se realizó un análisis de FTIR para estudiar la interacción del Cr (VI) con los grupos funcionales presentes en la pared celular durante los ensayos de remoción. En este caso, cultivos de una densidad celular de $2,4 \times 10^7$ células/mL fueron expuestos a 100 mg/L de Cr (VI) a dos pHs diferentes (6,8 y 2). En los Figura 3.44 se puede observar que

una remoción similar de cromo se correlacionó con espectros equivalentes en los dos experimentos. Esto sugiere que los grupos funciones de ambas cepas en condiciones experimentales de alta densidad celular y alta concentración del metal, responden de forma muy similar.

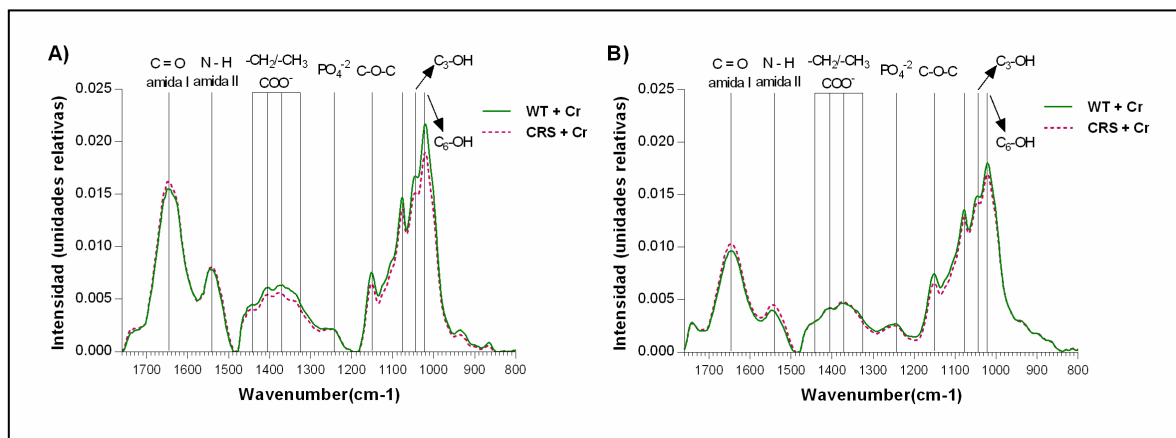


Figura 3.44. Efecto del cromo en la pared celular: Espectros del FTIR de los cultivos de WT y CRS luego de ser expuestos a 100 mg/L de Cr (VI) a pH de 6,8 durante 10 días (A) y a pH de 2 durante 24 horas (B). Las bandas asignadas fueron las siguientes: 1740 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$ ester de los lípidos, amida I $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{O})$ y amida II $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{N}-\text{H})$ corresponden a proteínas, $\sim 1455\text{ cm}^{-1}$ $\delta_{\text{as}}(-\text{CH}_2/-\text{CH}_3)$, $1370\text{-}1398\text{ cm}^{-1}$ $\delta_s(-\text{CH}_2/-\text{CH}_3)\nu_s(\text{COO}^-)$, 1240 cm^{-1} $\nu\text{P}=\text{O}$ de los fosfodiesteres de los ácidos nucleicos, $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la valencia y a la deformación de los anillos de los sacáridos (C-O, C-C, CH_2OH), específicamente 1150 cm^{-1} forma el estiramiento asimétrico de la unión glicosídica $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$ asignado a las vibraciones de C-3-O-3-H y C-6-H₂-O-6-H. La intensidad de los picos está expresada en unidades relativas. Cada espectro es el promedio de 3 pseudoréplicas y cada ensayo de FTIR fue realizado por triplicado.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1 Generación de la cepa resistente: efectos del cromo en el crecimiento y en la morfología

Numerosos metales, como el cromo, tienen efectos tóxicos en los organismos. Una manera de determinar dicha toxicidad es mediante el índice CI50. Este índice se define como la concentración del metal que reduce la tasa de crecimiento específica de la población en un 50% en un período corto de tiempo, generalmente 72 hs o 96 hs. Asimismo, la CI50 permite comparar la toxicidad de un metal entre diferentes especies de microalgas o de diferentes metales en una misma especie. En este trabajo se obtuvo una CI50-72hs para *S. dimorphus* (WT) de 1,80 mg/L de Cr (VI). En *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Dictyosphaerium chlorelloides*, ambas algas clorofitas al igual que *S. dimorphus*, se han reportado CI50 similares a la determinada en esta Tesis, siendo estas de 1,04 y 1,64 mg/L de Cr (VI), respectivamente (Giloni-Lima et al., 2010; Sanchez-Fortún et al., 2009). Adicionalmente, en estudios con dos cepas de *Scenedesmus* que fueron expuestas a Pb (II), Hg (II), As (III) y As (IV) se obtuvieron CI50 de 7,2 mg/L; 0,42 mg/L; 196,5 mg/L y 7,5 mg/L, respectivamente (Bahar et al., 2013; Wan Omar et al., 2017). Por lo tanto, si comparamos estos índices con el determinado para *S. dimorphus*, y haciendo la salvedad de posibles diferencias entre especies o cepas del mismo género, se podría concluir que la toxicidad de los metales para algas del género *Scenedesmus* sería en orden decreciente Hg (II) > Cr (VI) > Pb (II) > As (VI) > As (III).

Para el desarrollo de una tecnología de biorremediación de metales que utilice microalgas, resulta fundamental la comprensión del proceso, es decir obtener una caracterización de los efectos tóxicos provocados por el metal y los mecanismos de resistencia de las microalgas. En este contexto, se generó una cepa resistente de *S. dimorphus* mediante la exposición controlada a Cr (VI) durante 95 días (cepa CRS) y en simultáneo se mantuvo otro cultivo sin el metal (cepa WT). Inicialmente, la determinación

de la CI50 para la cepa *S. dimorphus* nos permitió seleccionar una concentración de Cr (VI) para la generación de la cepa resistente.

De esta manera, la elección de la concentración de Cr (VI) para el tratamiento, 1,3 mg/L, fue equivalente a la utilizada por el grupo de Corradi et al. (1995) para la generación de la cepa resistente a dicho metal (Corradi, Gorbi, Ricci, et al., 1995). Por otro lado, el período del experimento (95 días) es similar al reportado por Corradi (1995) y Pereira (2013), en los que generaron cepas resistentes de *Scenedesmus acutus* y *D. chlorelloides* a Cr (VI) y a Cr (III), respectivamente, siendo en ambos casos ensayos de 90 días de duración (Corradi, Gorbi, Ricci, et al., 1995; M. Pereira et al., 2013).

La resistencia de la cepa CRS fue evaluada en función del crecimiento mediante la exposición a 3 concentraciones de Cr (VI) durante 120 hs. Los resultados demostraron que el efecto del cromo es dosis-dependiente y, que la toxicidad del metal se incrementa conforme aumenta su concentración. Asimismo, la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación de CRS no se ven modificados por la presencia del metal, mientras que en la cepa WT ambos parámetros son afectados por el Cr (VI). Adicionalmente, si bien una dosis de 2,6 mg/L de Cr (VI) provocó una disminución de la proliferación en CRS, en la cepa WT tuvo un efecto citoestático, inhibiendo completamente su reproducción. De la misma manera, el análisis de viabilidad demostró que la tasa de mortalidad de la cepa CRS no se vio afectada por la exposición a 2,6 mg/L de Cr (VI), mientras que en la cepa WT ésta fue de un 13,51%. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Corradi et al. (1995) donde se comparó el efecto del Cr (VI) en una cepa de *S. acutus* con su respectivo control, cepa WT, y se observó que la cepa resistente puede crecer con concentraciones del metal que son letales para la cepa WT (Corradi, Gorbi, Ricci, et al., 1995).

Diferentes estudios demuestran que la resistencia adquirida tiene una base genética y que esos mecanismos se mantienen en el tiempo (Corradi, Gorbi, Ricci, et al., 1995; D'ors et al., 2010; Pereira et al., 2013; Sanchez-Fortún et al., 2009). En el trabajo de Corradi et al. (1995) se generó una cepa de *S. acutus* resistente a Cr (VI) en un período de 3 meses y se comprobó que la resistencia se mantuvo en la descendencia (Corradi, Gorbi,

Ricci, et al., 1995). Adicionalmente, dicha cepa fue utilizada a lo largo del tiempo en estudios posteriores del grupo de investigación (Cozza et al., 2016; Gorbi et al., 2006; Marieschi et al., 2015; Sardella et al., 2019). Incluso, en un trabajo reciente realizado en dicha cepa de *S. acutus* resistente a Cr (VI), se demostró el rol de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo y mantenimiento trans-generacional de la tolerancia adquirida al metal (Ferrari et al., 2020). De forma similar, en otros trabajos en los cuales se utilizó una cepa de *D. chlorelloides* resistente a Cr (III) y a Cr (VI), los autores concluyeron que la resistencia adquirida podría deberse a mutaciones ocurridas al azar y que además éstas son específicas al estado oxidativo del cromo, ya que la sensibilidad al Cr (III) y al Cr (VI) resultó ser diferente en cada cepa (D'ors et al., 2010; Pereira et al., 2013; Sanchez-Fortún et al., 2009). En concordancia con lo reportado, en esta Tesis la cepa CRS demostró un comportamiento robusto y consistente a lo largo de los años desde que fue generada en junio del 2017. Si bien la preservación de CRS es en ausencia del metal; no obstante, al ser expuesta al Cr (VI) siempre mostró un comportamiento consistente permitiendo la reproducibilidad de los resultados a lo largo del tiempo.

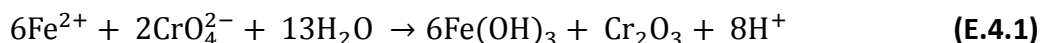
Una vez que se evaluó la resistencia de la cepa CRS, se estudiaron los efectos del Cr (VI) en la morfología de los cultivos y en la celular. Se observó que el metal produjo cambios en el tamaño y forma celular, las células aumentaron de tamaño y se deformaron redondeándose. Además, se pudo apreciar la presencia de numerosas vacuolas y vesículas cloroplásticas. En cuanto a los cultivos, los cenobios se desarmaron quedando las células individuales. Asimismo, se observaron colonias hijas y células “fantasmas”, siendo ambos indicios de división celular. En esta Tesis, estos cambios fueron más drásticos en la cepa WT, mientras que la cepa CRS mostró un menor grado de modificación, manteniendo una forma más similar a la típica de la especie. En concordancia con estos resultados, estudios previos en microalgas demostraron que el Cr (VI) produce cambios morfológicos, como el engrosamiento de la pared celular o el aumento en el número de vacuolas, entre otros (Corradi, Gorbi, & Bassi, 1995; Cozza et al., 2016; Pereira et al., 2013; Volland et al., 2012). Incluso, en el trabajo de Corradi et al. (1995) se reportó que la exposición a Cr (VI) induce la reproducción sexual de *S. acutus* (Corradi, Gorbi, & Bassi, 1995). Cabe destacar que el

aumento del tamaño celular acompañado de la presencia de colonias hijas en distintas fases de la mitosis es un indicio de que el metal generaría un arresto celular, ya que las células no pueden completar el ciclo de división celular. Esto mismo se observó en dos trabajos, uno con *Micrasterias denticulata* y otro con *S. acutus*, y ambos concluyen que el Cr (VI) produce la inhibición de la división celular (Cozza et al., 2016; Volland et al., 2012). Todos estos resultados evidencian que el cromo posee efectos deletéreos importantes sobre la estructura y división celular en algas.

Otra de las observaciones asociadas a los tratamientos con Cr (VI) fue la proliferación de vesículas autofágicas, particularmente en la cepa WT. La autofagia es un proceso en el que productos de desecho son almacenados en vesículas que luego son incorporadas en vacuolas, y donde los componentes tóxicos son degradados y los nutrientes esenciales son reciclados para un uso posterior (Bassham & Crespo, 2014; Heredia-Martínez et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2017). Bajo condiciones normales, las células tienen un nivel basal de autofagia; no obstante, en condiciones de estrés, este proceso de degradación de productos tóxicos o dañados aumenta para mantener la homeostasis celular (Heredia-Martínez et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2017). La autofagia se ha descrito previamente en plantas y ha sido asociada a diferentes tipos de estrés como la privación de nutrientes y el daño fotooxidativo, entre otros (Heredia-Martínez et al., 2018; Pérez-Pérez et al., 2012). Adicionalmente, este proceso ha sido muy estudiado en microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella sp.* y también en estos organismos está relacionado con diferentes condiciones que generan estrés, como el estrés oxidativo, la privación de nutrientes, el daño fotooxidativo, la exposición a elevadas irradiancias y la toxicidad de determinados metales, entre otros (Heredia-Martínez et al., 2018; Jiang et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2017; Pérez-Pérez et al., 2012). Por último, y en concordancia con los resultados de este trabajo, se ha reportado que la exposición de *Scenedesmus sp.* a diferentes metales como el Al y el Pb provocó un incremento en el número de vacuolas autofágicas (Ameri et al., 2020; Sicko-Goad & Lazinsky, 1983, 1986). Estos resultados permiten concluir que la autofagia es una respuesta común en organismos fotosintéticos ante la exposición a metales.

4.2 Efectos del Fe en la reducción del Cr (VI)

Previo a comenzar los experimentos para estudiar los efectos del Cr (VI) en la fisiología de las cepas WT y CRS, se comprobó la estabilidad del metal en el medio de cultivo BBM en un período de 72 hs. Se determinó que gran parte del Cr (VI) inicial se redujo a Cr (III) por su interacción con el Fe presente en el medio de cultivo BBM ($1,79 \times 10^{-5}$ M de Fe). Por esta razón, se decidió utilizar para los experimentos una concentración de Fe 4 veces menor que la del medio BBM (BBM-Fe: $4,48 \times 10^{-6}$ M de Fe) para minimizar la reducción del Cr (VI) y así evitar que se subestimen sus efectos tóxicos sobre las células. Kim et al. (2002) demostró que la presencia de Fe en forma de iones ferrosos producía una rápida reducción del Cr (VI) a Cr (III) y que, como consecuencia, esto provocaba una disminución de la toxicidad del Cr (VI) (Kim et al., 2002). En esta Tesis, la permanencia del Cr (VI) como tal fue afectada por el Fe presente en el medio BBM. La reducción del Cr (VI) cuando se encuentra como CrO_4^{2-} y es mediada por el Fe ocurre según la siguiente reacción (James et al., 1997; Kim et al., 2002):



En esta Tesis, además, se comprobó que el medio reducido en Fe (BBM-Fe) provocó una disminución en el crecimiento de las cepas WT y CRS. Sin embargo, se decidió utilizar este medio para los ensayos, con el objeto de garantizar que las células estuviesen expuestas a la concentración deseada de Cr (VI) durante todo el período del experimento, en lugar de a una mezcla de Cr (VI) y Cr (III) que fuese difícil de predecir y de determinar. El efecto de la disminución en la concentración de Fe asociada a la proliferación de las microalgas ha sido ampliamente estudiado (Abd El Baky et al., 2012; Ruangsomboon et al., 2013). Asimismo, muchos medios de cultivo utilizados para el crecimiento de microalgas tienen concentraciones de Fe similares o menores a la del BBM-Fe (Andersen, 2005), algunos de los cuales se pueden apreciar en la siguiente tabla (Tabla 4.1):

Tabla 4.1. Concentración de Fe (M) en distintos medios de cultivos para microalgas reportado por Andersen (2005) (Andersen, 2005).

Medio de cultivo	Concentración de Fe (M)	Proporción Fe del BBM-Fe/Fe del medio (X)
BBM-Fe	$4,48 \times 10^{-6}$	1,0
BG-11 modificado	$3,00 \times 10^{-5}$	6,7
Bold (Bold's Basal Medium: BBM)	$1,79 \times 10^{-5}$	4,0
C modificado	$2,15 \times 10^{-6}$	0,5
CA modificado	$1,00 \times 10^{-6}$	0,2
Chu #10	$4,93 \times 10^{-6}$	1,1
Half-Strength Chu #10	$2,47 \times 10^{-6}$	0,6
COMBO	$3,70 \times 10^{-6}$	0,8
Fraquil	$4,51 \times 10^{-7}$	0,1
WC	$1,17 \times 10^{-5}$	2,6
Bristol	0	0,0

4.3 Efectos del cromo en la fisiología y mecanismos de detoxificación de las cepas *wild type* (WT) y resistente (CRS)

Como se mencionó previamente en la sección 1.5, se ha reportado que el Cr (VI) provoca numerosos efectos adversos en las microalgas, como ejemplo se destaca que induce la generación de ROS y que afecta el cloroplasto y a la síntesis de pigmentos. Por esta razón, se evaluó el efecto del Cr (VI) en la fisiología de las cepas WT y CRS y en la sensibilidad de cada una de ellas al metal. Adicionalmente, se estudiaron algunos de los mecanismos que tienen estas cepas para lidiar con y/o evitar la toxicidad del Cr (VI).

4.3.1 Efecto del Cr (VI) en la generación de estrés oxidativo

Se estudió la generación de estrés oxidativo provocada por la exposición de las cepas WT y CRS a Cr (VI) mediante la determinación de la concentración de ROS. Se comprobó que la cepa WT presentó un incremento de un 50% en la producción de ROS cuando fue tratada con el metal, mientras que la cepa CRS mantuvo los niveles basales de ROS ante la presencia de Cr (VI). Estos resultados son consistentes con lo observado en numerosos trabajos, que reportaron un aumento de ROS en algas y en plantas asociado a la exposición a Cr (VI) (Gorbi et al., 2006; Joutey et al., 2015; Kováčik et al., 2015; Pinto et

al., 2003; Rai et al., 2013; Volland et al., 2012). Adicionalmente, el Cr (VI) afecta directamente al fotosistema II al inhibir la cadena transportadora de electrones, lo que promueve un aumento en la concentración del anión superóxido en el cloroplasto (Ali et al., 2008; Perreault et al., 2009; Rai et al., 2013; Volland et al., 2012). Por lo tanto, el hecho de que la cepa CRS no haya aumentado la concentración de ROS durante el tratamiento con Cr (VI) sugiere que posee mecanismos de detoxificación para lidiar con el estrés oxidativo provocado por el metal o que evita la generación excesiva de ROS. En concordancia con lo expuesto previamente, el estrés oxidativo activa los mecanismos de autofagia ya que las células necesitan degradar las moléculas dañadas por el incremento en la concentración de ROS (Bassham & Crespo, 2014; Pérez-Pérez et al., 2017; Pérez-Pérez et al., 2012). En la sección 4.1 se mencionó la presencia de vesículas autofágicas asociadas al tratamiento con Cr (VI), particularmente en la cepa WT, que podría estar relacionado a un proceso de autofagia desencadenado por el estrés oxidativo. Por lo descrito previamente, se puede afirmar que la cepa CRS presenta niveles basales de ROS, es decir similares al control, ante la exposición a Cr (VI) y que esto le confiere una mayor resistencia al metal en comparación con la cepa WT.

Para discernir si la mitigación del estrés oxidativo generado por la exposición a Cr (VI) ocurría a través de mecanismos enzimáticos o no enzimáticos se determinó la actividad de la enzima catalasa (CAT). La CAT es una enzima que juega un papel muy importante en el sistema de detoxificación de plantas y microalgas ya que degrada el H₂O₂, producto de la superóxido dismutasa (SOD), enzima que convierte rápidamente el anión superóxido a H₂O₂ (Rai et al., 2013). En el caso de las cepas WT y CRS no se observaron diferencias en la actividad de la CAT luego de un tratamiento de 120 hs con el metal. Estos resultados son consistentes con lo reportado para *M. denticulata*, la cual no presentó un cambio en la actividad enzimática luego de ser expuesta al Cr (VI) (Volland et al., 2012). Contrariamente, otros trabajos reportaron en *Scenedesmus quadricauda* y en *Chlorella vulgaris* un aumento en la actividad enzimática de la catalasa luego de un tratamiento con Cr (VI) durante 24 y 120 hs, respectivamente (Kováčik et al., 2015; Rai et al., 2013). Los resultados obtenidos con las cepas de *S. dimorphus* de este trabajo (WT y CRS), en

conjunto con los resultados obtenidos de los estudios realizados en *M. denticulata* y *S. quadricauda*, sugieren que la actividad CAT cuando las algas son expuestas a Cr (VI) es dependiente de la especie y de las condiciones particulares de cada ensayo, como la concentración y el tiempo de exposición al metal.

