



Departament de Genètica i Microbiologia
Facultat de Biociències

**Papel de los consorcios entre microorganismos
fotótrofos y análisis de su potencial para
bioreparar ambientes contaminados por metales
pesados**

Álvaro Javier Burgos Arcos

2013



Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

**Papel de los consorcios entre microorganismos
fotótrofos y análisis de su potencial para
bioreparar ambientes contaminados por metales
pesados**

Memoria de Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Biotecnología
por la Universidad Autónoma de Barcelona, por Álvaro Javier Burgos Arcos

VºBº de los directores de Tesis

Dra. Isabel Esteve Martínez

Dr. Antonio Solé Cornellà

Bellaterra, junio del 2013

Agradecimientos

Presento profundos agradecimientos a mis Directores de Tesis: Dra. Isabel Esteve Martínez y Antonio Solé Cornellà, por su inmenso apoyo, paciencia y rigurosidad científica. Gracias por su amistad.

Agradecimiento especial a la Universitat Autònoma de Barcelona, al proyecto E2NHANCE, Programa Erasmus Mundus. Unión Europea.

A todos y cada uno de los maravillosos seres humanos, funcionarios, compañeras y compañeros de la UAB, que compartieron conmigo tanto sus vidas académicas como sus alegrías durante estos 34 meses.

En conjunto con mis agradecimientos, le dedico la culminación de esta valiosa etapa a toda mi familia, a mi hermano menor Mario, a mi Madre y Padre que Dios los tiene en su Gloria.

Gracias a mi amada esposa Merceditas y, por supuesto, muchas Gracias a los frutos de nuestro Amor, Viviana y Javier, excelentes hijos y, mejor aún, excelentes ciudadanos.

Y aquí, y ahora me uno a las palabras de Fausto:

“También esta noche, tierra, permaneciste firme.

Y ahora renaces de nuevo a mí alrededor.

Y alientas otra vez en mí, la aspiración de luchar sin descanso

por una altísima existencia”

Y... a las de Séneca, las cuales siempre orientaron mi estilo de vivir:

“El hombre feliz no es el hombre que ríe, sino aquel cuya alma llena de alegría y confianza, se sobrepone y es superior a los acontecimientos.”

Dedicación especial para todos los seres humanos que aman el conocimiento.

Summary

This article presents an evaluation of the bioremediation capacity of three cyanobacteria, two of which are from the Pasteur Culture Collection: *Spirulina* sp. PCC 6313 (Sp) and *Chroococcus* sp. 9106 PCC (Ch), and two isolates from the Ebro delta: one cyanobacterium DE2011 (Ge) and one microalga DE2009 (Sc).

The capacity of consortia to tolerate or resist (T-R) the presence of metals has been measured, and their capacity to uptake them has been determined. To do this, two consortia have been used, one made up of a mixture of two cultures, Sp+Ch, and second by mixing the other two, Ge+Sc.

The aforementioned microorganisms have been used to achieve the objectives, as from previous works carried out by our group, it is known that all of them, including those from the collection, are found in abundance in the Ebro delta, particularly *Geitlerinema* sp. DE2011, a filamentous cyanobacterium that contributes to the stabilization of the delta sediments.

The metals tested for the selection of microorganism with biorepair potential in this work were: lead (Pb (II)) copper (Cu (II)), since these two metals have been detected in the Ebro river.

High resolution microscopy techniques (optical and electronic) have been specifically used to achieve the study objectives, as well as conventional ecological microbial methods and molecular techniques to identify the two microorganism isolates of the Ebro delta. These microorganisms have been identified as, *Geitlerinema* sp. DE2011 and *Scenedesmus* sp. DE2009.

To determine the T-R to the metals of all the microorganisms and consortia tested, the *in vivo* effect of both metals on the photosynthetic pigments has been analyzed in all those in separate cultures and forming consortia. To do this, a confocal laser microscopy (CLSM) and its *λscan* function coupled to a spectrofluorometric detector has been used.

The results indicate that all the microorganisms tested are more T-R to lead than copper, both in their individual growth and in forming consortia.

A scanning electronic microscope (SEM), a transmission electron microscope (TEM), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) microanalysis coupled to these two microscopes were used to determine the external and internal uptake of the metals. The results showed that all the microorganisms and consortia have the capacity to uptake both copper and lead in the cell envelopes formed by extra-polymeric substances, thus it may be concluded that the consortia growing microorganisms separately. On the other hand, intracellular uptake of lead is also produced on the polyphosphate granules in all cases, while the results for copper were not conclusive, since this metal is also found as an external contaminant to our sample.

Finally, the sensitivity of all the techniques was determined by contaminating the cultures and consortia with increasing concentrations of each metal, separately, and evaluating, in the case of the CLSM, the minimum dose of metal capable of altering chlorophyll *a* (chl *a*), a photosynthetic pigment used as a marker in each one of the separate microorganism and in the consortia.

The sensitivity of the technique was 1 nM for the CLSM-*λscan* and 10 nM for the SEM-EDX.

Taking into account all the results obtained, it may be concluded that the microorganisms studied can be potential biorepairers of contamination caused by copper as well as lead, since: they are found in the natural habitat (including those selected from the Pasteur Culture Collection); they have a high tolerance resistance, especially to lead, and are able to uptake metals. However, the resistance capacity and uptake of the metals are increased in the consortia in both cases, thus these latter should be especially considered in future investigations associated with the biorepair of contaminated natural environments.

Resumen

En este trabajo se ha evaluado la capacidad bioreparadora de tres cianobacterias, dos de ellas procedentes de la Colección de Cultivos Pasteur: *Spirulina* sp. PCC 6313 (Sp) y *Chroococcus* sp. 9106 PCC (Ch), y dos aisladas del delta del Ebro: una cianobacteria DE2011 (Ge) y una microalga DE2009 (Sc).