Finalmente, al analizar en conjunto los resultados obtenidos en esta sección (4.3.1), se puede concluir que la mitigación del estrés oxidativo en la cepa CRS al ser tratada con Cr (VI) se debe principalmente a algún tipo de mecanismo no enzimático, aunque no se puede descartar que otra/s enzima/s no evaluadas en esta Tesis tenga/n un rol en el desarrollo de resistencia. En línea con la hipótesis de una resistencia no enzimática, numerosos estudios reportan que la síntesis de compuestos como tioles no peptídicos, glutatión o cisteína (Gorbi et al., 2006; Kováčik et al., 2014; Volland et al., 2012), así como también fenoles (Kováčik et al., 2010, 2015), son en algunos casos el principal mecanismo para lidiar con el estrés generado por el Cr (VI).

4.3.2 Efecto del Cr (VI) en la acumulación de lípidos

Numerosos estudios demuestran que diferentes tipos de estrés, como la privación de nutrientes, la exposición a irradiancias elevadas, el estrés salino y el estrés oxidativo entre otros, provocan un aumento en la acumulación de lípidos en microalgas (Pancha et al., 2015; Yilancioglu et al., 2014; Zalogin & Pick, 2014; Zhang et al., 2019). En esta Tesis, se observó que, ante la exposición a Cr (VI), la cepa WT mostró un incremento en el contenido de lípidos, mientras que la cepa CRS mantuvo los niveles basales presentes en el control. Estos resultados son consistentes con el hecho de que la cepa WT tratada con el metal muestra un aumento del 50 % en la concentración de ROS, lo que sugiere una relación entre el estrés oxidativo producido por el Cr (VI) y el incremento en la concentración de lípidos. Una relación de ese tipo ha sido reportada previamente en microalgas (Pancha et al., 2015; Yilancioglu et al., 2014; Zhang et al., 2019). Por ejemplo, en un estudio realizado en una cepa de *Scenedesmus sp.* se comprobó que el aumento de ROS, inducido por estrés salino, provocó un incremento en la síntesis de lípidos (Pancha et al., 2015). Adicionalmente, en el trabajo de Yilancioglu et al. (2014) se demostró que en

Dunalliella salina el estrés generado por privación de nitrógeno y por la exposición a H₂O₂, ambos tratamientos inductores de la producción de ROS, produjeron un aumento de lípidos (Yilancioglu et al., 2014).

En lo que respecta al efecto de los metales en la acumulación de lípidos hay muy pocos estudios realizados en microalgas, pero en algunos de ellos se demostró que habría una relación entre el tratamiento con diferentes metales y el incremento en la acumulación de lípidos (Zhao et al., 2019). En *Chorella minutissima*, en *Nannochloropsis sp.* y en *Monoraphidium sp.* se observó que el tratamiento con Cu, Cd y As (III) indujo un incremento en el contenido de lípidos (Upadhyay et al., 2016; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2019). Sin embargo, cabe destacar que sólo en el trabajo realizado en *Nannochloropsis sp.* el aumento de los lípidos provocado por los metales fue asociado al estrés oxidativo causado por los mismos. Los resultados de esta Tesis están en concordancia con lo reportado previamente. Si bien no podemos descartar un efecto directo del Cr (VI) sobre los lípidos, el aumento de ROS en la cepa WT tratada con el metal sugiere que, en nuestras condiciones experimentales, el aumento de lípidos podría ocurrir como consecuencia del estrés oxidativo provocado por el metal. Además, nuestros resultados sugieren que, a diferencia de la cepa WT, la cepa CRS tiene mecanismos para mitigar el estrés oxidativo producido por el Cr (VI) y, de esta manera indirecta, evitar un aumento en la síntesis de lípidos desencadenado por dicho estrés.

El efecto de las ROS sobre la síntesis de lípidos, particularmente triglicéridos (TAGs), está bien documentada (Chouhan et al., 2020; Pancha et al., 2015; Shi et al., 2020; Yilancioglu et al., 2014). En el cloroplasto, cualquier alteración del balance entre el poder reductor generado por los fotosistemas y la fijación de carbono provoca un incremento de ROS. En esta situación, los equivalentes redox deben ser almacenados en moléculas estables e inofensivas para la célula, de modo de limitar el daño que pueden provocar los ROS. Si bien el almidón es una de las moléculas generadas, existe el consenso de que los TAGs son la principal molécula que se acumula en estas condiciones. La síntesis de ácidos grasos consume mucho poder reductor y, como consecuencia, la molécula de TAG (principal lípido de reserva de las algas verdes) posee más equivalentes redox que los

hidratos de carbono o las proteínas. En esta Tesis, debido al estrés oxidativo provocado por la exposición al Cr (VI) en la cepa WT, el exceso de equivalentes redox y el carbono podrían ser almacenados como TAGs.

4.3.3 Efectos del Cr (VI) en el cloroplasto: Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores

El cloroplasto es una de las organelas en donde se han reportado ampliamente los efectos del Cr (VI) en microalgas (Ali et al., 2008; Perreault et al., 2009; Rai et al., 2013; Rodríguez et al., 2007; Volland et al., 2012). Con el propósito de evaluar si existían diferencias en esta organela entre las cepas WT y CRS tratadas con Cr (VI), se realizaron dos análisis complementarios. Por un lado, el análisis de la absorción de la luz por el material particulado, el cual permite la observación *in vivo* de las células y el efecto sobre cloroplastos intactos. Por otra parte, la extracción, que permite observar efectos sobre el contenido de pigmentos. En esta Tesis, en ambos tipos de análisis se observaron cambios similares en los picos de pigmentos fotosintéticos. Esto sugiere que, en nuestras condiciones experimentales, los efectos principales del Cr (VI) se producen sobre el contenido de pigmentos y no sobre su distribución o empaquetamiento dentro del cloroplasto. Al analizar los espectros crudos, se observó una disminución de los pigmentos cuando las cepas fueron expuestas al metal. No obstante, al normalizar los espectros al pico rojo de clorofila *a* (665 nm), quedó en evidencia un aumento en los pigmentos accesorios (carotenoides) en los cultivos de ambas cepas tratados con Cr (VI). En estudios realizados en *M. denticulata* y en *C. reinhardtii* se observó mediante microscopía que el Cr (VI) produjo el deterioro en la estructura del cloroplasto (Rodríguez et al., 2007; Volland et al., 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que el Cr (VI) en *C. reinhardtii* y en *Chlorella spp.* provocó una disminución en la concentración de clorofila y también produjo un aumento relativo de carotenoides como el β -caroteno y las xantofilas (Ali et al., 2008; Hörcsik et al., 2006; Perreault et al., 2009; Rai et al., 2013; Rodríguez et al., 2007). Por lo tanto, los resultados de esta Tesis son consistentes con estudios previos sobre el efecto del Cr (VI) en los pigmentos del cloroplasto de las microalgas.

En la condición de luz más elevada (*Higher Light*) y tratamiento con el metal, la cepa CRS mostró un incremento más pronunciado en los carotenoides en presencia del metal que la cepa WT, en los espectros normalizados a la clorofila *a* (665 nm). Cabe destacar que en esta Tesis se pudieron diferenciar claramente 3 picos con máximos en 417 nm, 437 nm y 470 nm; y que se los puede adjudicar a la violaxantina ($\lambda_{\text{máx}}$: 415 nm, 436 nm, 466 nm), al β -caroteno ($\lambda_{\text{máx}}$: 470 nm) y a la feofitina *a* ($\lambda_{\text{máx}}$: 417 nm). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la cepa CRS es más eficiente en la acumulación de carotenoides que actúan como compuestos antioxidantes para así mitigar el estrés oxidativo provocado por el Cr (VI), lo que le confiere una clara ventaja adaptativa por sobre la cepa WT. En este sentido, es importante recordar que los carotenoides cumplen dos funciones, una es la de ampliar el rango de absorción de la radiación fotosintéticamente activa (PAR, según sus siglas en inglés) y la otra es la mitigación del estrés fotooxidativo (Juarez et al., 2008; Perreault et al., 2009; Rodríguez et al., 2007). Evidentemente, en esta Tesis, el aumento en el contenido de carotenoides se debe a la función de estos como mecanismo de detoxificación de las células algales.

Por otro lado, en el espectro normalizado a clorofila *a* (Figura 3.30 B) hay un aumento en el pico de 417 nm en los espectros de la cepa WT que puede deberse tanto a la violaxantina como a la feofitina *a*, debido a que sus espectros de absorción tienen un pico máximo a esa longitud de onda. No obstante, se ha reportado que el Cr (VI) induce la feofitinización de la clorofila *a*, es decir que la clorofila *a* pierde el átomo central de magnesio inhibiendo su función como pigmento fotosintético (Juarez et al., 2008; Rodríguez et al., 2007). Por lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta que los otros picos de la violaxantina (436 nm, 466 nm) no aumentan en los mismos espectros, en esta Tesis se sugiere que el aumento en el pico de 417 nm de la cepa WT expuesta a Cr (VI) se debe a la feofitina *a* y no al pico de 415 nm de la violaxantina. Este resultado es consistente con que macroscópicamente el cultivo de WT expuesto a Cr (VI) presentó una pérdida de la coloración, el cual es un indicio de degradación de la clorofila y refleja feofitinización.

Por último, en la condición de luz baja (*Lower Light*) los resultados mostraron que en la cepa CRS, al ser expuesta al Cr (VI) hubo una disminución de intensidad en todo el espectro. Por el contrario, en la cepa WT tratada con el metal el contenido de carotenoides fue similar a su respectivo control, aunque el espectro fue menor en la zona de 600-700 nm. Cuando los espectros fueron normalizados al pico de clorofila *a* (665 nm), el espectro de la cepa WT + Cr mostró un incremento relativo en los carotenoides, y en este caso la cepa CRS + Cr presentó un espectro similar al de su línea de base. No obstante, a pesar de que la cepa WT en la condición de luz baja (*Lower Light*) aumentó la acumulación de pigmentos accesorios, no le fue suficiente para mitigar los efectos adversos producidos por el Cr (VI), ya que no pudo reproducirse, mientras que el crecimiento de la cepa CRS no se vio afectado. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el comportamiento de los pigmentos fotoprotectores depende de las condiciones de cultivo. Como el aumento en el contenido de pigmentos podría explicar la mayor tolerancia al Cr (VI) de la cepa CRS en luz alta pero no explicaría por qué no pudo conferir tolerancia al metal en la cepa WT en luz baja, creemos que la acumulación de dichos pigmentos es una respuesta más, que puede contribuir en ciertas condiciones, pero que no sería suficiente para otorgar resistencia. Esto sugiere que la cepa CRS tiene mecanismos adicionales para evitar la toxicidad del metal y que su resistencia al Cr (VI) no está basada principalmente en la síntesis de carotenoides.

Asimismo, hay que considerar que el fotodaño aumenta con el incremento de la intensidad de luz (Baroli & Melis, 1996; Niyogi, 1999), con lo cual también podría haber un efecto combinado entre el estrés producido por la luz y el provocado por el Cr (VI). HL es una condición similar a la utilizada para generar la cepa CRS y, por ende, dicha cepa ha evolucionado durante todo el período de generación para responder al estrés provocado por el Cr (VI) en esas condiciones. Parte de dicha respuesta podría ser la acumulación de pigmentos protectores. En LL, el estrés foto-oxidativo es menor, con lo que se espera que la respuesta celular necesaria para tolerar la toxicidad del metal sea menor. En esta condición, se propone que la cepa CRS, adaptada a una condición más severa, se

comporta básicamente como su control sin Cr (VI), ya que crece normalmente sin necesidad de que se modifique el contenido de pigmentos protectores.

4.3.4 Efecto protector de los exudados

Uno de los mecanismos de defensa de las microalgas para evitar la toxicidad de los metales es la secreción de compuestos que puedan formar complejos con ellos, provocando la disminución en su biodisponibilidad (Corradi et al., 1998; Gorbi et al., 2004; Koukal et al., 2007; Paquet et al., 2015). En esta Tesis se evaluó el efecto de los exudados de las cepas WT y CRS generados por la exposición al Cr (VI). En el caso del exudado de la cepa WT, el mismo demostró ser citotóxico tanto para sí misma como para la cepa CRS, ya que inhibió el crecimiento de ambas. Contrariamente, el exudado de la cepa CRS tuvo un efecto protector en la cepa WT tratada con el metal, lo que sugiere que la cepa CRS libera algún compuesto o compuestos orgánicos que contribuye/n con la mitigación del efecto tóxico del cromo. En estudios realizados en *S. acutus*, se reportó que los exudados secretados por esta microalga, al ser expuesta a Cr (VI), le permitieron contrarrestar la inhibición del crecimiento provocada por el tratamiento con el metal (Corradi et al., 1998; Gorbi et al., 2004). Adicionalmente, en estos trabajos se comparó el efecto de dos exudados de *S. acutus*, uno de la cepa tolerante a Cr (VI) y otro de la cepa salvaje. Lo que observaron fue que el exudado de la cepa tolerante le confirió una mayor protección que el secretado por la cepa WT (Corradi et al., 1998; Gorbi et al., 2004), siendo estos resultados consistentes con lo reportado en esta Tesis. Asimismo, Koukal et al. (2007) y Paquet et al. (2015) demostraron que la secreción de compuestos orgánicos por parte de la microalga *P. subcapitata* generó una disminución en la toxicidad provocada por el Cd, el Cu, el Pb y el Zn (Koukal et al., 2007; Paquet et al., 2015). Aunque la caracterización de los exudados no estuvo incluida dentro de los objetivos de esta Tesis, nos enfocaremos en ella en el futuro.

La liberación de compuestos tóxicos por parte de la cepa WT sugiere que el estrés generado por el Cr (VI) en la misma es considerable, ya que las células secretan dichos compuestos, probablemente como respuesta para reducir su toxicidad en el interior

celular. Además, la secreción de dichos compuestos puede ser consecuencia del nivel avanzado de autofagia. Por el contrario, en esta Tesis se sugiere que la liberación de compuestos protectores por parte de la cepa CRS es indicativo de que el estrés intracelular debido al Cr (VI) es bajo o nulo, y que las células secretan dichos compuestos como parte de la resistencia genética adquirida, como respuesta para reducir la toxicidad del metal antes de que ingrese o afecte al interior celular.

4.4 Interacción del cromo con la pared celular y remoción del metal

La primera barrera con la que se enfrentan los metales es la pared celular de las microalgas. Por lo tanto, resulta fundamental comprender cómo interactúa el Cr (VI) con las macromoléculas que conforman la pared celular. Cabe destacar que durante los ensayos de toxicidad se observó que en las condiciones experimentales de baja densidad celular (1×10^5 células/mL), pH de 6,8 y 1,95 mg/L de Cr (VI), todo el cromo permaneció en el medio de cultivo y solamente un bajo porcentaje de éste, aproximadamente un 15%, fue reducido a Cr (III). Es decir, el metal no ingresó al interior celular y por lo tanto los efectos que provocó en las células y los mecanismos que se activaron para mitigar la toxicidad del Cr (VI) se debieron principalmente a su interacción con la pared celular.

4.4.1 Efecto del Cr (VI) en la pared celular

Las macromoléculas que constituyen la pared celular interactúan con los metales en solución, por lo que el FTIR es un análisis que nos permitió monitorear el comportamiento e interacción entre las células y los metales. Cabe mencionar que si bien la pared es la primera estructura celular con la que se encuentran los metales, y siempre se piensa de manera clásica como una barrera, esta no resulta inerte y los componentes que la constituyen reaccionan e interactúan con el ambiente extracelular. Por otra parte es de esperar que los cambios producidos por esta interacción en la pared celular se vean reflejados en el interior celular. En ausencia de Cr (VI), el análisis de FTIR evidenció espectros similares para las cepas WT y CRS, así como patrones equivalentes a los descritos previamente para otras microalgas (Giordano et al., 2001; Heraud et al., 2007).

Contrariamente, el tratamiento con Cr (VI) provocó una disminución en los picos de amida I y II, siendo esta reducción más pronunciada en la cepa WT. Estos resultados son consistentes con estudios en los que se observó que el Cr (VI) provoca una disminución en la concentración de proteínas (Rai et al., 1992; Vajpayee et al., 2000). Por otro lado, el tratamiento con Cr (VI) produjo, en ambas cepas, un incremento en la intensidad de los picos correspondientes a los carboxilatos y a los polisacáridos. Éste aumento en el pico de carboxilatos podría deberse a la reducción del Cr (VI) a Cr (III) mediada por los hidroxilos y carbonilos presentes en los polisacáridos, lo cual ha sido reportado previamente en microalgas (Han et al., 2007; Pagnanelli et al., 2013; Shen et al., 2013). Este proceso también se ha demostrado en biopolímeros (Lin & Wang, 2012; Park et al., 2007, 2008). En base a lo observado, en esta Tesis se propone que la oxidación de dichos grupos en la superficie celular podría desencadenar una reacción en cadena que genera un aumento en la concentración de ROS en la pared celular y que esto se traslada al interior celular. Aunque nuestros resultados mostraron que sólo una pequeña parte del Cr (VI) fue reducida, el incremento en los picos correspondientes a carboxilatos fue superior en la cepa WT. Por ende, teniendo en cuenta que las reacciones mediadas por radicales libres se propagan de forma exponencial, se propone que la oxidación de los polisacáridos afectó en mayor medida a la cepa WT, ya que la cepa CRS pudo mitigar el estrés oxidativo y/o evitar los efectos tóxicos del Cr (VI) de forma más eficiente. Esta idea está respaldada, como se menciona, por el aumento en la intensidad de los carboxilatos durante la exposición al metal, ya que la oxidación de los hidroxilos y carbonilos de los polisacáridos se vería reflejado de forma directa en un incremento de los carboxilatos. Futuros experimentos seguramente arrojarán luz sobre el rol de la pared celular en la generación de estrés oxidativo intracelular durante la exposición a cromo y otros metales tóxicos.

Cabe hacer la salvedad de que, al observar los aumentos mencionados al normalizar los espectros al pico de amida I, queda claro que el incremento de los carboxilatos no se debe a dichos grupos presentes en las proteínas. Por último, el aumento en la intensidad de los polisacáridos también pueda deberse, al menos en parte, a un incremento en la síntesis de esta macromolécula asociado a un engrosamiento de la

pared celular, lo cual ha sido descrito previamente como uno de los efectos del Cr (VI) en microalgas (Cozza et al., 2016; Pereira et al., 2013; Volland et al., 2012).

4.4.2 Remoción de cromo

Uno de los principales objetivos de esta Tesis fue generar una cepa resistente a Cr (VI) para evaluar su capacidad de remoción del metal del medio en el que se encuentra, como un cuerpo de agua o un efluente. En los ensayos en que se evaluó la toxicidad del Cr (VI) (secciones 3.4 a 3.12) se trabajó en condiciones fisiológicas y/o similares a la de generación de la cepa CRS, es decir, se utilizó una baja densidad celular inicial, una concentración del metal similar a la CI50 y un pH de 6,8. Para estudiar la remoción del metal, estas condiciones experimentales fueron modificadas con el fin de usar a las microalgas como un biosorbente. Brevemente, para los ensayos de remoción se aumentó la densidad celular y la concentración de Cr (VI) unas 240 veces y 51 veces, respectivamente. Además, se evaluó la biosorción de Cr (VI) a dos pHs diferentes, 6,8 y 2. Es importante destacar que el comportamiento del cromo dependerá principalmente de su estado de oxidación y del pH. En el caso del Cr (III) a pHs mayores a 5, éste puede unirse directamente a los grupos funcionales de la pared celular que están cargados de forma negativa (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Por otro lado, para el Cr (VI) se ha descrito que, a pHs superiores a 5, puede ser reducido a Cr (III) (Han et al., 2007) y luego adsorbido o puede ingresar directamente al interior celular a través de canales de sulfatos (Fernández et al., 2018; Joutey et al., 2015; Pradhan et al., 2017; Sardella et al., 2019). Contrariamente, a pHs menores a 5, el Cr (VI) es adsorbido a los grupos funcionales cargados positivamente o también puede ser reducido a Cr (III), permaneciendo unido a la pared celular, o puede ser desplazado por otros competidores nuevamente al medio de cultivo (Pagnanelli et al., 2013; Shen et al., 2013).

En el caso del ensayo realizado a pH 6,8 las cepas WT y CRS fueron expuestas al metal durante 10 días y se comprobó que no hubo remoción de cromo por ninguna de las 2 cepas. Este resultado era en parte esperable, ya que a pH de 6,8 las células presentan una carga superficial negativa al igual que el Cr (VI) que se encuentra como Cr_2O_7^- o CrO_4^- y

habría una repulsión electrostática entre las algas y el metal. Expresado de otra forma, a pHs superiores a 5, la mayoría de los sitios con propiedades ácido-base de la pared celular, como los hidroxilos, los carboxilos, y los aminos, que podrían interactuar con el metal se encuentran cargados de forma negativa (Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012). Sin embargo, cabe mencionar que luego de diez días de exposición al metal, se observó una reducción de Cr (VI) a Cr (III) de un 16% en ambas cepas, pero sin remoción de cromo. Esto indicaría que en las condiciones en las que se realizó el ensayo, el Cr (VI) se une a los grupos cargados positivamente, logra ser reducido por la biomasa, según los mecanismos explicados anteriormente, y luego es desplazado y/ desorbido para volver al medio de cultivo.

Por otro lado, en el ensayo realizado a pH 2, las cepas WT y CRS fueron expuestas al Cr (VI) durante 24 hs y presentaron una remoción del metal de aproximadamente 70%. Esta elevada eficiencia de biosorción se debe a que en las condiciones experimentales que se desarrolló el ensayo los grupos funcionales de la pared celular están cargados positivamente, pudiendo interactuar con el Cr (VI) que se mantiene en su forma aniónica como HCrO_4^- , Cr_2O_7^- o CrO_4^{2-} (Han et al., 2007; Pagnanelli et al., 2013; Pradhan et al., 2019; Yen et al., 2017). Adicionalmente, se observó que un 10% del metal que se encontraba en el medio estaba presente como Cr (III). Estos resultados son consistentes con estudios en los que se demostró que, posteriormente a la adsorción del Cr (VI) éste puede ser reducido a Cr (III). En este caso, el Cr (III) puede ser liberado nuevamente al medio de cultivo o puede quedar adsorbido y formar complejos con los grupos funcionales que permanecen cargados negativamente (Pagnanelli et al., 2013; Shen et al., 2013).

Por último, el hecho de que ambas cepas hayan tenido comportamientos similares en las condiciones de remoción ensayadas, indicaría que, si bien el Cr (VI) puede haber producido cambios en la superficie celular de manera diferencial entre WT y CRS (evidenciados por FTIR), la resistencia al metal no se habría generado en base a las capacidades adsorptivas de la misma.

Por último, la capacidad de remoción (q) es un índice que nos permite comparar la eficiencia de remoción de un metal en condiciones experimentales similares, pero usando diferentes cepas de microalgas. En este trabajo se obtuvo para ambas cepas un q de 71 mg de Cr/g de biomasa seca. En estudios realizados en condiciones similares a la de este trabajo, pH de 2 y con una concentración inicial de Cr (VI) de 100 mg/L, se reportaron valores de q para cepas de algas verdes *Chlorella miniata*, *C. minutissima*, *Pediastrum boryanum*, *Scenedesmus obliquus*, *C. vulgaris* y *C. reinhardtii* que se muestran en la Tabla 4.2 (Aksu et al., 1999; Arica et al., 2005; Çetinkaya Dönmez et al., 1999; Han et al., 2007; Ozer et al., 2012; Singh et al., 2012). Si comparamos los resultados de esta Tesis con los obtenidos en dichos trabajos, podemos afirmar que las cepas WT y CRS de *S. dimorphus* presentan, en condiciones experimentales similares, una capacidad de remoción de cromo bastante superior a la descrita para otras especies. De esta manera, se puede considerar a *S. dimorphus* como una especie de microalga muy interesante para estudios de biorremediación de Cr (VI).

Tabla 4.2. Capacidad de remoción (q) de Cr (VI) por diferentes especies de algas verdes.

Especie	Cr inicial	pH	q (mg/g)	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	100 mg/L	2	~11	(Arica et al., 2005)
<i>Chlorella miniata</i>	100 mg/L	2	~13	(Han et al., 2007)
<i>Chlorella minutissima</i>	100 mg/L	2	57,33	(Singh et al., 2012)
<i>Chlorella vulgaris</i>	100 mg/L	2	25,6	(Aksu et al., 1999)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	100 mg/L	2	15,6	(Çetinkaya Dönmez et al., 1999)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	100 mg/L	2	71	Este trabajo
<i>Pediastrum boryanum</i>	100 mg/L	2	~13	(Ozer et al., 2012)

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

5.1 Conclusiones

Los objetivos de la presente Tesis fueron generar una cepa de *S. dimorphus* resistente a Cr (VI), evaluar el efecto del Cr (VI) en ésta y estudiar los mecanismos de la cepa para mitigar la toxicidad del metal. Adicionalmente, se propuso estudiar la capacidad de la cepa para la remoción de Cr (VI) del medio. Por lo tanto, se abordaron estudios desde dos puntos de vista: uno enfocado en la fisiología de las células al ser expuestas al metal, y otro en el que se consideró a la biomasa algal como un biosorbente. A continuación, se describen los principales resultados y conclusiones de esta Tesis.

Inicialmente, en el desarrollo de esta Tesis, se generó una cepa resistente (**CRS**), la cual no mostró diferencias en su tasa de crecimiento cuando fue expuesta a una dosis de cromo (VI) de 1,3 mg/L. En las mismas condiciones, la proliferación de la cepa salvaje (**WT**) se vio marcadamente afectada por el tratamiento con el metal. Por lo tanto, la generación de la cepa CRS tuvo un efecto directo en su capacidad para crecer en presencia de concentraciones de Cr (VI) que fueron nocivas para la cepa WT.

En cuanto a la morfología, el Cr (VI) provocó cambios en la forma típica de la especie en ambas cepas, siendo estos más drásticos en la cepa WT. La cepa WT mostró claros síntomas de estrés, como deformación, disgregación de cenobios y signos severos de autofagia, mientras que la cepa CRS presentó signos muy leves de autofagia, en concordancia con una casi nula mortalidad celular.

En relación a lo expuesto se puede concluir que mediante el protocolo utilizado se obtuvo una cepa resistente que además de crecer en concentraciones de metal tóxicas para la cepa WT logró mantener una mejor morfología celular y de los cultivos.

En lo que respecta a la caracterización de las cepas, se comprobó que la cepa CRS no mostró signos de estrés cuando fue expuesta al Cr (VI), mientras que en la cepa WT se evidenció un incremento en la generación de ROS y en la síntesis de lípidos. Además, la

aparición de numerosas vesículas cloroplásticas y vacuolas, indicios de un proceso avanzado de autofagia, se relaciona directamente con el estrés oxidativo provocado por el metal. Asimismo, el tratamiento con Cr (VI) indujo una disminución en la absorción de la luz de las cepas WT y CRS, siendo más pronunciada en CRS y evidenciándose a nivel de clorofilas *a* y *b*. No obstante, la cepa CRS presentó un incremento relativo de los carotenoides cuando fue tratada con el metal, mientras que en la cepa WT hubo indicios de feofitinización de la clorofila. Estos resultados sugieren que, en la condición de luz más alta evaluada, los pigmentos protectores (carotenoides) podrían contribuir a la resistencia de la cepa CRS, mientras que la degradación de la clorofila producida en la cepa WT evidencia un efecto del estrés. Sin embargo, los resultados en la luz más baja evaluada evidencian que la respuesta de los pigmentos fotosintéticos al cromo es más compleja que lo anticipado y sugiere que el aumento de los carotenoides en la cepa CRS no conferiría *per se* resistencia.

En relación a los mecanismos para evitar la toxicidad del metal ambas cepas de *Scenedesmus dimorphus* (WT y CRS) excluyeron significativamente al Cr (VI) evitando su internalización. Sin embargo, la cepa CRS secretó compuestos que disminuyeron la toxicidad del metal, mientras que los compuestos secretados por la cepa WT fueron inhibitorios para ambas cepas. Por lo tanto, al evaluar todos estos resultados en conjunto, se concluye que la liberación de exudados que reducen la toxicidad del metal es probablemente uno de los mecanismos principales de resistencia al cromo de la cepa CRS. A futuro, la caracterización de la composición del exudado permitirá conocer la naturaleza de estos compuestos.

Por otro lado, los análisis de FTIR, evaluados en simultáneo con los resultados previos, nos permitieron presentar un modelo hipotético que explicaría como se produce el estrés oxidativo en el interior celular, siendo que el Cr (VI) no ingresa a las células. Nuevamente, es importante recordar que la pared celular no es inerte y que cualquier cambio en la superficie que afecte a su estructura se debería ver reflejado en las células. En esta Tesis, se propuso que la reducción del Cr (VI) a Cr (III) está mediada por los polisacáridos que están presentes en la pared celular. Los polisacáridos son moléculas

altamente reductoras y el Cr (VI) es un agente oxidante, con lo cual es de esperarse que la interacción entre ambas moléculas se vea reflejada en el interior celular. La oxidación de los polisacáridos de la superficie celular es mayor en la cepa WT que en la CRS. En esta Tesis proponemos que la oxidación de los polisacáridos de pared produce una cascada de ROS que se transmite desde la superficie hasta el interior celular. A pesar de que sólo una pequeña proporción del cromo parece seguir esta ruta, las consecuencias para la cepa WT son severas, mientras que la cepa CRS puede mitigar sus efectos de manera mucho más eficiente.

Por último, el principal objetivo de generar una cepa resistente a un metal es utilizarla en procesos de biorremediación. En este caso, no hubo biosorción de Cr (VI) por parte de ninguna de las dos cepas en condiciones en las que el pH fue de 6,8. Contrariamente, se observó que un pH de 2 promovió la remoción del metal en las cepas WT y CRS, pero en este caso, ambas presentaron una eficiencia de biosorción equivalente. Por lo tanto, aunque la resistencia mejoró la *performance* de la cepa, esto no se vio reflejado en un aumento de su capacidad de remoción de Cr (VI) del medio. De manera más general, en esta Tesis se comprobó que la generación de cepas resistentes no necesariamente conlleva un aumento en la eficiencia de remoción. Desde el punto de vista energético, esto probablemente se deba a que a las células les resulta más eficiente evitar la toxicidad de los metales excluyéndolos al medio extracelular. Cabe recordar que la generación de cepas resistentes mediante una presión de selección prolongada en el tiempo es un proceso estocástico, siendo imposible predecir el resultado.

Como conclusión general, en esta Tesis se demostró que en una cepa de *S. dimorphus* sometida a una exposición prolongada a Cr (VI) se generó resistencia a dicho metal principalmente a través de la secreción de sustancias que reducen la toxicidad del mismo y respondiendo al estrés oxidativo generado por el metal, en combinación con una habilidad *natural* de la cepa original de excluir la mayor parte del metal. Como se dijo anteriormente, debido a la elevada toxicidad del Cr (VI), probablemente sea más seguro y eficiente para la célula mantener al metal en el exterior celular. Esto plantea una desafortunada consecuencia para la biorremediación, ya que la tolerancia no garantiza la

remoción del metal de una fuente contaminada. En casos como este, cuando la biorremediación no puede lograrse *in vivo*, utilizar la biomasa como biosorbente a bajo pH es una alternativa apropiada.

Por otra parte, como es poco probable que la estrategia de exclusión sea 100% efectiva y, por ende, algo de cromo ingrese a la célula, es probable que este mecanismo no sea capaz de conferir resistencia por sí solo. En este contexto, la respuesta a los efectos generales del estrés oxidativo generado por el metal que ingresa o que genera una cascada de ROS parece ser una estrategia complementaria apropiada. En todos los sistemas químicos celulares (procariotas y eucariotas), muchos tipos de estímulos estresantes confluyen en la generación de ROS. Por ello, la respuesta al estrés oxidativo es también un proceso eficiente para reducir los daños, ya que constituye un mecanismo general que la cepa puede utilizar en caso de verse expuesta en otro momento a otras fuentes de estrés con efectos similares. En este sentido, la tolerancia a cromo en la cepa CRS se presenta como un proceso complejo que comienza en la superficie celular e involucra varios frentes de acción, tanto naturales como adquiridos.

En el siguiente esquema se representa el modelo propuesto en esta Tesis de la interacción del Cr (VI) con las cepas WT y CRS (Figura 5.1).

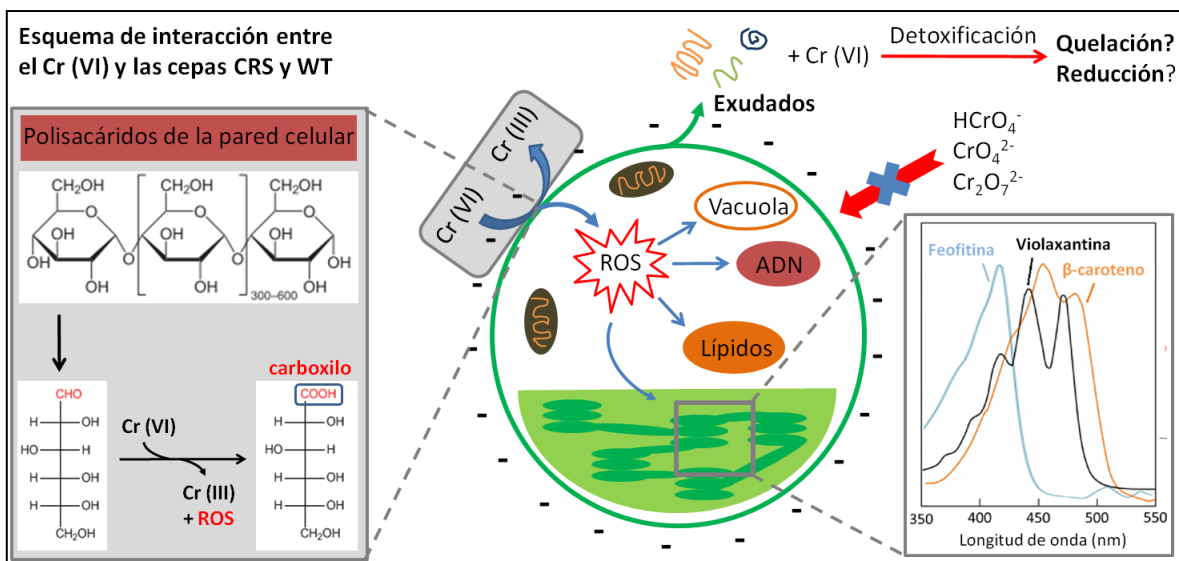


Figura 5.1. Modelo de la interacción entre el Cr (VI) y las cepas WT y CRS. La primera barrera con la que se enfrenta el Cr (VI) es la pared celular. Cuando el Cr (VI) se encuentra como hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}), o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), la pared celular, que presenta carga superficial neta negativa, ejerce fuerzas repulsivas sobre estas especies. En esta Tesis, se demostró que, a pH fisiológico, no se produce una internalización significativa del cromo del medio ni una adsorción del Cr (VI). Sin embargo, el Cr (VI) puede ser reducido a Cr (III) por polisacáridos presentes en la pared celular. Como contraparte de esta reducción, los hidroxilos y carbonilos de los polisacáridos se oxidan a carboxilatos. En esta Tesis se mostró que este proceso podría ocurrir en mayor medida en la cepa WT y se propone que la reducción del Cr (VI) ocurrida en la superficie celular provoca una reacción en cadena que inicia una cascada de ROS en el interior celular. Un aumento en la generación de ROS provoca un aumento en el contenido de lípidos e inician un proceso de autofagia que se ve reflejado en la degradación del cloroplasto y en un incremento en el número de vacuolas. Por otro lado, además puede provocar la oxidación de lípidos polares (relacionados con la fluidez de la membrana oxidando ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS)). Una de las respuestas que podría mitigar los efectos de los ROS es el aumento en el contenido de carotenoides, pero en las condiciones experimentales de esta Tesis dicha respuesta no puede explicar la resistencia de la cepa CRS ni conferir tolerancia a la cepa WT. Sin embargo, la cepa CRS es de alguna manera capaz de reducir la generación de ROS y sus efectos, evidenciado por el contenido de lípidos y la morfología celular. Dichas diferencias con la cepa WT, de carácter probablemente genético como consecuencia del proceso de generación de la cepa, sí pueden explicar la resistencia al Cr (VI), ya que la reducción de la autofagia posee efectos sobre la proliferación celular. Además, la cepa CRS secreta compuestos protectores que contribuyen considerablemente a la resistencia mediante mecanismos de detoxificación, que pueden incluir la quelación y la reducción. En esta Tesis se propone que la secreción de dichos exudados es también parte de la resistencia genética generada, ya que la cepa WT secreta compuestos tóxicos al ser expuesta a Cr (VI), probablemente como respuesta para tratar de reducir su concentración en el interior celular.

Finalmente, esta Tesis ha sido una contribución al campo de la biorremediación de metales, ya que aporta al conocimiento sobre los mecanismos, naturales y potencialmente adquiribles, presentes en las microalgas para mitigar los efectos tóxicos de los metales y para la remoción de los mismos. Además, para el Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, lugar donde fue desarrollada esta Tesis, los resultados obtenidos abren perspectivas interesantes para trabajos futuros relacionados con el tratamiento de efluentes contaminados con metales.

5.2 Perspectivas a futuro

Durante el desarrollo de esta Tesis se han generado nuevas preguntas e hipótesis. Con respecto a la caracterización de la interacción del Cr (VI) con las células algales, consideramos que se requieren de más experimentos para dilucidar completamente los procesos que ocurren ante la exposición al metal. Resulta fundamental una buena comprensión de los mecanismos para proponer una tecnología de biorremediación por microalgas. Puntualmente, en base a las conclusiones de esta Tesis, podemos decir que sería muy relevante caracterizar los exudados de las microalgas cuando son expuestas al metal y su capacidad para disminuir la toxicidad de los mismos.

En cuanto al proceso de remoción de Cr (VI) usando microalgas es importante realizar estudios en soluciones complejas que sean similares a un efluente real. De acuerdo a esto, se debería evaluar la biosorción del Cr (VI) ante la presencia de otros metales y compuestos que pudiesen estar presentes en los desechos industriales y domésticos. La eficiencia de remoción de las microalgas, vivas o muertas, dependerá directamente de la especie utilizada, de las variables fisicoquímicas del efluente y de la presencia de otros contaminantes. Estos estudios son muy relevantes debido al nivel de degradación del medioambiente provocado por desechos de origen antropogénico. A pesar de que hay algunas industrias que han mejorado el tratamiento de los efluentes que liberan al medioambiente, muchas otras no cumplen con las normas que regulan los niveles de descarga permitidos. Actualmente existen numerosos suelos y cuerpos de agua

con elevados niveles de contaminación para los que se requiere tratamientos eficientes. En este sentido, avanzar en el campo de la biorremediación, en complementación con técnicas de remediación tradicionales, es una prioridad a nivel mundial.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- Abd El Baky, H. H., El-Baroty, G. S., Bouaid, A., Martinez, M., & Aracil, J. (2012). Enhancement of lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus* by optimizing CO₂ and Fe³⁺ levels for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *119*, 429–432.
- Abigail, E. A., Samuel, M. S., & Chidambaram, R. (2014). Hexavalent chromium biosorption studies using *Penicillium griseofulvum* MSR1 a novel isolate from tannery effluent site: Box-Behnken optimization, equilibrium, kinetics and thermodynamic studies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *49*, 1–9.
- Aksu, Z., & Balibek, E. (2007). Chromium(VI) biosorption by dried *Rhizopus arrhizus*: Effect of salt (NaCl) concentration on equilibrium and kinetic parameters. *Journal of Hazardous Materials*, *145*, 210–220.
- Aksu, Z. (2001). Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature. *Separation and Purification Technology*, *21*, 285–294.
- Aksu, Z. (2002). Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel(II) ions onto *Chlorella vulgaris*. *Process Biochemistry*, *38*, 89–99.
- Aksu, Zümriye, Açikel, Ü., & Kutsal, T. (1999). Investigation of simultaneous biosorption of copper(II) and chromium(VI) on dried *Chlorella vulgaris* from binary metal mixtures: Application of multicomponent adsorption isotherms. *Separation Science and Technology*, *34*(3), 501–524.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, *91*, 869–881.
- Ali, N. A., Juneau, P., Didur, O., Perreault, F., & Popovic, R. (2008). Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophyll- deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research*, *95*, 45–53.
- Ameri, M., Baron-Sola, A., Khavari-Nejad, R. A., Soltani, N., Najafi, F., Bagheri, A., Martinez, F., & Hernández, L. E. (2020). Aluminium triggers oxidative stress and antioxidant response in the microalgae *Scenedesmus sp.* *Journal of Plant Physiology*, 1–31.
- American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (1999). *Standard methods for the examination of water and wastewater*.
- Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier.
- Arauzo, M., Rivera, M., Valladolid, M., Noreña, C., & Cedenilla, O. (2003).

Contaminación por cromo en el agua intersticial, en el agua del cauce y en los sedimentos del río Jarama. *Limnetica*, 22, 85–98.

Arica, M. Y., Tüzün, I., Yalçın, E., Ince, Ö., & Bayramoğlu, G. (2005). Utilisation of native, heat and acid-treated microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* preparations for biosorption of Cr(VI) ions. *Process Biochemistry*, 40, 2351–2358.

Aslam, S., & Yousafzai, A. M. (2017). Chromium toxicity in fish: A review article. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1483–1488.

Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR). (2012). *Medición del estado del agua superficial y subterránea: Análisis e interpretación de los resultados*.

Autoridad de Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR). (2017). *Informe de Gestión 2017*.

Bahar, M. M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2013). Toxicity, transformation and accumulation of inorganic arsenic species in a microalga *Scenedesmus sp.* isolated from soil. *Journal of Applied Phycology*, 25, 913–917.

Bai, S., & Abraham, T. E. (2001). Biosorption of Cr (VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*. *Bioresource Technology*, 79, 73–81.

Baroli, I., & Melis, A. (1996). Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta*, 198, 640–646.

Baselga-Cervera, B., Romero-López, J., García-Balboa, C., Costas, E., & López-Rodas, V. (2018). Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas sp.* (ChISP strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–16.

Bassham, D. C., & Crespo, J. L. (2014). Autophagy in plants and algae. *Frontiers in Plant Science*, 5(679), 1–2.

Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., & Falkowski, P. G. (1989). Photoadaptation and the “package” effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25, 70–78.

Cabatingan, L. K., Agapay, R. C., Rakels, J. L. L., Ottens, M., & van der Wielen, L. A. M. (2001). Potential of biosorption for the recovery of chromate in industrial wastewaters. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40, 2302–2309.

Cainelli, G., & Cardillo, C. (1994). *Chromium oxidations in organic chemistry*. Springer-Verlag.

Ceballos, E., Bea, S., García Einschalg, F., & Sancí, R. (2016). Especiación y movilidad del cromo en aguas subterráneas contaminadas de un sector de la cuenca del río Matanza-Riachuelo, Buenos Aires, Argentina. *IX Congreso Argentino de Hidrogeología*

y VII Seminario Hispano-Latinoamericano Sobre Temas Actuales de La Hidrología Subterránea, 193–199.

Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*, 335–347.

Çetinkaya Dönmez, G., Aksu, Z., Öztürk, A., & Kutsal, T. (1999). A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*, *34*, 885–892.

Chandra, P., & Kulshreshtha, K. (2004). Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *The Botanical Review*, *70*(3), 313–327.

Cheng, H., Zhou, T., Li, Q., Lu, L., & Lin, C. (2014). Anthropogenic chromium emissions in China from 1990 to 2009. *PLoS ONE*, *9*(2), 1–9.

Chouhan, N., Devadasu, E. R., Yadav, R. M., & Subramanyam, R. (2020). Autophagy induced accumulation of lipids in pgr1 and pgr5 of *Chlamydomonas reinhardtii* under high light 2 3. *BioRxiv*, 1–41.

Corradi, M. G., Gorbi, G., Abd-El-Monem, H. M., Torelli, A., & Bassi, M. (1998). Exudates from the wild type and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* influence differently Cr (VI) toxicity to algae. *Chemosphere*, *37*, 3019–3025.

Corradi, M. Grazia, & Gorbi, G. (1993). Chromium toxicity on two linked trophic levels II. Morphophysiological effects on *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *25*, 72–78.

Corradi, M. Grazia, Gorbi, G., & Bassi, M. (1995). Hexavalent chromium induces gametogenesis in the freshwater alga *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *30*, 106–110.

Corradi, M. Grazia, Gorbi, G., Ricci, A., Torelli, A., & Bassi, M. (1995). Chromium-induced sexual reproduction gives rise to a Cr-tolerant progeny in *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *32*, 12–18.

Cozza, D., Torelli, A., Veltri, A., Ferrari, M., Marieschi, M., & Cozza, R. (2016). Ultrastructural features, chromium content and in situ immunodetection of 5-methyl-cytosine following Cr (VI) treatment in two strains of *Scenedesmus acutus* M. (Chlorophyceae) with different chromium sensitivity. *European Journal of Phycology*, *51*, 294–306.

Crini, G., & Lichtfouse, E. (2019). Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters*, *17*, 145–155.

D'ors, A., Pereira, M., Bartolomé, M. C., López-Rodas, V., Costas, E., & Sánchez-Fortún, S. (2010). Toxic effects and specific chromium acquired resistance in selected

strains of *Dyctiosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere*, *81*, 282–287.

Dayan, A. D., & Paine, A. J. (2001). Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Human & Experimental Toxicology*, *20*, 439–451.

Dönmez, G., & Aksu, Z. (2002). Removal of chromium(VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochemistry*, *38*, 751–762.

Dwivedi, S., Srivastava, S., Mishra, S., Kumar, A., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Dave, R., Tripathi, P., Charkrabarty, D., & Trivedi, P. K. (2010). Characterization of native microalgal strains for their chromium bioaccumulation potential: Phytoplankton response in polluted habitats. *Journal of Hazardous Materials*, *173*, 95–101.

Elahi, A., Arooj, I., Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2020). Successive use of microorganisms to remove chromium from wastewater. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, pp. 1–15).

Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II* (pp. 57–72). Humana Press.

Falkowski, P. G., & LaRoche, J. (1991). Acclimatation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology*, *27*, 8–14.

Fernández, P. M., Viñarta, S. C., Bernal, A. R., Cruz, E. L., & Figueroa, L. I. C. (2018). Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere*, *208*, 139–148.

Ferrari, M., Torelli, A., Marieschi, M., & Cozza, R. (2020). Role of DNA methylation in the chromium tolerance of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae) and its impact on the sulfate pathway regulation. *Plant Science*, *301*, 1–13.

Ferraro, G., Toranzo, R. M., Castiglioni, D. M., Lima, E., Vasquez Mansilla, M., Fellenz, N. A., Zysler, R. D., Pasquevich, D. M., & Bagnato, C. (2018). Zinc removal by *Chlorella* sp. biomass and harvesting with low cost magnetic particles. *Algal Research*, *33*, 266–276.

Gabr, R. M., Gad-Elrab, S. M. F., Abskharon, R. N. N., Hassan, S. H. A., & Shoreit, A. A. M. (2009). Biosorption of hexavalent chromium using biofilm of *E. coli* supported on granulated activated carbon. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*, 1695–1703.

Giloni-Lima, P. C., Delello, D., Cremonez, M. L. M., Éler, M. N., Lima, V. A., & Espíndola, E. L. G. (2010). A study of the effects of chromium exposure on the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) hindak evaluated by central composite design and response surface methodology. *Ecotoxicology*, *19*, 1095–1101.

- Giordano, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B., & McNaughton, D. (2001). Fourier Transform Infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, *37*, 271–279.
- Gorbi, G., Corradi, M. G., Invidia, M., & Bassi, M. (2001). Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Ecotoxicology and Environmental Safety Environ Safety*, *48*, 36–42.
- Gorbi, Gessica, Invidia, M., Zanni, C., Torelli, A., & Corradi, M. G. (2004). Bioavailability, bioaccumulation and tolerance of chromium: Consequences in the food chain of freshwater ecosystems. *Annali Di Chimica*, *94*, 505–513.
- Gorbi, Gessica, Torricelli, E., Pawlik-Skowrońska, B., Sanità di Toppi, L., Zanni, C., & Corradi, M. G. (2006). Differential responses to Cr(VI)-induced oxidative stress between Cr-tolerant and wild-type strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquatic Toxicology*, *79*, 132–139.
- Gorbi, Gessica, Zanni, C., & Corradi, M. G. (2007). Sulfur starvation and chromium tolerance in *Scenedesmus acutus*: A possible link between metal tolerance and the regulation of sulfur uptake/assimilation processes. *Aquatic Toxicology*, *84*, 457–464.
- Guillén-Jiménez, F. D. M., Netzahuatl-Muñoz, A. R., Morales-Barrera, L., & Cristiani-Urbina, E. (2009). Hexavalent chromium removal by *Candida sp.* in a concentric draft-tube airlift bioreactor. *Water, Air, and Soil Pollution*, *204*, 43–51.
- Gunatilake SK. (2015). Methods of removing heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science Studies (JMESS)*, *1*, 12–18.
- Gupta, V. K., & Rastogi, A. (2008). Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by nonliving algal biomass *Oedogonium sp.* from aqueous phase. *Journal of Hazardous Materials*, *153*, 759–766.
- Han, X., Wong, Y. S., Wong, M. H., & Yee Tam, N. F. (2007). Biosorption and bioreduction of Cr (VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *Journal of Hazardous Materials*, *146*, 65–72.
- Heraud, P., Wood, B. R., Beardall, J., & McNaughton, D. (2007). Probing the influence of the environment on microalgae using Infrared and Raman Spectroscopy. *ACS Symposium Series*, *963*, 85–106.
- Heredia-Martínez, L. G., Andrés-Garrido, A., Martínez-Force, E., Pérez-Pérez, M. E., & Crespo, J. L. (2018). Chloroplast damage induced by the inhibition of fatty acid synthesis triggers autophagy in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology*, *178*, 1112–1129.
- Hörcsik, Z., Oláh, V., Balogh, Á., Mészáros, I., Simon, L., & Lakatos, G. (2006). Effect of

Chromium (VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biologica Szegediensis*, 50, 19–23.

Jácome-Pilco, C. R., Cristiani-Urbina, E., Flores-Cotera, L. B., Velasco-García, R., Ponce-Noyola, T., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2009). Continuous Cr(VI) removal by *Scenedesmus incrassatulus* in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 100, 2388–2391.

James, B. R., Petura, J. C., Vitale, R. J., & Mussoline, G. R. (1997). Oxidation-reduction chemistry of chromium: Relevance to the regulation and remediation of chromate-contaminated soils. *Journal of Soil Contamination*, 6(6), 569–580.

Jiang, Q., Zhao, L., Dai, J., & Wu, Q. (2012). Analysis of autophagy genes in microalgae: *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy. *PLoS One*, 7(7), e41826.

Jobby, R., Jha, P., Yadav, A. K., & Desai, N. (2018). Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: A comprehensive review. *Chemosphere*, 207, 255–266.

Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., & Ghachtouli, N. El. (2015). Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 233, pp. 45–69). Springer.

Juarez, A. B., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Vesentini, N., Conforti, V., & Gualtieri, P. (2008). In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. *Journal of Environmental Monitoring*, 10, 1313–1318.

Kang, K.-S., Lim, C.-J., Hart, T.-J., Kim, J.-C., & Jin, C.-D. (1999). Changes in the isozyme composition of antioxidant enzymes in response to aminotriazole in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 42(3), 187–193.

Kaplan, D. (2013). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (Second Ed., pp. 602–611). John Wiley & Sons.

Kaplan, D., Christiaen, D., & Arad, S. M. (1987). Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2953–2956.

Khambhaty, Y., Mody, K., Basha, S., & Jha, B. (2009). Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Journal*, 145, 489–495.

Kim, S. D., Park, K. S., & Gu, M. B. (2002). Toxicity of hexavalent chromium to *Daphnia magna*: influence of reduction reaction by ferrous iron. *Journal of Hazardous*

Materials, 93, 155–164.

Kirk, J. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press.

Kirk, J. T. O. (1975). A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters I. General treatment of suspensions of pigmented cells. *New Phytologist*, 11–20.

Kotás, J., & Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, 107, 263–283.

Koukal, B., Rossé, P., Reinhardt, A., Ferrari, B., Wilkinson, K. J., Loizeau, J. L., & Dominik, J. (2007). Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. *Water Research*, 41, 63–70.

Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., & Klejdus, B. (2014). Hexavalent chromium damages chamomile plants by alteration of antioxidants and its uptake is prevented by calcium. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 110–117.

Kováčik, J., Babula, P., Hedbavny, J., Kryštofová, O., & Provazník, I. (2015). Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere*, 120, 23–30.

Kováčik, J., Klejdus, B., & Bačkor, M. (2010). Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. *Photochemistry and Photobiology*, 86, 612–616.

Kumar, K. S., Dahms, H., Won, E., Lee, J., & Shin, K.-H. (2015). Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329–352.

Lee, R. E. (2018). *Phycology*. Cambridge University Press.

Lin, Y. C., & Wang, S. L. (2012). Chromium (VI) reactions of polysaccharide biopolymers. *Chemical Engineering Journal*, 181–182, 479–485.

Losi, M. E., Amrhein, C., & Frankenberger, W. T. (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 91–121.

Loukidou, M. X., Zouboulis, A. I., Karapantsios, T. D., & Matis, K. A. (2004). Equilibrium and kinetic modeling of chromium(VI) biosorption by *Aeromonas caviae*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 242, 93–104.

Marieschi, M., Gorbi, G., Zanni, C., Sardella, A., & Torelli, A. (2015). Increase of chromium tolerance in *Scenedesmus acutus* after sulfur starvation: Chromium uptake and compartmentalization in two strains with different sensitivities to Cr(VI). *Aquatic Toxicology*, 167, 124–133.

Megharaj, M., Avudainayagam, S., & Naidu, R. (2003). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Current Microbiology*, *47*, 51–54.

Mishra, S., & Bharagava, R. N. (2016). Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *Journal of Environmental Science and Health - Part C*, *34*, 1–32.

Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, *155*, 330–333.

Mitchell, B. G. (1990). Algorithms for determining the absorption coefficient for aquatic particulates using the quantitative filter technique (QFT). In *Ocean optics X* (pp. 137–148). International Society for Optics and Photonics.

Mitchell, B., Kahru, M., Wieland, J., & Stramska, M. (2003). Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples. In *Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation* (pp. 231–257).

Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, *28*(2), 299–311.

Morel, A., & Bricaud, A. (1981). Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 1375–1393.

Mungasavalli, D. P., Viraraghavan, T., & Jin, Y. C. (2007). Biosorption of chromium from aqueous solutions by pretreated *Aspergillus niger*: Batch and column studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *301*, 214–223.

Myklestad, S. M. (1995). Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *The Science of the Total Environment*, *165*, 155–164.

Nacorda, J. O. O., Martinez-Goss, M. R., & Torreta, N. K. (2010). Bioremoval and bioreduction of chromium (VI) by the green microalga, *Chlorella vulgaris* Beij., isolated from Laguna de Bay, Philippines. *Philippine Journal of Science*, *139*(2), 181–188.

Nagalakshmi, N., & Prasad, M. N. V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, *160*, 291–299.

Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches.

Annual Review of Plant Physiology, 50, 333–359.

Novák, Z., Harangi, S., Baranyai, E., Gonda, S., B-Béres, V., & Bácsi, I. (2020). Effects of metal quantity and quality to the removal of zinc and copper by two common green microalgae (Chlorophyceae) species. *Phycological Research*, 68, 227–235.

OECD. (2006). *OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test.*

Özer, A., & Özer, D. (2003). Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: Determination of biosorption heats. *Journal of Hazardous Materials*, 219–229.

Ozer, T. B., Erkaya, I. A., Udoh, A. U., Duygu, D. Y., Akbulut, A., Bayramoglu, G., & Arica, M. Y. (2012). Biosorption of Cr(VI) by free and immobilized *Pediastrum boryanum* biomass: Equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 2983–2993.

Pagnanelli, F., Jbari, N., Trabucco, F., Martínez, M. E., Sánchez, S., & Toro, L. (2013). Biosorption-mediated reduction of Cr (VI) using heterotrophically-grown *Chlorella vulgaris*: Active sites and ionic strength effect. *Chemical Engineering Journal*, 231, 94–102.

Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., & Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341–348.

Paquet, N., Lavoie, M., Maloney, F., Duval, J. F. L., Campbell, P. G. C., & Fortin, C. (2015). Cadmium accumulation and toxicity in the unicellular alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Influence of metal-binding exudates and exposure time. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(7), 1524–1532.

Park, D., Lim, S. R., Yun, Y. S., & Park, J. M. (2007). Reliable evidences that the removal mechanism of hexavalent chromium by natural biomaterials is adsorption-coupled reduction. *Chemosphere*, 70(2), 298–305.

Park, D., Yun, Y. S., & Park, J. M. (2008). XAS and XPS studies on chromium-binding groups of biomaterial during Cr(VI) biosorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 317, 54–61.

Peña-Castro, J. M., Martínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2004). Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress. *Chemosphere*, 57, 1629–1636.

Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64, 1–10.

Pereira, M., Bartolomé, M. C., & Sánchez-Fortún, S. (2013). Bioadsorption and

bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere*, *93*, 1057–1063.

Pereira, Y., Lagniel, G., Godat, E., Baudouin-Cornu, P., Junot, C., & Labarre, J. (2008). Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicological Sciences*, *106*(2), 400–412.

Pérez-Pérez, M. E., Couso, I., Heredia-Martínez, L. G., & Crespo, J. L. (2017). Monitoring autophagy in the model green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells*, *6*(4), 1–11.

Pérez-Pérez, María Esther, Lemaire, S. D., & Crespo, J. L. (2012). Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiology*, *160*, 156–164.

Pérez, G. L., Galí, M., Royer, S.-J., Gereá, M., Ortega-Retuerta, E., Gasol, J. M., Marrasé, C., & Simó, R. (2020). Variability of phytoplankton light absorption in stratified waters of the NW Mediterranean Sea: The interplay between pigment composition and the packaging effect. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 103460.

Perreault, F., Ali, N. A., Saison, C., Popovic, R., & Juneau, P. (2009). Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, *96*, 24–29.

Pinto, E., Sigaud- Kutner, T. C. S., Leitão, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, *39*, 1008–1018.

Porzionato, N. F. (2016). *Evaluación del potencial de acidificación, liberación de metales y posibilidades de remediación de sedimentos del río Reconquista*. Universidad Nacional de San Martín.

Pradhan, D., Sukla, B. L., Sawyer, M., & Rahman, P. K. S. M. (2017). Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *55*, 1–20.

Pradhan, D., Sukla, L. B., Mishra, B. B., & Devi, N. (2019). Biosorption for removal of hexavalent chromium using microalgae *Scenedesmus sp.* *Journal of Cleaner Production*, *209*, 617–629.

Rai, U N, Singh, N. K., Upadhyay, A. K., & Verma, S. (2013). Chromate tolerance and accumulation in *Chlorella vulgaris* L. : Role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. *Bioresource Technology*, *136*, 604–609.

Rai, Upendra Nath, Tripathi, R. D., & Kumar, N. (1992). Bioaccumulation of chromium and toxicity on growth, photosynthetic pigments, photosynthesis, invivo nitrate reductase activity and protein content in a chlorococcalean green alga *Glaucozystisnostochinearum itzigsohn*. *Chemosphere*, *25*, 1721–1732.

- Ramírez Romero, P., & Mendoza Cantú, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo La experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología.
- Rensing, S. A. (2016). (Why) Does Evolution Favour Embryogenesis? *Trends in Plant Science*, *21*(7), 562–573.
- Rodríguez, M. C., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Conforti, V., & Gualtieri, P. (2007). Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Research*, *105*, 234–239.
- Roesler, C. (1998). Theoretical and experimental approaches to improve the accuracy of particulate absorption coefficients derived from the quantitative filter technique. *Limnology and Oceanography*, *43*, 1649–1660.
- Ross, D. S., Sjogren, R. E., & Bartlett, R. J. (1981). Behavior of chromium in soils: IV. Toxicity to microorganisms. *Journal of Environmental Quality*, *10*, 145–148.
- Ruangsomboon, S., Ganmanee, M., & Choochote, S. (2013). Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. *Journal of Applied Phycology*, *25*, 867–874.
- Salman, M., Shafique, U., uz-Zaman, W., Rehman, R., Yousaf, A., Azhar, F., & Anzano, J. M. (2011). A rapid method for measurement of nickel and chromium at trace level in aqueous samples. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *55*(4), 217–217.
- Sanchez-Fortún, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D'ors, A., Rouco, M., Haigh-Florez, D., & Costas, E. (2009). Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *28*(9), 1901–1905.
- Sardella, A., Marieschi, M., Mercatali, I., Zanni, C., Gorbi, G., & Torelli, A. (2019). The relationship between sulfur metabolism and tolerance of hexavalent chromium in *Scenedesmus acutus* (Spheropleales): Role of ATP sulfurylase. *Aquatic Toxicology*, *216*, 1–12.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, *31*, 739–753.
- Sharma, S., Tiwari, S., Hasan, A., Saxena, V., & Pandey, L. M. (2018). Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils. *3 Biotech*, *8*, 1–18.
- Shen, Q., Zhi, T., Cheng, L., Xu, X., & Chen, H. (2013). Hexavalent chromium detoxification by nonliving *Chlorella vulgaris* cultivated under tuned conditions. *Chemical Engineering Journal*, *228*, 993–1002.

- Shi, T. Q., Wang, L. R., Zhang, Z. X., Sun, X. M., & Huang, H. (2020). Stresses as first-line tools for enhancing lipid and carotenoid production in microalgae. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 1–9.
- Sicko-Goad, L., & Lazinsky, D. (1983). Synergistic effects of phosphorus nutrient status and lead exposure in three algae. *Micron and Microscopica Acta*, *14*(3), 261–262.
- Sicko-Goad, L., & Lazinsky, D. (1986). Quantitative ultrastructural changes associated with Lead-coupled luxury phosphate uptake and polyphosphate utilization. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *5*, 617–627.
- Silva, B., Figueiredo, H., Quintelas, C., Neves, I. C., & Tavares, T. (2012). Improved biosorption for Cr(VI) reduction and removal by *Arthrobacter viscosus* using zeolite. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *74*, 116–123.
- Singh, S. K., Bansal, A., Jha, M. K., & Dey, A. (2012). An integrated approach to remove Cr(VI) using immobilized *Chlorella minutissima* grown in nutrient rich sewage wastewater. *Bioresource Technology*, *104*, 257–265.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., & Garg, S. K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*, *48*, 427–435.
- Takamura, N., Kasai, F., & Watanabe, M. M. (1989). Effects of Cu, Cd and Zn on photosynthesis of freshwater benthic algae. *Journal of Applied Phycology*, *1*, 39–52.
- Torricelli, E., Gorbi, G., Pawlik-Skowronska, B., Di Toppi, L. S., & Corradi, M. G. (2004). Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquatic Toxicology*, *68*, 315–323.
- Trainor, F. R. (1996). Reproduction in *Scenedesmus*. *Algae (The Korean Journal of Phycology)*, *11*(2), 183–201.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2009). *National Primary Drinking Water Regulations*.
- Upadhyay, A. K., Mandotra, S. K., Kumar, N., Singh, N. K., Singh, L., & Rai, U. N. (2016). Augmentation of arsenic enhances lipid yield and defense responses in alga *Nannochloropsis sp.* *Bioresource Technology*, *221*, 430–437.
- Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B., & Singh, S. N. (2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 1075–1082.
- Verger, L., Dargaud, O., Chassé, M., Trcera, N., Rouse, G., & Cormier, L. (2018). Synthesis, properties and uses of chromium-based pigments from the Manufacture de Sèvres. *Journal of Cultural Heritage*, *30*, 26–33.

- Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lütz, C., Sima, E., & Lütz-Meindl, U. (2014). Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. *Journal of Plant Physiology*, *171*, 154–163.
- Volland, S., Lütz, C., Michalke, B., & Lütz-meindl, U. (2012). Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology*, *109*, 59–69.
- Vullo, D. L., Wachsman, M. B., & Alche, L. E. (2000). *Microbiología en práctica: Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica y aplicada*. Atlante.
- Wagner, H., Liu, Z., Langner, U., Stehfest, K., & Wilhelm, C. (2010). The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *Journal of Biophotonics*, *3*, 557–566.
- Wan Omar, B. W., Ahamad Zakeri, H., Mat Amin, N., & Hidayah, N. (2017). Responses of a freshwater microalga, *Scenedesmus regularis* exposed to 50% inhibition concentration of Pb²⁺ and Hg²⁺. *Malayian Applied Biology*, *46*(4), 213–220.
- Weeks, M. E. (1932). The discovery of the elements: Chromium, molybdenum, tungsten and uranium. *Journal of Chemical Education*, *9*(3), 459–473.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, *144*, 307–313.
- World Health Organization (WHO). (2003). Chromium in drinking-water. In *Guidelines for Drinking-water Quality* (p. 13).
- Yang, J. S., Cao, J., Xing, G. L., & Yuan, H. L. (2015). Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, *175*, 537–544.
- Yen, H., Chen, P., Hsu, C., & Lee, L. (2017). The use of autotrophic *Chlorella vulgaris* in chromium (VI) reduction under different reduction conditions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 1–6.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PloS One*, *9*(3), 1–13.
- Yip, D. K., & Auersperg, N. (1972). The dye-exclusion test for cell viability: Persistence of differential staining following. *In Vitro*, *7*(5), 323–329.
- Zalugin, T. R., & Pick, U. (2014). Inhibition of nitrate reductase by azide in microalgae results in triglycerides accumulation. *Algal Research*, *3*, 17–23.

Zeraatkar, A. K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A. F., Moheimani, N. R., & McHenry, M. P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*, *181*, 817–831.

Zhang, L., Wang, N., Yang, M., Ding, K., Wang, Y. Z., Huo, D., & Hou, C. (2019). Lipid accumulation and biodiesel quality of *Chlorella pyrenoidosa* under oxidative stress induced by nutrient regimes. *Renewable Energy*, *143*, 1782–1790.

Zhao, Y., Song, X., Yu, L., Han, B., Li, T., & Yu, X. (2019). Influence of cadmium stress on the lipid production and cadmium bioresorption by *Monoraphidium sp.* QLY-1. *Energy Conversion and Management*, *188*, 76–85.

Zhou, M., Liu, Y., Zeng, G., Li, X., Xu, W., & Fan, T. (2007). Kinetic and equilibrium studies of Cr(VI) biosorption by dead *Bacillus licheniformis* biomass. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*, 43–48.

Ziagova, M., Dimitriadis, G., Aslanidou, D., Papaioannou, X., Litopoulou Tzannetaki, E., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). Comparative study of Cd(II) and Cr(VI) biosorption on *Staphylococcus xylosus* and *Pseudomonas sp.* in single and binary mixtures. *Bioresource Technology*, *98*, 2859–2865.

7. TRABAJO DE RESPALDO

*Natural and acquired mechanisms of tolerance to chromium in a *Scenedesmus dimorphus* strain*

Regina Toranzo^{a,b}, Gisela Ferraro^{a,b}, María Verónica Beligni^{c*}, Gonzalo Luis Perez^d, Delfina Castiglioni^a, Daniel Pasquevich^{a,b}, Carolina Bagnato^{a,b*}.

Affiliation

a, Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, Comisión Nacional de Energía Atómica, Centro Atómico Bariloche, Av. Bustillo 9500 CP 8400, S. C. de Bariloche, Río Negro, Argentina.

b, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

c, Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB-CONICET-UNMdP), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina.

d, Instituto INIBIOMA (CRUB Comahue, CONICET), Quintral 1250, CP 8400 S.C. de Bariloche, Río Negro, Argentina.

*Corresponding author: mvbeligni@mdp.edu.ar (M.V. Beligni) and carolina.bagnato@cab.cnea.gov.ar (C. Bagnato)

Abstract

The development of strategies for the bioremoval of heavy metals from the environment will greatly benefit from a deep understanding of how resistance arises. For the purpose of advancing in the knowledge of resistance to chromium in algae, we generated a resistant strain of the green alga *Scenedesmus dimorphus* by chronically exposing cells to this metal for a 95-day period. This procedure generated a strain that showed normal growth in the presence of the metal. This strain, termed chromium resistant strain (CRS), was able to overcome oxidative stress generated by chromium by employing antioxidant mechanisms based on the augmentation of accessory pigments and the release to the medium of substances that reduced metal toxicity. In addition, both the WT

(wild type) and CRS strains appeared to exclude most of the metal from entering the cells, which suggests that this is a natural mechanism of metal tolerance in algae. Although CRS resistance significantly improved strain performance in the presence of chromium, it had no impact on the metal removal capacity of the strain. We observed that chromium bioremediation only occurred at low pH with the biomass working as a biosorbent, but the WT and CRS strains were equally efficient in metal removal.

Keywords: Accessory pigments, Algae, Cell exudate, Chromium, Metal exclusion, Resistance.

Abbreviations

Cr (VI), chromium VI; CRS, chromium resistant strain; DCFH-DA, dichloro-dihydro-fluorescein diacetate; DPC, 1,5-diphenylcarbazide; FT-IR, Fourier Transform Infrared spectroscopy; HL, higher light; LL, lower light; WT, wild type.

1. Introduction

Metal pollution is a growing concern due to its effects on living organisms and the difficulties of the remediation processes. Many metals, including cadmium, chromium, copper, mercury, lead and zinc, have increased their concentration in the environment since the industrial revolution to date, in air, water and soil. Different anthropogenic activities have increased chromium concentration over the past decades. Due to its widespread use in textile dyeing, leather tanning, electroplating, alloying and metallurgic industries, this metal has become an important pollutant in the environment [1–4].

Although there are multiple oxidation states, due to their stability, chromium commonly occurs in nature as Cr (III), the trivalent form, and Cr (VI), the hexavalent form. Cr (III) is mainly found bound to organic matter in the environment. Conversely, Cr (VI) usually occurs combined with oxygen as chromate (CrO_4^{2-}) or dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), which makes it more available to organisms.

In addition, Cr (VI) can easily penetrate the cells using the sulfate transporter [4–9]. Based on the differences in bio-availability and capacity to enter the cells, it has been proposed that Cr (VI) is more toxic [10–13]. Nevertheless, other studies conducted in algae reported that Cr (III) could be more deleterious than Cr (VI) based on cell viability and/or lipid peroxidation [14, 15].

Cr (VI) oxyanions are strong oxidants and are, thus, able to rapidly generate reactive oxygen species (ROS), which has severe consequences in plants, vertebrates and microorganisms. In humans, Cr (VI) produces ulceration of the skin, acute dermatitis, respiratory system irritation, lung and kidney cancer and liver necrosis [1, 2, 4, 16]. In plants and algae, the overall effect of chromium is the reduction of photosynthesis and growth [12, 17–20]. During the past decades, a few studies reported the physiological effects of chromium on algae. It is well established that this metal produces morphological changes that affect cell size and shape, cell-wall thickening and cell vacuolation, as well as the disruption of coenobia and the induction of sexual reproduction [13, 21–24]. Photosynthesis is also affected by this metal, which causes a reduction in the content of photosynthetic pigments and a decrease in photosynthetic activity [20, 25–29]. In addition, ROS generation, as well as lipid peroxidation, has been associated with metal damage in algal cells [2, 9, 30–32]. Clearly, the toxic effects of chromium on living organisms demand appropriate effluent treatment before the final disposal to water bodies.

There are recommended limits for chromium concentration in the environment. According to the World Health Organization, the maximum tolerable limit for total chromium in drinking water is 0.05 mg/L [33], while in inland surface water the maximum is 0.1 mg/L, according to the Environmental Protection Agency (USA) [34]. For many industrial activities, chromium concentration in effluents is above these limits. Chromium enrichment in the environment above tolerable levels can be due to leakage, poor storage or inadequate industrial waste treatment. Traditionally, heavy metals are removed using physico-chemical methods such as flocculation, ion exchange and reverse osmosis. However, these techniques are inefficient at low metal

concentrations. An alternative is bioremediation, an emerging technology that involves the use of microorganisms for the removal of contaminants that is appropriate for low metal concentrations (under 100 mg/L) [9, 35, 36]. This method is based on the capacity of living organisms to tolerate contaminants and finally remove them from the surrounding media. Since the late 50's, algae have been proposed as appropriate candidates for bioremediation, as algae that grow in polluted environments are likely to show a higher capacity to handle contaminants [29, 37, 38]. Understanding the mechanisms by which these species grow in polluted environments is a key step for developing a bioremediation strategy.

In this work, we used a laboratory-generated chromium resistant strain to study resistance and to evaluate its metal removal capacity in comparison with the wild type (WT) strain. We evaluated the effects of chromium on the cell physiology of both the WT and the chromium resistant strain (CRS) and identified targets for this metal, as well as possible mechanisms involved in its detoxification.

2. Materials and methods

2.1. Culture conditions, chromium resistant strain (CRS) generation and resistance characterization

Axenic cultures of wild type *Scenedesmus dimorphus* (UTEX 417) were maintained in 100 mL Bold's Basal Medium (BBM) [39], in a climate-controlled chamber at 21 °C, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a 14 h photoperiod. Liquid cultures were grown on a rotary shaker. Growth was monitored by cell counting using a Neubauer chamber.

In order to define the metal dose to be used for CRS generation, an IC₅₀-72h on wild type *S. dimorphus* was done, according to OECD normative (2011) [40]. Based on the IC₅₀ obtained, 25 μM was the dose selected for resistance generation. The idea was using a dose that would have a significant effect on the WT strain without over-stressing it (Figure S1). *S. dimorphus* CRS was

obtained by exposure of 1.5×10^6 cells/mL to 25 μM Cr (VI), supplied as potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (Biopack). The treated culture, as well as an untreated control, were maintained under the conditions described above for 95 days. Both cultures were maintained in exponential phase by serial transfers to fresh medium every two weeks. The exponential phase of the strains was determined using growth curves as explained below.

Growth curve experiments were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of algal cultures in BBM at 1×10^5 cells/mL. The CRS and WT strains were exposed to 0 and 25 μM of Cr (VI) for 37 and 52 days, respectively. CRS and WT intrinsic growth rates μ (1) and duplication times T_2 (2) were calculated using the following equations:

$$\mu = \left(\ln \left(\frac{N_t}{N_0} \right) \right) / \Delta t \quad (1)$$

$$T_2 = 0.6931 / \mu \quad (2)$$

where N_t and N_0 are the cell densities at time t and 0, respectively, and Δt is the time interval ($t_t - t_0$).

For evaluating resistance, CRS and WT cultures were exposed to 0, 25, 37.5 and 50 μM Cr (VI) for 120 h at pH 6.8. Experiments were performed in 100 mL vial flasks containing 30 mL of algal cells diluted in BBM to reach 1×10^5 cells/mL. Culture cell density was evaluated at 120 h by cell counting and, based on the results, the 37.5 μM dose was used in the rest of the experiments. CRS and WT images were obtained using a Light Microscope DM1000 (Leica Microsystems, Germany) and a digital camera ICC50HD (Leica Microsystems, Switzerland).

For pigment, oxidative stress, catalase activity, lipid and FT-IR analyses, cells were pre-adapted to a modified BBM medium with reduced iron concentration (4.48×10^{-6} $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (BBM-Fe) for 3 days, to minimize iron-dependent Cr (VI) reduction. Afterwards, cells (1×10^5 cell/mL) were

treated with 37.5 μM Cr (VI) (3.75×10^{-4} μmol Cr VI/cell) for 120 h at pH 6.8 at the temperature and light conditions described previously. Experiments were performed in 100 mL vial flasks containing 40 or 50 mL of algal cells diluted in BBM-Fe.

2.2. Chromium quantification

Cr (VI) concentration was determined by the diphenylcarbazide method with a limit of detection of 1.9 μM [41]. The purple complex formed from the reaction of 1,5-diphenylcarbazide with Cr (VI) was measured by absorbance at $\lambda = 540$ nm in a spectrophotometer (Shimadzu, UV-Vis 1800, Japan). Total chromium concentration was determined by atomic absorption spectroscopy (AAS) (Perkin Elmer, Analyst 200, USA) or by *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS) (Thermo Scientific, iCAP Qc, Germany). The detection limit of AAS in these measurements was 3.8 μM . When indicated, the Cr (III) concentration was calculated by subtracting the Cr (VI) content from the total chromium concentration.

2.3. Oxidative stress determination: reactive oxygen species (ROS) levels and catalase activity analyses

Cell cultures (50 mL) were exposed to 37.5 μM Cr (VI) for a period of 120 h. Algal cell suspensions were centrifuged at $2,290 \times g$ in a HERMLE Z 366 (HERMLE Labortechnik, Germany), 221.15 swinging bucket rotor for 30 min. The oxidation-sensitive fluorescent probe dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) was used to evaluate intracellular ROS levels [42]. Pellets were resuspended in 1 mL of BBM-Fe and incubated with 3 μM DCFH-DA for 10 min in the dark. Then the samples were centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, and DCFH-DA excess was removed together with the supernatants, pellets were frozen at -20 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. Subsequently, to improve the cell lysis, 1 cycle of freezing/thawing was done and the pellets were resuspended in 500 μl of phosphate-EDTA buffer (0.5 M phosphate: 0.1 M EDTA) and disrupted using an ultrasonic sonicator (Omni International, Sonic Ruptor 400 Ultrasonic Homogenizer,

USA) for 3 min on ice. Finally, 500 μ l of PE buffer were added and the supernatant was separated from the cell debris by centrifugation at 15,000 x g for 15 min at 4 °C and used for spectrofluorometer measurements. Data were recorded as relative fluorescence units, with 480 nm as the excitation wavelength, using a spectrofluorometer (Horiba Scientific, Fluoromax-4, USA). The emission spectra between 500 nm and 600 nm were obtained for all experiments. Fluorescence was normalized and referred to the protein content of each sample. Total protein content was determined by the Bradford method. In addition, images of DCFH-DA-stained cultures were obtained using a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse E800, Japan); with excitation and emission wavelengths at 480 nm and 530 nm, respectively.

For catalase (CAT) analysis, enzyme activity was determined by the disappearance of hydrogen peroxide [43]. Cell pellets from Cr (VI) treated and untreated cultures of both WT and CRS were frozen at -20 °C for 24 h and then resuspended in 300 μ L of phosphate-EDTA buffer (0.5 M phosphate: 0.1 M EDTA). Afterwards, cells were disrupted using an ultrasonic sonicator for 3 minutes on ice, centrifuged at 15,000 x g for 10 min at 4 °C, and the supernatant used for CAT activity determination. The reaction mixture consisted in 490 μ L deionized water, 200 μ L phosphate-EDTA buffer, 300 μ L supernatant (containing the enzyme extract) and 10 μ L 0.1 M H₂O₂. CAT activity was measured by the decrease in absorbance at 240 nm caused by the disappearance of H₂O₂. Enzyme activity was normalized and referred to the protein content of each sample.

2.4. Lipid accumulation analysis

Lipid accumulation was determined by the sulfo-phospho-vanillin (SPV) assay [44]. Standard lipid stocks and the SPV solution were prepared as described by Mishra et al (2014) [45]. Cell cultures were exposed to 0, 37.5 and 50 μ M Cr (VI) for a period of 120 h. Pellets were obtained by centrifugation at 2,290 x g in a swinging bucket rotor for 30 min. One mL of concentrated sulfuric

acid was added to each pellet sample and then heated to 100 °C for 10 min. Subsequently, samples were cooled on an ice bath for 5 min, 2.5 mL of SPV reagent was added and samples were incubated at 37 °C for 15 min. A calibration curve at 530 nm was performed for lipid quantification.

2.5. Pigment analysis and particulate absorption coefficient determination

Pigment analyses were performed after 120 h of metal treatment as previously described. Algal cultures (40 mL) were harvested by centrifugation at 2,290 x g in a swinging bucket rotor for 30 min. Pellets were frozen at -20 °C for 24 h and pigments were extracted with methanol for 1 h at 50 °C. A spectral scan (350 nm-750 nm) was made for each extraction; chlorophyll (*a* and *b*) and carotenoids concentrations were determined as described by Wellburn (1994) [46]. In addition, particulate experiments were made after 120h of Cr (VI) exposure following standardized methodology [47]. Forty mL of algal cultures were filtered using GF/F glass-fiber filters (Whatman) of ~ 0.75 µm pore size and a spectral absorption scan of the particulate fractions were done across a range of visible wavelengths (400 nm-700 nm).

2.6. Exudates production and culture recovery during Cr (VI) treatments

The effect of exudates produced by the two strains on growth was evaluated. To obtain the exudates, WT and CRS strains (40 mL) were cultured under normal conditions for a 120 h period. Both strains were exposed to 0 and 37.5 µM Cr (VI). After exhaustive centrifugation to ensure complete cell harvesting (2,290 x g for 30 minutes in a HERMLE Z 366, 221.15 swinging bucket centrifuge rotor), supernatants were inspected under an optical microscope (20x objective, 200 magnification) to discard the presence of cells. One hundred and five mL of exudates were transferred to another glass vessel in order to be used on the next stage. Prior to the experiments, cells were adapted to BBM-Fe for 3 days. The exudates were inoculated to reach 1×10^5 cells/mL and divided in three vial flasks (triplicates). The WT strain treated with 0 and 37.5 µM Cr (VI) were used as controls. Culture cell density was measured each 24 h by cell counting.

2.7. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

For FT-IR analysis, 20 mL of cell cultures were exposed to 37.5 μM Cr (VI) in BBM-Fe at pH 6.8. After metal treatment, algal cultures were centrifuged at 2,290 $\times g$ in a swinging bucket rotor for 30 min. Supernatants were removed and pellets were resuspended in 200 μL of BBM-Fe. Measurements were performed according to Ferraro et al. (2018) [48]. FT-IR spectra were collected in a UATR Spectrum Two spectrometer (Perkin-Elmer, United Kingdom) in the range of 600-3000 cm^{-1} . Data were processed using the software Origin (OriginLab Corporation, USA). Assignment of peaks corresponding to the different functional groups was done following references from the literature [49–51].

2.8. Chromium removal experiments

Metal uptake assays were done in 100 mL vial flasks containing 10 mL of algal cells in BBM-Fe at an initial cell density of 2.4×10^7 cells/mL. CRS and WT were exposed to 1.92 mM of Cr (VI) (8×10^{-5} μmol Cr (VI)/cell) at a pH of 2 and 6.8, for 24 h and 10 days, respectively. After metal treatment, algal cultures were harvested, the cell suspension was filtered through a 0.45 μm cellulose acetate filter (Sartorius), and the filtrate was acidified with nitric acid prior to chromium determination.

2.9. Statistical analyses

All experiments were performed in triplicates and the results were expressed as mean values \pm standard deviation. Statistical treatment and significant differences were evaluated by one-way ANOVA with Tukey multiple comparisons test, by two-way ANOVA with Sidak multiple comparisons test or by unpair t-test, as indicated in figure's captions. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad Software, USA). In all cases the significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Generation of the Chromium Resistant Strain

To advance in the understanding of chromium resistance in algae, a laboratory strain resistant to this metal (in the form of Cr (VI)) was generated. To this purpose, *S. dimorphus* was exposed to 25 μ M dichromate for 95 days (Treated culture), while another culture was kept unexposed to the metal (Control, WT strain) (Figure S1). Figure 1A shows the progression of cell density over time. At the beginning of the experimental period, the effect of chromium was significant. However, after 60 days of chromium treatment, the cells recovered and eventually reached similar cell density as the WT strain. Figure 1B shows that, in the mid period of the experiment, the culture exposed to chromium had an overall lighter color than at the beginning of the experiment, but its appearance was again very similar to the control by the end of the experimental period. The strain generated was named Chromium Resistant Strain (CRS).

The period at which the culture started to show resistance coincided with that reported by Corradi et al. 1995 [20]. In addition, our results are in agreement with other reports that showed the success of prolonged exposure to generate resistant strains to Cr (III) [22, 23]. Interestingly, a few studies showed that, during this type of process, resistance acquisition had a genetic basis, which guaranteed its prevalence over time, and that the selected strains could be used to understand resistance mechanisms [20, 24].

3.2. Evaluation of chromium resistant strain (CRS) resistance to chromium

We quantified the growth parameters of both strains in the course of a complete growth curve (~40 to 60 days). In the absence of the metal, WT and CRS showed a similar proliferation rate (μ) and equal duplication time (1 day). However, when exposed to 25 μ M chromium, CRS proliferated at

an identical rate with and without Cr (VI), while the WT showed a significant reduction in μ (from 0.6 to 0.32) and an increased duplication time (from 1 to 2 days) (Figures 1C and D).

To assess the differences in chromium resistance between WT and CRS, both strains were grown at 25, 37.5 and 50 μ M Cr (VI) over a period of 120 h. Figure 1E shows that the cell density of CRS was significantly higher than that of the WT strain for the three doses. Based on the relative differences between the CRS and WT strains (Figure 1E), we selected the 37.5 μ M dose for subsequent experiments.

3.3. Chromium effect on cell morphology

Figure 2 shows representative images of cell morphology at 120 h after treatment. In the absence of chromium, both strains featured the typical fusiform cell shape and the cell association within coenobia. Exposure to chromium produced the disappearance of coenobia in both strains (Figure 2). In the presence of chromium, WT cells showed several signs of stress, such as augmented cell size, cell rounding, the appearance of colorless cells and the presence of chloroplastic vesicles and large vacuoles, this last presumably due to autophagy. In addition, we observed in these cells' signs of cell division, such as the presence of daughter colonies and "ghost cells". In CRS, these changes were less pronounced and the proportion of cells with a normal morphology was higher. While ghost cells were abundant in the CRS strain, daughter colonies were not observed (Figure 2).

Chromium effects on cell morphology, such as cell wall thickening, vacuolation, and cell deformation have been reported previously [13, 22–24]. Chromium exposure was shown to induce gametogenesis and sexual reproduction in *S. acutus* [20, 21]. The increase in cell size that we observed in the WT strain was accompanied by an inhibition in cell proliferation, suggesting that the cells were less competent to commit to mitosis. This exact same observation was reported by Cozza et al. (2016) for *S. acutus* [24]. Another interesting observation was the presence of autophagy-like vesicles, particularly abundant in the WT strain. Autophagy has been described and

documented in plants and algae associated with several stresses, including nutrient deprivation and photodamage [52]. This process has been particularly studied in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sp.* [53, 54]. The autophagic process has also been reported in the genus *Scenedesmus sp.* during the stress generated by heavy metal exposure [55–57].

3.4. Chromium effect on oxidative stress: reactive oxygen species (ROS) generation

In order to evaluate differences in the occurrence of oxidative stress due to chromium treatment, we monitored ROS generation by DCFH-DA staining and spectrofluorometry. Figure 3A shows that WT cells treated with Cr (VI) (WT+Cr) showed more and much brighter cells than WT untreated cells, indicating that exposure to chromium did increase ROS production in the WT. In contrast, exposure to the metal did not affect ROS generation in the CRS strain (CRS+Cr) compared to untreated cells (CRS) (Figure 3A). These observations were quantified by fluorimetric analysis of the DCFH-DA content in cell pellets. Figures 3B and 3C show that, when normalized to protein content and to their respective controls, ROS levels in CRS showed no increase as a result of chromium exposure, whereas the amount of ROS generated in the WT resulted 50% higher than its control.

Cr (VI)-induced ROS formation has already been reported in algae and plants [7, 13, 15, 30, 31]. When Cr (VI) enters the cell, it is reduced to Cr (III) and that reduction generates ROS [7, 30, 31, 58]. In addition, in algae, Cr (VI) directly affects photosystem II (PSII), which promotes superoxide anion and ROS formation in the chloroplast [13, 28, 59]. In agreement with the reported data, our results suggest that ROS increase in the WT during Cr (VI) exposure, whereas they are either not produced or are rapidly detoxified in the CRS strain. Indeed, the reduced levels of ROS in CRS could either contribute to and/or be a consequence of metal resistance.

3.5. Chromium effect on catalase activity

To evaluate if the differences in ROS levels were due to an exacerbated anti-oxidant enzymatic response in the CRS strain, we analyzed catalase (CAT) activity. Figure 3D shows that there were no significant differences in CAT activity between the different strains and treatments. Even though only CAT activity was measured, these results suggest that the antioxidant enzymatic system does not play a major role in ROS mitigation in the CRS strain during exposure to Cr (VI).

In agreement with our results, Volland and coworkers reported that no enzymatic activities were involved in the response to ROS during Cr (VI) treatments in the alga *Micrasterias denticulata* [13]. In contrast, Kovacik et al. [15] reported increased catalase activity during *S. quadricauda* Cr (III) and (VI) treatments. Long term treatments of *S. quadricauda* have also shown a remarkable increase in catalase activity when exposed to other metals such as cadmium [60]. Altogether, the differences in the response of the enzymatic antioxidant system between reports indicate that its contribution to metal tolerance might be metal and species dependent and vary with the treatment conditions, including the time of exposure. Accordingly, others have proposed that the enzymatic degradation of ROS might not be the primary mechanism of tolerance to chromium in algae. Indeed, several studies showed that the synthesis of non-peptidic thiol groups such as glutathione and cysteine [13, 31, 61], as well as phenols [15, 62], might be one of the main contributing mechanisms of tolerance to the oxidative stress generated by chromium.

3.6. Chromium effect on neutral lipid accumulation

In photosynthetic organisms, different types of stress trigger the accumulation of triglycerides and other lipids. Hence, total lipid content was analyzed by the sulpho-phospho-vainillin method in WT and CRS cells exposed to different doses of Cr (VI) for 120 h. Figure 3E shows that untreated WT and CRS cells had similar basal lipid levels. When exposed to the metal, the WT strain showed a 2-fold increase in total lipids for both Cr (VI) concentrations, whereas the content of these compounds in CRS cells remained similar to its untreated, basal levels. Our results suggest that the CRS strain

has the means to prevent or overcome chromium-induced stress in a manner that some of its symptoms, precisely ROS and lipid over-production, do not occur to levels that can be detected.

3.7. Chromium effect on chloroplast pigments

To determine whether chloroplast and/or thylakoid structure were affected by chromium, a particulate light absorption analysis (PA) was performed [47, 63, 64]. This method allows to monitor changes in photosynthetic pigment content as well as their packaging by analyzing the *in vivo* light absorption spectrum of living algal cultures [65–67]. Figure 4A shows that chromium induced a significant reduction in absorption along the whole spectrum ($\lambda = 400\text{-}700\text{nm}$) in both strains, when the absorption spectra were normalized to the cell number. When the spectra were normalized to the chlorophyll *a* peak (665 nm) (Figure 4 B), the region corresponding to accessory pigments (400nm-500 nm) showed a relative increase in both strains treated with chromium.

In order to distinguish whether the effect of chromium observed in PA experiments was a result of changes in pigment content or in thylakoid packaging, a methanol extraction, followed by spectrophotometric analysis, was done. This method allows to measure changes in pigment content independently of cell morphology. The results were very similar to those obtained in the PA analysis (Figures 4C and D), suggesting that the response to chromium in *S. dimorphus* is mediated mainly by variations in pigment content, and not in pigment packaging within chloroplast thylakoids. Interestingly, the relative increase in pigments after exposure to chromium was significantly higher in the CRS strain, specifically for carotenoids such as the xanthophyll violaxanthin (λ_{max} 415, 436, 466 nm) and carotenes (λ_{max} 470 nm), but not for the chlorophyll degradation product pheophytin (λ_{max} 417 nm) (Figure 4 D, see also Figure S2) (Roy et al., 2011 and references therein) [68].

In order to evaluate whether there was a synergistic effect of Cr (VI) and light on oxidative stress in the previous experiments, a set of cultures was analyzed under lower light (LL). In this condition,

the spectra normalized to the number of cells, shown in Figure 4E, evidenced a decrease in peak intensity in the CRS when compared with the WT treated with Cr (VI) and with the untreated strains. When the spectra were normalized to the chlorophyll *a* peak, a significant relative increase in the peaks attributed to carotenoids (437 and 470 nm) were observed in the WT strain treated with chromium (Figure 4 F). Estimation of carotenoids and chlorophylls based on Wellburn's (1994) methods confirmed our previous analysis (Table S1) [46]. Under higher light (HL, 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), carotenoids in CRS treated with Cr (VI) increased 4-fold compared to WT exposed to the metal, and 2.4-fold when normalized to chlorophyll. In the lower light condition (LL, 35 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), carotenoids were 4.5- and 2.4-fold higher in WT exposed to chromium than in CRS, when expressed as raw values or normalized to chlorophylls, respectively.

From this analysis, we conclude that Cr (VI) had a considerable effect on pigment content and that this effect was influenced by light. The effect of light on chromium toxicity was reported in *S. acutus* [69]. The authors concluded that metal uptake is an energy dependent process stimulated by light and that would explain the higher toxicity of chromium with light. In our experiments, chromium did not significantly enter the cells (please see results below and figure S3). In addition, light is considerably higher in our work than in the cited report. Since photodamage increases with light intensity [70, 71], we propose that, in our system, a synergism between light-promoted and Cr (VI)-induced oxidative stress occurs. In higher light, a condition in which the CRS strain had a clear advantage in the presence of chromium, the CRS showed a significant relative increase in carotenoids, pigments that protect photosynthetic membranes from oxidative stress [72]. These results suggest that the differential accumulation of carotenoids might contribute to the increased capacity of the CRS strain to overcome or prevent oxidative stress generated by the metal under higher light. Nevertheless, the results obtained in lower light suggest that the response to chromium might vary in culture conditions that differ from those used for strain generation and that, overall,

pigment increases might not be sufficient to confer resistance. In view of this, we could further conclude that the CRS strain has additional mechanisms of resistance.

3.8. Protective effect of chromium resistant strain (CRS) exudate on chromium toxicity

In the experiments of Figures 1-4, we also measured Cr (VI) disappearance in the media by the diphenylcarbazide method. In addition, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) was done to evaluate total chromium levels in supernatants. At low cell density (1×10^5 cells/mL), pH 6.8 and chromium doses of 25, 37.5, and 50 μ M Cr (VI), little or no metal reduction and/or removal from the media was observed (Figure S3). Furthermore, Scanning Electron Microscopy with Energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS) showed no detectable levels of Cr (VI) on the cells, suggesting that the metal did not bind to the surface (data not shown). These results prompted us to question whether the cells could avoid metal toxicity by an exclusion strategy. To evaluate if the cells could produce and release substances that might mitigate chromium toxicity by either binding, chelating, and/or reducing Cr (VI) to Cr (III), we performed an exudate protective assay. Previous results had shown that the exudate of the WT strain grown in the presence of chromium was highly toxic for both strains (data not shown). Hence we did not include this condition in subsequent experiments. Figure 5 shows the growth of the WT strain exposed to a CRS exudate (containing chromium) relative to the control (WT strain without Cr (VI)). As can be seen, the CRS exudate had a protective effect, since the cell density of the WT culture in the presence of the exudate was 2-fold higher than in the regular chromium treatment (WT+ Cr). Furthermore, WT growth in the presence of a CRS exudate fitted an exponential curve, while WT subjected to a standard Cr (VI) treatment entered a stationary phase starting on day 9.

These results suggest that WT cells, sensitive to chromium, release toxic compounds, presumably in an attempt to reduce their concentration inside the cell. In contrast, the protective effect of CRS exudates indicates that resistant cells secrete substances that prevent the deleterious effects of Cr

(VI). This observation is in agreement with results previously reported on the effects of algal exudates on metal toxicity [73–76]. Although exudate characterization exceeds the scope of this study, future work will focus on this issue.

3.9. Chromium effect on cell functional groups

Despite the fact that chromium was not observed on the algal surface to significant levels, cell surface functional groups could still be modified by the metal. For the purpose of analyzing this possibility, we performed FT-IR after metal exposure. FT-IR analysis of the WT and CRS strains grown without the metal showed spectra similar to those reported previously [49, 50] and no differences in the pattern and/or abundance of functional groups were found between strains (Figure 6). The spectra were modified when the strains were exposed to Cr (VI), indicating that the metal either interacted or induced the synthesis and exposure of particular functional groups. In the presence of Cr (VI), carboxylate groups (-COO- 1370 cm^{-1}), increased in the WT strain and, to a lesser extent, in the CRS. On the contrary, the amide I (1650 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$) and amide II (1540 cm^{-1} $\delta(\text{N-H})$) groups, exclusive to proteins $^{-1}$, different peaks corresponding to polysaccharide functional groups (1150 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$, $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1020\text{ cm}^{-1}$, C-3-O-3-H and C-6-H2-O-6-H) [77, 78] showed an increase after exposure to chromium, in both the WT and CRS strains. Interestingly, normalization of the spectra to the amide I peak (1650 cm^{-1}) revealed a relative increase in carboxylate and polysaccharide peaks in the WT + Cr (VI) compared to the control and to the CRS+ Cr (VI) treatment (Figure S4 and Table S2).

In view of these results, we propose that Cr (VI) is reduced to Cr (III) by cell surface polysaccharides that are augmented during metal exposure, particularly in WT cells. This mechanism has been described in algae [35, 79, 80] and demonstrated with biopolymers [81–83]. Once that occurs, this could trigger a chain reaction that generates a ROS cascade that translates from the cell surface to the cell interior. Even though a small proportion of the chromium appears to

follow this path, the consequences of this would be severe to WT cells, whereas CRS cells could mitigate it much more effectively.

3.10. Metal removal capacity

During the previous assays, done in physiological conditions, no significant metal reduction or removal was observed. In view of these results, we evaluated the possibility of removing chromium from the media by using the cells in non-physiological conditions as a mere ion exchanger or biosorbent. In the first set of experiments, a cell density of 2.4×10^7 cells/mL and 1.92 mM of Cr (VI) at pH 6.8 were used (8×10^{-5} $\mu\text{mol Cr (VI)/cell}$), according to other reports in the bioremediation field [35, 79, 80, 83]. In this experiment, chromium reduction was merely about 15% at day 10 in both strains (Figure 7 A). The second set of experiments was done in similar conditions but at pH 2. The main objective of reducing the pH was to trigger a positive net charge on the cell surface that could promote Cr (VI) interaction with functional groups. Metal removal was evaluated at 24 h after exposure; the analysis showed a removal efficiency of approximately 70% in both strains, with a removal capacity of about 70 mg/g (DW) for both strains. From the difference of total chromium and DPC Cr (VI) determination, we could calculate that approximately a 10% of Cr (III) remained in the media (Figure 7 C-E).

One of the interests in generating a chromium-resistant strain is to obtain an organism with a good capacity for metal elimination from the media. The different forms and oxidative states of chromium interact with the cell surface differently. Cr (III), positively charged, can directly bind and adsorb to negatively-charged groups at pHs higher than 5, to eventually be incorporated. In contrast, at those higher pHs, Cr (VI) needs to be reduced in order to be adsorbed, and it could also be internalized in an unmodified form through sulfate transporter channels [8]. At low pH (1-3), Cr (VI) directly binds to positively charged groups and is reduced to Cr (III) [35], which can either remain adsorbed or solubilized [81]. The results obtained in our removal assay at pH 2 are in

agreement with previous reports [35], in which Cr (VI) reduction to Cr (III) on the cell surface was shown to require metal biosorption prior to reduction. The presence of solubilized Cr (III) in the media is consistent with the fact that, at low pH, Cr (III) can either exhaust active sites for metal binding and/or it can be displaced after Cr (VI) reduction, by the presence of other metal ion competitors [79, 80]. Our results are consistent with the fact that low pHs promote protonation and the establishment of positive net charges on functional groups that can interact with the anionic forms of Cr (VI) ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, CrO_4^{2-} , HCrO_4^-) [3, 35, 80, 84]. This is less likely to occur at intermediate or elevated pHs (e.g. pH over 5), since most of the sites with acid-base properties, such as hydroxyls, carboxylic acids, phenolics and amino groups that could interact with the anions are negatively charged.

4. Concluding remarks

As a summary, in this work, resistance to chromium was generated through a stochastic process by exposing a *S. dimorphus* strain to a continuous selective pressure factor, Cr (VI). In our experiments, the path to resistance appears to have been achieved by secreting substances that reduce its toxicity and responding to the oxidative stress caused by chromium. These mechanisms would operate in conjunction with a natural ability of the wild type strain to exclude most of the metal. Metal exclusion is certainly an energy-efficient strategy of tolerance. Due to the high toxicity of chromium, it is most likely safer for the cell to maintain it in the exterior, rather than internalize it. However, this poses an unfortunate disadvantage for bioremediation, as shown in our results, since tolerance does not necessarily contribute to metal removal from a polluted source. Indeed, similar results showed enhanced chromium reduction without uptake of Cr (VI) in *Chlorella spp.* [38] and lower uptake in a *S. acutus* resistant strain [6]. In cases like these, when Cr (VI) bioremediation using algae cannot be achieved *in vivo*, growing the algal biomass to high cell density and using it as a biosorbent at low pH is a suitable alternative.

Since metal exclusion is unlikely to be 100% effective, it does not confer full resistance. In this scenario, resistance to the general effects of oxidative stress appears as an efficient complementary response, as opposed to the development of *ad hoc* mechanisms of response to other aspects of chromium toxicity that are not necessarily shared with other stressors. Thus, if the selective pressure disappears, the mechanisms developed could be capitalized for the mitigation of other stresses with similar effects. Pigment increase might be one of the responses to oxidative stress that contribute to resistance to chromium. However, our results show that this response is not necessarily sufficient and other mechanisms, such as the secretion of protective compounds, might be necessary to confer resistance. In this scenario, the path to resistance to chromium appears as a complex process that starts on the cell exterior and involves several fronts of action.

Contributions

CB, MVB and RT conceived the idea. RT and CB designed and analyzed the experiments. RT did the experiments. GF, CB, GLP, DC, collaborated in the experiments. RT, MVB and CB wrote the manuscript. GF, GLP and DMP made critical revisions. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Special thanks to Dr. Ana Bohé and the Staff of the Complejo Tecnológico Pilcaniyeu, Departamento de Fisicoquímica y Control de Calidad from the Centro Atómico Bariloche at Comisión Nacional de Energía Atómica for the contributions with the metal determination by AAS and ICP-MS.

Declaration of interest

None.

Funding

This study was partially supported by the Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Consent statement

No conflicts, informed consent, human or animal rights applicable.

References

1. Pradhan D, Sukla BL, Sawyer M, Rahman PKSM (2017) Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. *J Ind Eng Chem* 55:1–20
2. Fernández PM, Viñarta SC, Bernal AR, Cruz EL, Figueroa LIC (2018) Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere* 208:139–148
3. Pradhan D, Sukla LB (2019) Bioreduction of hexavalent chromium using microalgae. In: *Role Microalgae Wastewater Treat*. Springer, pp 65–73
4. Jobby R, Jha P, Yadav AK, Desai N (2018) Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: A comprehensive review. *Chemosphere* 207:255–266
5. Pereira Y, Lagniel G, Godat E, Baudouin-Cornu P, Junot C, Labarre J (2008) Chromate causes sulfur starvation in yeast. *Toxicol Sci* 106:400–412
6. Marieschi M, Gorbi G, Zanni C, Sardella A, Torelli A (2015) Increase of chromium tolerance in *Scenedesmus acutus* after sulfur starvation: Chromium uptake and compartmentalization in two strains with different sensitivities to Cr(VI). *Aquat Toxicol* 167:124–133

7. Joutey NT, Sayel H, Bahafid W, Ghachtouli N El (2015) Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. In: Rev. Environ. Contam. Toxicol. Springer, pp 45–69
8. Sardella A, Marieschi M, Mercatali I, Zanni C, Gorbi G, Torelli A (2019) The relationship between sulfur metabolism and tolerance of hexavalent chromium in *Scenedesmus acutus* (Spheropleales): Role of ATP sulfurylase. Aquat Toxicol 216:1–12
9. Elahi A, Arooj I, Bukhari DA, Rehman A (2020) Successive use of microorganisms to remove chromium from wastewater. Appl Microbiol Biotechnol 104:1–15
10. Katz SA, Salem H (1993) The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. J Appl Toxicol 13:217–224
11. Costa M (2003) Potential hazards of hexavalent chromate in our drinking water. Toxicol Appl Pharmacol 188:1–5
12. Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S (2005) Chromium toxicity in plants. Environ Int 31:739–753
13. Volland S, Lütz C, Michalke B, Lütz-meindl U (2012) Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. Aquat Toxicol 109:59–69
14. Vignati DAL, Dominik J, Beye ML, Pettine M, Ferrari BJD (2010) Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? Ecotoxicol Environ Saf 73:743–749

15. Kováčik J, Babula P, Hedbavny J, Kryštofová O, Provazník I (2015) Physiology and methodology of chromium toxicity using alga *Scenedesmus quadricauda* as model object. *Chemosphere* 120:23–30
16. Dayan AD, Paine AJ (2001) Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* 20:439–451
17. Clijsters H, Cuypers A, Vangronsveld J (1999) Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. *Zeitschrift für Naturforsch C* 54:730–734
18. Chandra P, Kulshreshtha K (2004) Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *Bot Rev* 70:313–327
19. Emamverdian A, Ding Y, Mokherdoran F, Xie Y (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci World J* 1–18
20. Corradi MG, Gorbi G, Ricci A, Torelli A, Bassi M (1995) Chromium-induced sexual reproduction gives rise to a Cr-tolerant progeny in *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 32:12–18
21. Corradi MG, Gorbi G, Bassi M (1995) Hexavalent chromium induces gametogenesis in the freshwater alga *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 30:106–110
22. Pereira M, Bartolomé MC, Sánchez-Fortún S (2013) Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere* 93:1057–1063
23. D'ors A, Pereira M, Bartolomé MC, López-Rodas V, Costas E, Sánchez-Fortún S (2010) Toxic effects and specific chromium acquired resistance in selected strains of *Dyctiosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere* 81:282–287

24. Cozza D, Torelli A, Veltri A, Ferrari M, Marieschi M, Cozza R (2016) Ultrastructural features, chromium content and in situ immunodetection of 5-methyl-cytosine following Cr (VI) treatment in two strains of *Scenedesmus acutus* M . (Chlorophyceae) with different chromium sensitivity. Eur J Phycol 51:294–306
25. Hörcsik Z, Oláh V, Balogh Á, Mészáros I, Simon L, Lakatos G (2006) Effect of Chromium (VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. Acta Biol Szeged 50:19–23
26. Rodríguez MC, Barsanti L, Passarelli V, Evangelista V, Conforti V, Gualtieri P (2007) Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Res 105:234–239
27. Juarez AB, Barsanti L, Passarelli V, Evangelista V, Vesentini N, Conforti V, Gualtieri P (2008) In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. J Environ Monit 10:1313–1318
28. Perreault F, Ali NA, Saison C, Popovic R, Juneau P (2009) Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. J Photochem Photobiol B Biol 96:24–29
29. Yewalkar SN, Dhumal KN, Sainis JK (2013) Effect of chromate on photosynthesis in Cr (VI)-resistant *Chlorella*. Photosynthetica 51:565–573
30. Pinto E, Sigaud- Kutner TCS, Leitão MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. J Phycol 39:1008–1018

31. Gorbi G, Torricelli E, Pawlik-Skowrońska B, Sanità di Toppi L, Zanni C, Corradi MG (2006) Differential responses to Cr(VI)-induced oxidative stress between Cr-tolerant and wild-type strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquat Toxicol* 79:132–139
32. Nacorda JOO, Martinez-Goss MR, Torreta NK (2010) Bioremoval and bioreduction of chromium (VI) by the green microalga, *Chlorella vulgaris* Beij., isolated from Laguna de Bay, Philippines. *Philipp J Sci* 139:181–188
33. World Health Organization (WHO) (2003) Chromium in Drinking-water. In *Guidel. Drink. Qual.*
34. United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2009) National Primary Drinking Water Regulations.
35. Han X, Wong YS, Wong MH, Yee Tam NF (2007) Biosorption and bioreduction of Cr (VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *J Hazard Mater* 146:65–72
36. Kumar KS, Dahms H, Won E, Lee J, Shin K-H (2015) Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:329–352
37. Rehman A, Shakoori AR (2001) Heavy metal resistance *Chlorella spp.*, isolated from tannery effluents, and their role in remediation of hexavalent chromium in industrial waste water. *Bull Environ Contam Toxicol* 66:542–547
38. Yewalkar SN, Dhumal KN, Sainis JK (2007) Chromium (VI)-reducing *Chlorella spp.* isolated from disposal sites of paper-pulp and electroplating industry. *J Appl Phycol* 19:459–465
39. Andersen RA (ed) (2005) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier

40. OECD (2006) OECD guidelines for the testing of chemicals. Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test.
41. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (1999) Standard methods for the examination of water and wastewater.
42. Eruslanov E, Kusmartsev S (2010) Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In: Adv. Protoc. Oxidative Stress II. Humana Press, pp 57–72
43. Kang K-S, Lim C-J, Hart T-J, Kim J-C, Jin C-D (1999) Changes in the isozyme composition of antioxidant enzymes in response to aminotriazole in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Biol* 42:187–193
44. Knight JA, Anderson S, Rawle JM (1972) Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin Chem* 18:199–202
45. Mishra SK, Suh WI, Farooq W, Moon M, Shrivastav A, Park MS, Yang JW (2014) Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour Technol* 155:330–333
46. Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307–313
47. Mitchell BG (1990) Algorithms for determining the absorption coefficient for aquatic particulates using the quantitative filter technique. In: Orlando'90, 16-20 April. International Society for Optics and Photonics, pp 137–148

48. Ferraro G, Toranzo RM, Castiglioni DM, Lima E, Vasquez Mansilla M, Fellenz NA, Zysler RD, Pasquevich DM, Bagnato C (2018) Zinc removal by *Chlorella sp.* biomass and harvesting with low cost magnetic particles. *Algal Res* 33:266–276
49. Giordano M, Kansiz M, Heraud P, Beardall J, Wood B, McNaughton D (2001) Fourier Transform Infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 37:271–279
50. Heraud P, Wood BR, Beardall J, McNaughton D (2007) Probing the influence of the environment on microalgae using Infrared and Raman Spectroscopy. In: *ACS Symp. Ser.* pp 85–106
51. Wagner H, Liu Z, Langner U, Stehfest K, Wilhelm C (2010) The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *J Biophotonics* 3:557–566
52. Bassham DC, Crespo JL (2014) Autophagy in plants and algae. *Front Plant Sci* 5:1–2
53. Heredia-Martínez LG, Andrés-Garrido A, Martínez-Force E, Pérez-Pérez ME, Crespo JL (2018) Chloroplast damage induced by the inhibition of fatty acid synthesis triggers autophagy in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 178:1112–1129
54. Jiang Q, Zhao L, Dai J, Wu Q (2012) Analysis of autophagy genes in microalgae: *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy. *PLoS One* 7:e41826
55. Sicko-Goad L, Lazinsky D (1983) Synergistic effects of phosphorus nutrient status and lead exposure in three algae. *Micron Microsc Acta* 14:261–262

56. Sicko-Goad L, Lazinsky D (1986) Quantitative ultrastructural changes associated with Lead-coupled luxury phosphate uptake and polyphosphate utilization. *Arch Environ Contam Toxicol* 5:617–627
57. Ameri M, Baron-Sola A, Khavari-Nejad RA, Soltani N, Najafi F, Bagheri A, Martinez F, Hernández LE (2020) Aluminium triggers oxidative stress and antioxidant response in the microalgae *Scenedesmus sp.* *J Plant Physiol* 1–31
58. Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev* 25:335–347
59. Ali NA, Juneau P, Didur O, Perreault F, Popovic R (2008) Effect of dichromate on photosystem II activity in xanthophyll- deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 95:45–53
60. Kováčik J, Babula P, Peterková V, Hedbavny J (2017) Long-term impact of cadmium shows little damage in *Scenedesmus acutiformis* cultures. *Algal Res* 25:184–190
61. Kováčik J, Babula P, Hedbavny J, Klejdus B (2014) Hexavalent chromium damages chamomile plants by alteration of antioxidants and its uptake is prevented by calcium. *J Hazard Mater* 273:110–117
62. Kováčik J, Klejdus B, Bačkor M (2010) Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. *Photochem Photobiol* 86:612–616
63. Roesler CS (1998) Theoretical and experimental approaches to improve the accuracy of particulate absorption coefficients derived from the quantitative filter technique. *Limnol Oceanogr* 43:1649–1660

64. Mitchell B, Kahru M, Wieland J, Stramska M (2003) Determination of spectral absorption coefficients of particles, dissolved material and phytoplankton for discrete water samples. In: Ocean Opt. Protoc. Satell. Ocean Color Sens. Valid. pp 231–257
65. Berner T, Dubinsky Z, Wyman K, Falkowski PG (1989) Photoadaptation and the “package” effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). J Phycol 25:70–78
66. Falkowski PG, LaRoche J (1991) Acclimatation to spectral irradiance in algae. J Phycol 27:8–14
67. Kirk J (1994) Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press
68. Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES, Johnsen G (eds) (2011) Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. Cambridge University Press
69. Gorbi G, Corradi MG, Invidia M, Bassi M (2001) Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). Ecotoxicol Environ Saf Env Saf 48:36–42
70. Baroli I, Melis A (1996) Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. Planta 198:640–646
71. Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. Annu Rev Plant Physiology 50:333–359
72. Sun X, Zhong Y, Huang Z, Yang Y (2014) Selenium accumulation in unicellular green alga *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments. PLoS One 9:e112270

73. Koukal B, Rossé P, Reinhardt A, Ferrari B, Wilkinson KJ, Loizeau JL, Dominik J (2007) Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. *Water Res* 41:63–70
74. Paquet N, Lavoie M, Maloney F, Duval JFL, Campbell PGC, Fortin C (2015) Cadmium accumulation and toxicity in the unicellular alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Influence of metal-binding exudates and exposure time. *Environ Toxicol Chem* 34:1524–1532
75. Gorbi G, Invidia M, Zanni C, Torelli A, Corradi MG (2004) Bioavailability, bioaccumulation and tolerance of chromium: Consequences in the food chain of freshwater ecosystems. *Ann Chim* 94:505–513
76. Corradi MG, Gorbi G, Abd-El-Monem HM, Torelli A, Bassi M (1998) Exudates from the wild type and a Cr-tolerant strain of *Scenedesmus acutus* influence differently Cr (VI) toxicity to algae. *Chemosphere* 37:3019–3025
77. Grube M, Lin JG, Lee PH, Kokorevicha S (2006) Evaluation of sewage sludge-based compost by FT-IR spectroscopy. *Geoderma* 130:324–333
78. Dean AP, Sigee DC, Estrada B, Pittman JK (2010) Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour Technol* 101:4499–4507
79. Shen Q, Zhi T, Cheng L, Xu X, Chen H (2013) Hexavalent chromium detoxification by nonliving *Chlorella vulgaris* cultivated under tuned conditions. *Chem Eng J* 228:993–1002
80. Pagnanelli F, Jbari N, Trabucco F, Martínez ME, Sánchez S, Toro L (2013) Biosorption-mediated reduction of Cr (VI) using heterotrophically-grown *Chlorella vulgaris*: Active sites and ionic strength effect. *Chem Eng J* 231:94–102

81. Park D, Lim SR, Yun YS, Park JM (2007) Reliable evidences that the removal mechanism of hexavalent chromium by natural biomaterials is adsorption-coupled reduction. *Chemosphere* 70:298–305
82. Park D, Yun YS, Park JM (2008) XAS and XPS studies on chromium-binding groups of biomaterial during Cr(VI) biosorption. *J Colloid Interface Sci* 317:54–61
83. Lin YC, Wang SL (2012) Chromium (VI) reactions of polysaccharide biopolymers. *Chem Eng J* 181–182:479–485
84. Yen H, Chen P, Hsu C, Lee L (2017) The use of autotrophic *Chlorella vulgaris* in chromium (VI) reduction under different reduction conditions. *J Taiwan Inst Chem Eng* 1–6

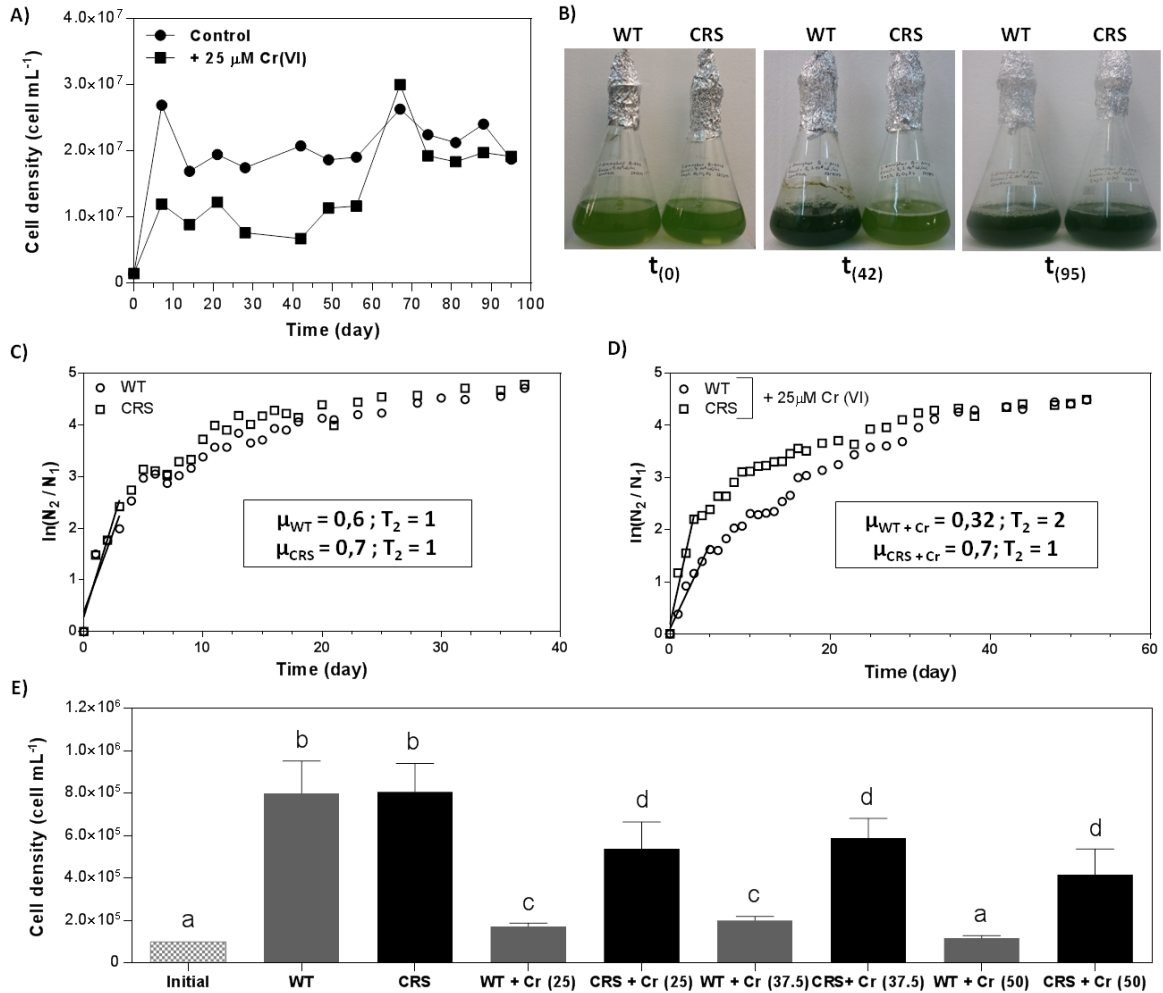


Figure 1. Chromium resistant strain (CRS) generation and characterization. A) Culture cell density (cell/mL) of both strains during the generation assay. B) Appearance of the cultures at the beginning (t = day 0), at the middle (t = day 42) and at the end (t = day 95) of the strain generation period. C) and D) Growth rate (μ) and duplication time (T_2) of WT and CRS without chromium (C) and in the presence of 25 μM Cr (VI) (D). E) WT and CRS cell densities exposed to 25 μM , 37.5 μM and 50 μM of Cr (VI) for 120 h. Statistical analyses were done with one-way ANOVA and Tukey multiple comparisons test. Different letters label denote significant differences at $p < 0.05$. C), D), and E) Each assay were done at pH 6.8 and in triplicates. CRS, chromium resistant strain; WT, wild type.

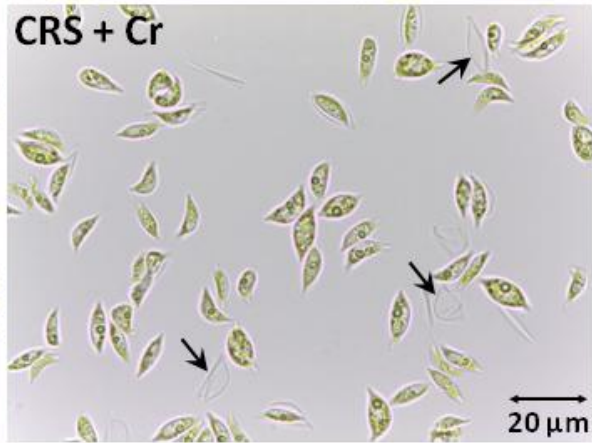
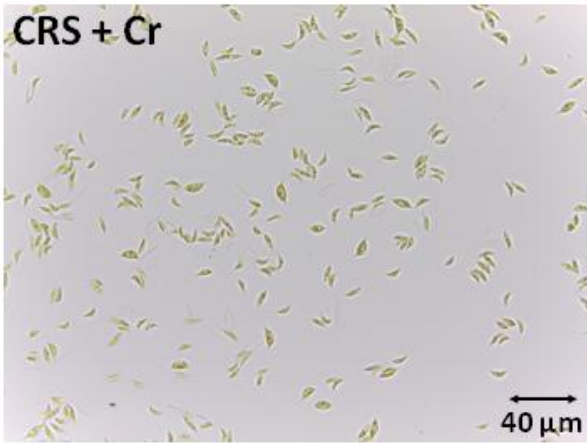
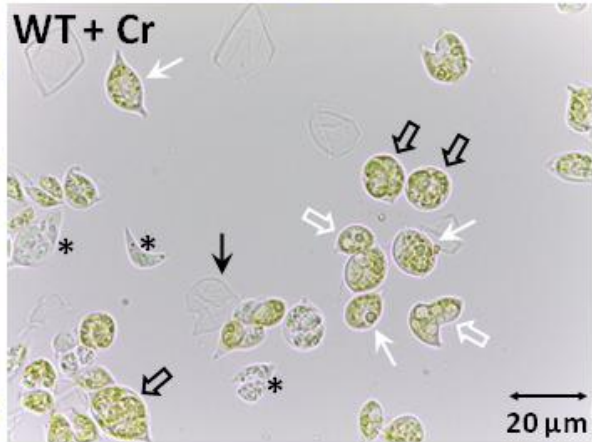
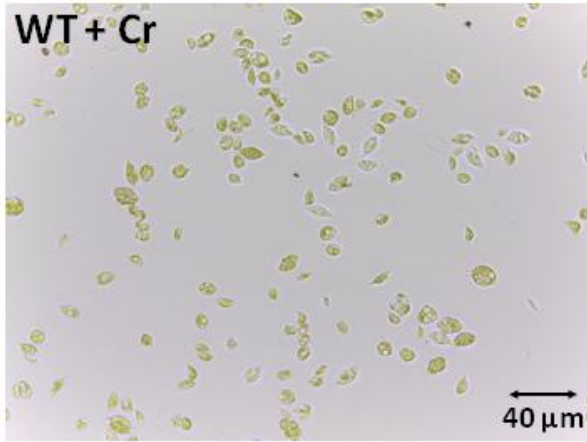
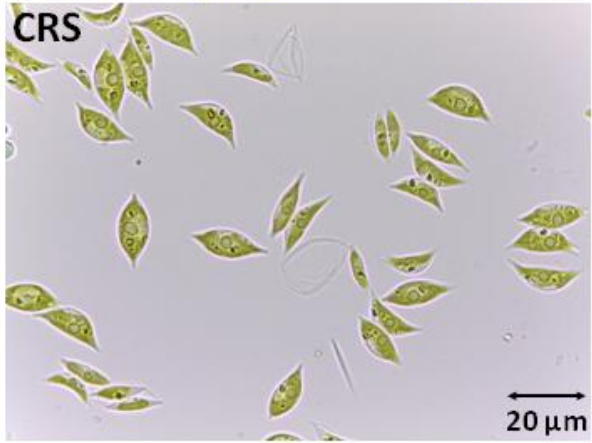
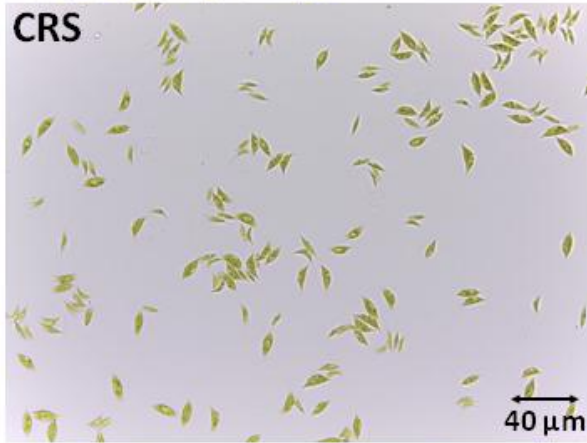


Figure 2. Chromium effect on cell and culture morphology. Images of WT and CRS cells after 120 h of Cr (VI) treatment observed under 400 and 1000 magnification: 0 μM (top and second line) and 37.5 μM (third and bottom line). Images under 400 and 1000 magnifications are in the left and right panels, respectively. Black arrows: “ghost cells”, white arrows: rounded and enlarged cells, black open arrows: “daughter colonies”, white open arrows: cells with large autophagic-like vesicles, asterisks: colourless cells. Bars = 40 μm and 20 μm . CRS, chromium resistant strain; WT, wild type.

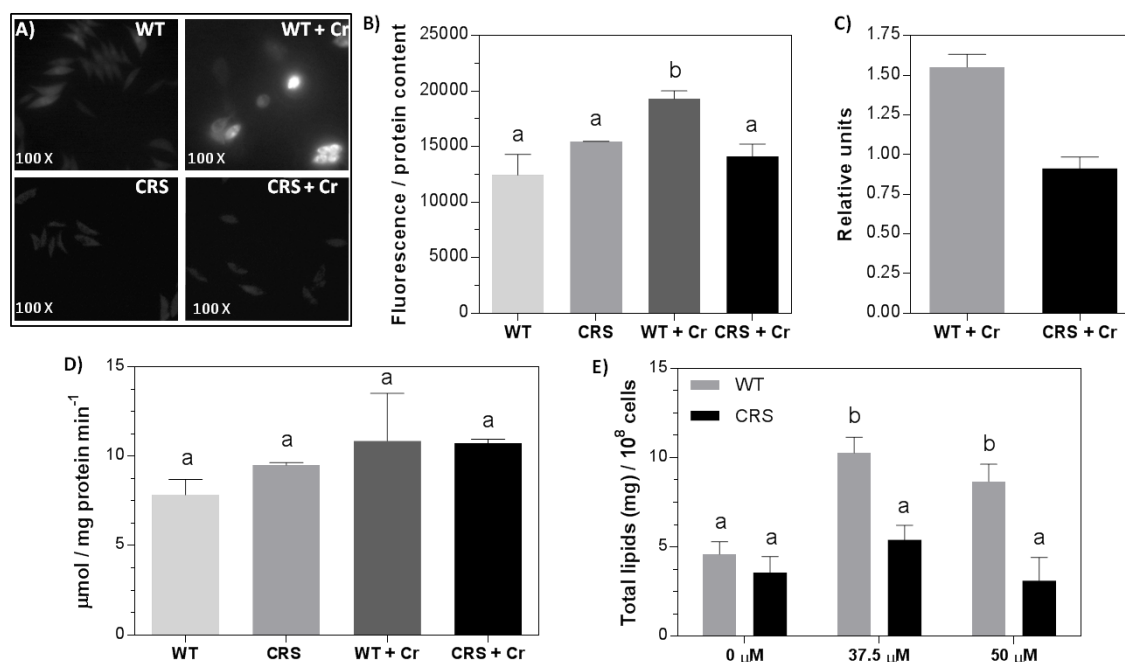


Figure 3. Chromium effect on ROS generation, catalase activity and neutral lipid accumulation after treatment of WT and CRS cells with 37.5 μM of Cr (VI) at pH 6.8 for 120 h. A) Images of both strains were taken in a fluorescence microscope under 1000 magnification. The settings were the same for all images and the fluorescence baseline intensity was chosen using the image with the lowest brightness. B) Bars indicating ROS production expressed as relative fluorescence units and referred to the protein content. C) Maximum fluorescence peak of both strains treated with Cr (VI) normalized to each baseline, {WT with Cr (VI) / WT} and {CRS with Cr (VI) / CRS}. (D) Effect of chromium exposure on catalase activity referred to the protein content. (E) Lipid accumulation was normalized to the cell number. Statistical analyses were done with one-way ANOVA and Tukey multiple comparisons test (assays B and D) and two-way ANOVA and Sidak multiple comparisons test (assay E). Different letters label denote significant differences at $p < 0.05$. Each assay was done in triplicates. CRS, chromium resistant strain; WT, wild type.

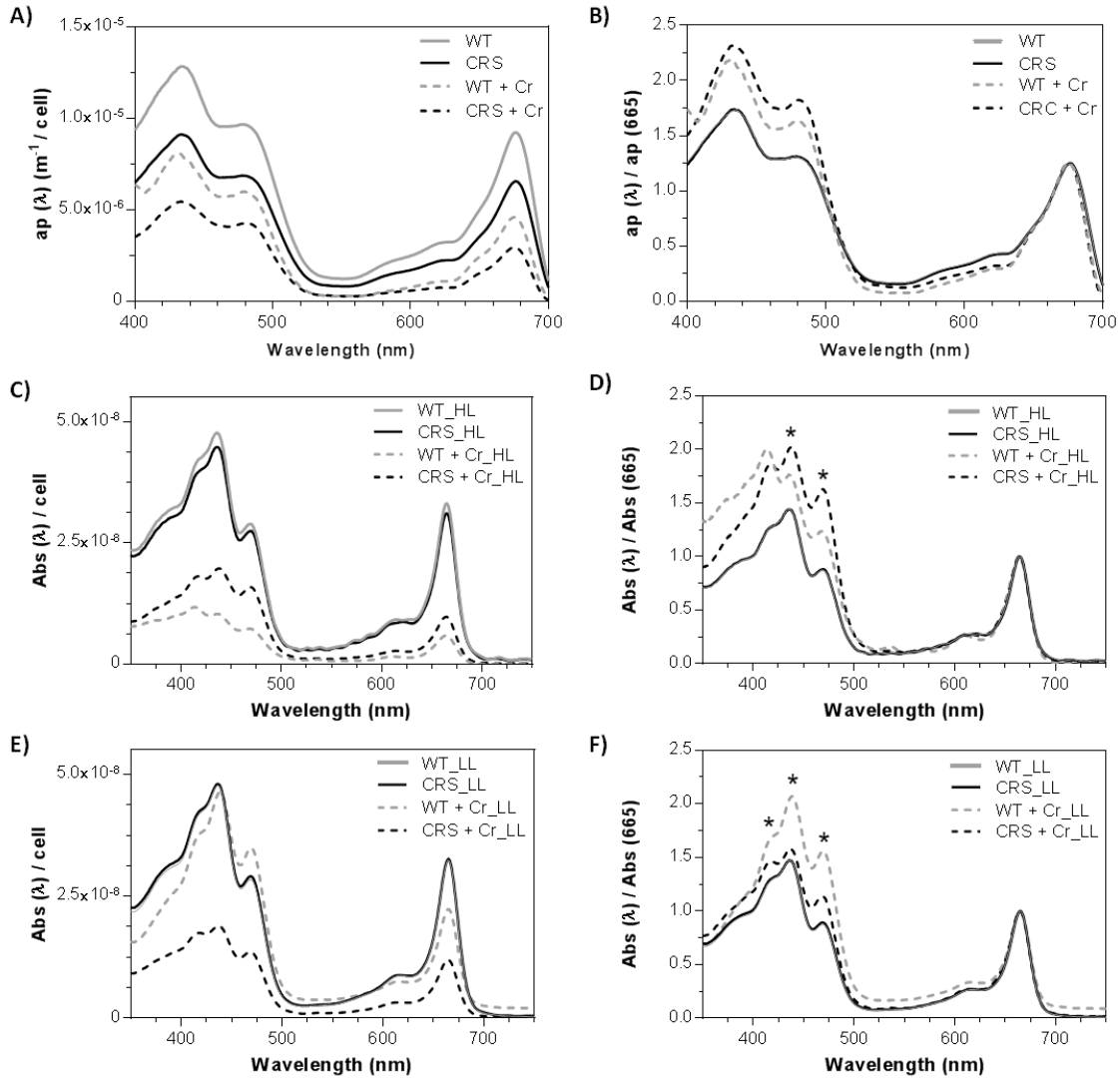


Figure 4. Chromium effects on the chloroplast and on pigments. Cultures were exposed to 37.5 μM Cr (VI) at pH 6.8 for 120 h. A) and B) Particulate analysis: spectral scans were done between 400 and 700 nm. A) Spectra normalized to cell number. B) Spectra normalized to chlorophyll *a* (665 nm). C), D), E) and F) Pigment analysis: spectral scans were done between 350 and 750 nm, experiments were done at a higher light condition (**HL**: 80 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and at lower light (**LL**: 35 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$). HL spectra and LL spectra are in the mid and bottom panels, respectively. C) and E) are spectra normalized to cell number; D) and F) are spectra normalized to cell number and chlorophyll *a* peak (665 nm). Each spectrum is the mean of triplicates. Statistical analyses were done with one-way ANOVA and Tukey multiple comparisons test, significant values set at $p < 0.05$. Asterisks indicate significant differences between **WT + Cr** and **CRS + Cr** treatments at 417 nm, 437 nm and 470 nm peaks. CRS, chromium resistant strain; WT, wild type.

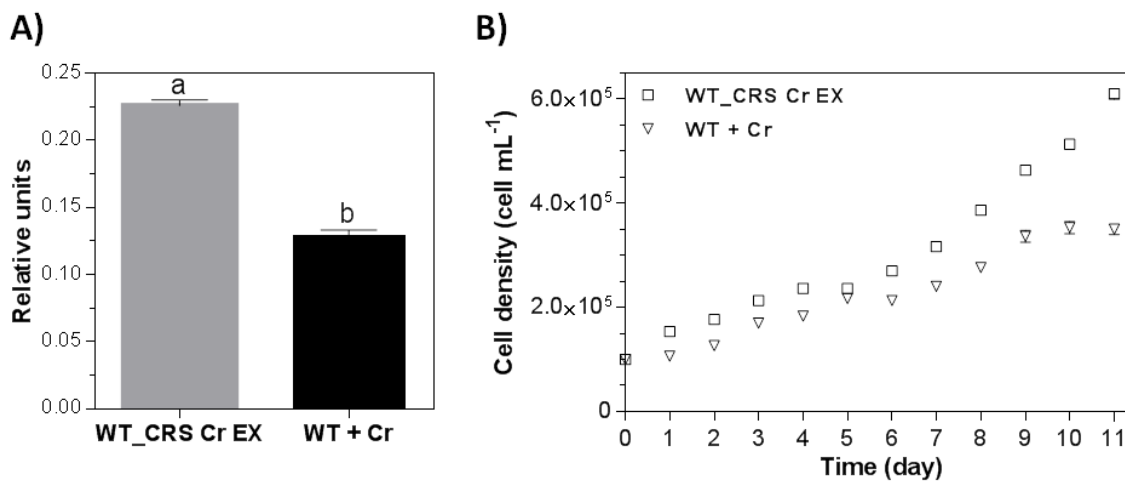


Figure 5. Effect of CRS exudate on the WT strain. A) WT_CRS + Cr EX and WT + Cr growth at day 11, normalized to WT growth without metal. B) Progress of WT cell densities exposed to: CRS + Cr exudate, and 37.5 μM Cr (VI) for 11 days; culture densities were measured every 24 hours by cell counting. Statistical analyses were done with unpaired t-test. Different letters label denote significant differences at $p < 0.05$. Each assay was done at pH 6.8 and in triplicates. CRS, chromium resistant strain; WT, wild type.

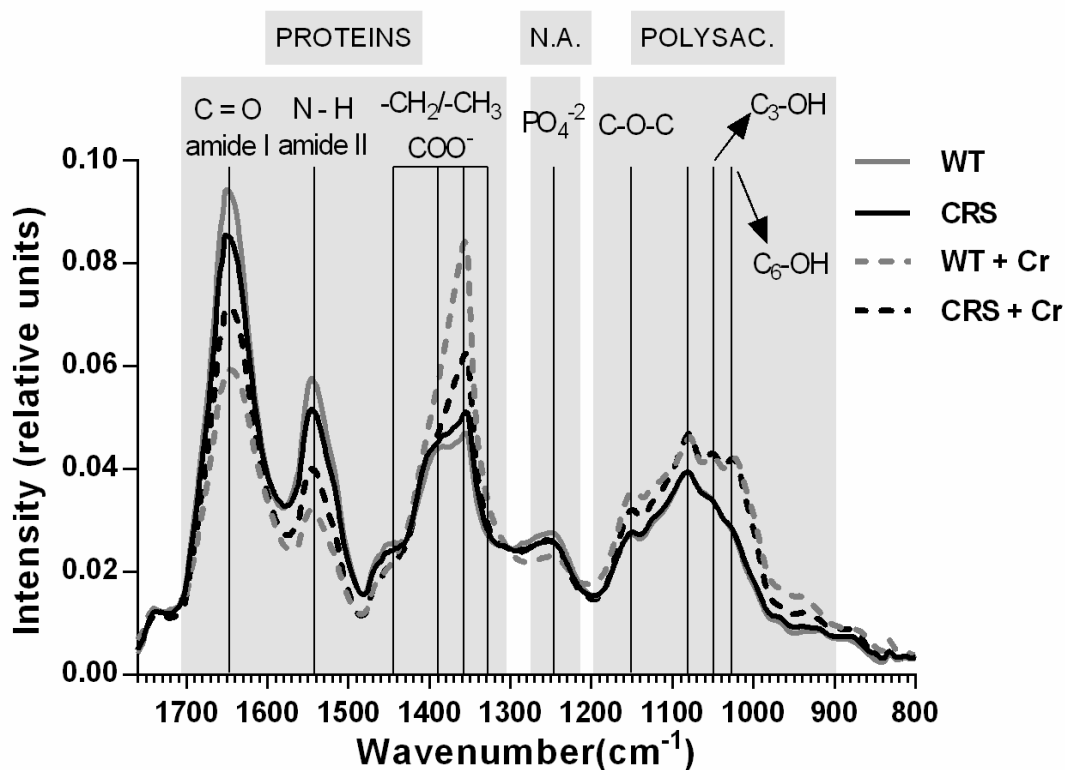


Figure 6. Effects of chromium treatment in cell functional groups. Infrared spectra of WT and CRS cultures after 120 h of exposure to 0 and 37.5 μM Cr (VI) at pH 6.8. The identified bands were: 1740 cm^{-1} $\nu\text{C}=\text{O}$ lipids esters, amide I $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}=\text{O})$, amide II $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{N-H})$, $\sim 1455 \text{ cm}^{-1}$ $\delta_{\text{as}}(-\text{CH}_2/-\text{CH}_3)$, 1370-1398 cm^{-1} $\delta_{\text{s}}(-\text{CH}_2/-\text{CH}_3)\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ all corresponding to proteins, 1240 cm^{-1} $\nu\text{P}=\text{O}$ from phosphodiester of nucleic acids, 1200-950 cm^{-1} correspond to valence and vibrational deformation of the saccharides rings (C-O, C-C, CH_2OH), specifically 1150 cm^{-1} form the asymmetric stretching from the glycosidic link $\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$, $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$ assigned to vibrations of C-3-O-3-H and C-6-H₂-O-6-H. Peak intensities are expressed as relative units. Each spectrum is the mean of three pseudoreplicates, every FTIR assay was done in triplicate. CRS, chromium resistant strain; WT, wild type.

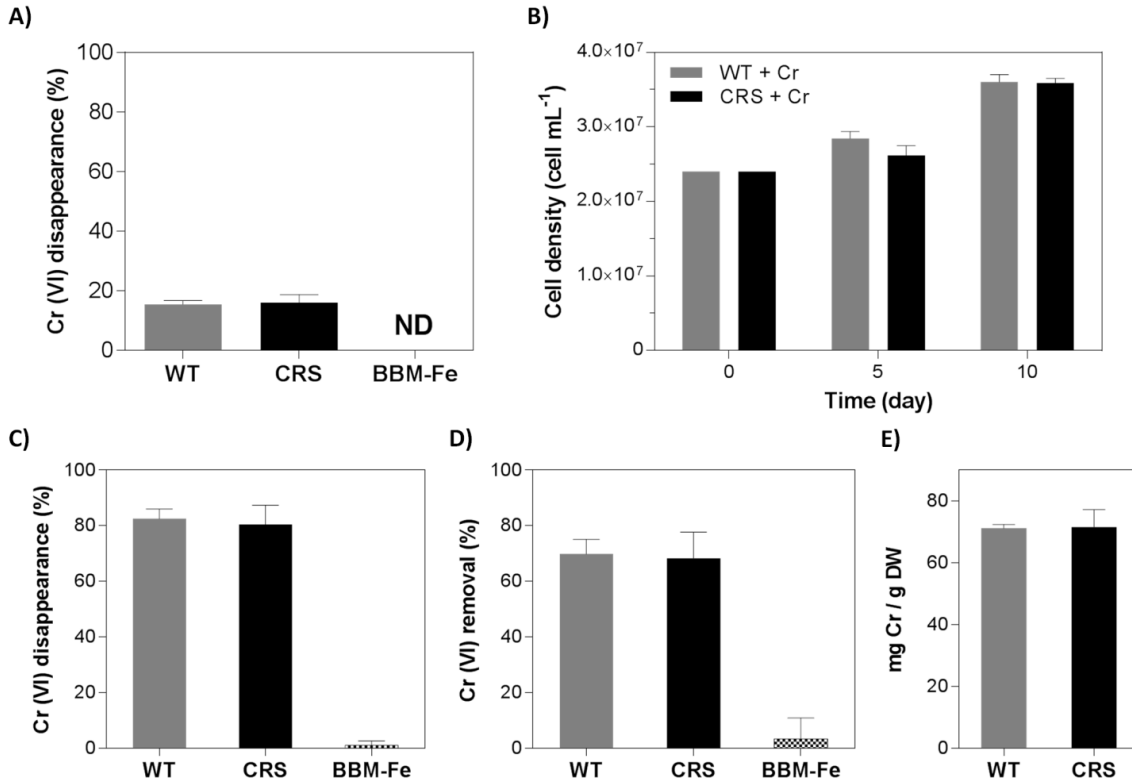


Figure 7. Metal removal assay. Cultures at of 2.4×10^7 cells/mL of CRS and WT were exposed to 1.92 mM of Cr (VI) at a pH of 2 or 6.8, for 24h and 10 days, respectively. Cr (VI) disappearance (A) and culture growth (B) during metal treatment at pH 6.8 measured by the diphenylcarbazide method. Cr (VI) disappearance (C), Cr removal (D) and Removal Capacity (E) (mg Cr/g DW) after 24h of metal exposure at pH 2. A) and C) Cr (VI) disappearance measured by the diphenylcarbazide method. D) Total Cr determined by AAS. ND: Not Detectable. Cr (III) concentration was calculated from the difference between Cr (VI) disappearance and Cr removal. There were not statistically significant differences between WT and CRS treatments. CRS, chromium resistant strain; WT, wild type.