Por primera vez, se ha ensayado la capacidad de los consorcios, asociaciones de microorganismos, para tolerar o resistir (T-R) la presencia de metales y para determinar su capacidad para captarlos. Para ello se han utilizado dos consorcios, uno formado por una mezcla de dos cultivos: Sp+Ch y el segundo por la mezcla de otros dos: Ge+Sc.

Para la consecución de los objetivos se han utilizado los microorganismos mencionados, ya que por trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se conoce que todos ellos, incluso los de colección, se encuentran en abundancia en el delta del Ebro, especialmente *Geitlerinema* sp. DE2011, una cianobacteria filamentosa que contribuye a la estabilización de los sedimentos deltaicos.

En este trabajo, los metales ensayados para la selección de microorganismos con potencial bioreparador, han sido: el plomo (Pb (II)) y el cobre (Cu (II)) ya que los dos metales se han detectado en el río Ebro.

Se han utilizado para los objetivos propuestos, específicamente técnicas microscópicas de alta resolución (óptica y electrónica) además de los métodos de ecología microbiana convencionales y de técnicas moleculares para la

identificación de los dos microorganismos aislados del delta del Ebro. Estos microorganismos se han identificado como: *Geitlerinema* sp. DE2011 y *Scenedesmus* sp. DE2009.

Para determinar la T-R a los metales de todos los microorganismos ensayados y de los consorcios se ha analizado el efecto *in vivo* de ambos metales sobre los pigmentos fotosintéticos de todos ellos en cultivos separados y formando los consorcios. Para ello, se ha utilizado la microscopía láser confocal (CLSM) y su función *λscan* acoplada a un detector espectrofluorométrico.

Los resultados indican, que todos los microorganismos ensayados tanto en su crecimiento individual como formando consorcios, son más T-R al plomo que al cobre.

Con el fin de determinar la biocaptación externa e interna de los metales, se ha utilizado la microscopía electrónica de barrido (SEM), la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el microanálisis de energía dispersiva por rayos X (EDX) acoplada a estos dos microscopios. Los resultados demuestran, que todos los microorganismos y los consorcios tienen la capacidad de captar tanto el cobre, como el plomo en las envueltas celulares formadas por sustancias extrapoliméricas, de lo que puede concluirse que los consorcios potencian la capacidad de captación más eficazmente, que los microorganismos creciendo separadamente. Por otra parte también en todos los casos se produce captación intracelular de plomo, en las inclusiones de polifosfato, mientras que los resultados para el cobre se han considerado no

concluyentes, ya que este metal se encuentra también como contaminante externo a la muestra.

Finalmente, se ha determinado también la sensibilidad de las técnicas utilizadas, contaminando los cultivos y los consorcios con concentraciones crecientes de cada metal por separado y evaluando en el caso del CLSM, la mínima dosis de metal capaz de alterar la clorofila *a* (chl *a*), pigmento fotosintético utilizado como marcador en cada uno de los microorganismos por separado y en los consorcios.

La sensibilidad de la técnica es de 1 nM para el CLSM- λ scan y de 10 nM para el SEM-EDX.

Considerando todos los resultados obtenidos, se puede concluir que los microorganismos estudiados pueden ser potenciales bioreparadores de contaminación, causada tanto por cobre como por plomo, ya que: se encuentran en el hábitat natural (incluso los seleccionados de la colección de cultivos Pasteur); presentan una alta tolerancia-resistencia especialmente al plomo y son capaces de captar ambos metales. No obstante, la capacidad de resistencia y de captación de los metales se incrementa en los consorcios en ambos casos, por lo que debería considerarse especialmente estos últimos en investigaciones futuras, relacionadas con la bioreparación de ambientes naturales contaminados.

Indice

1. Introducción.	21
2. Material y Métodos.	33
2.1. Caracterización y lugar de muestreo de los tapetes microbianos del delta del Ebro.	33
2.2. Microorganismos y medios de cultivo.	35
2.3. Preparación de las soluciones de metales y condiciones de contaminación de los cultivos	37
2.4. Técnicas de biología molecular aplicadas a la identificación de los microorganismos aislados.	40
2.5 Técnicas de microscopía de alta resolución.	43
2.5.1. Microscopía láser confocal (CLSM).	43
2.5.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	44
2.5.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	45
2.5.4. Microanálisis por espectrometría de energía dispersiva de Rayos X (EDX).	46
2.6 Análisis estadístico.	48
3. Resultados	49
3.1 Identificación de microorganismos aislados del delta del Ebro.	51

3.1.1. Identificación de la cianobacteria DE2011.	51
3.1.2. Identificación de la microalga DE2009.	52
3.2. Resultados presentados como artículos.	55
3.2.1. Sensibilidad de las técnicas de microscopía utilizadas.	55
3.2.2. Optimización de los protocolos utilizados en microscopía de alta resolución.	59
3.3. Resultados presentados como artículos.	63
3.3.1. The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined in vivo and at cellular level by confocal laser microscopy.	63
3.3.2. Scanning Electron Microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray detector to study copper removal on different phototrophic microorganisms.	83
3.3.3. Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester heavy metals.	105
4. Discusión.	107
5. Conclusiones.	121
6. Artículos publicados.	

Anexo I: Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester heavy metals.	145
Anexo II: Medios de cultivo.	181
Referencias.	185

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Introducción: En este capítulo se hace una revisión de la problemática ambiental que supone la contaminación por metales de ríos y sedimentos y de las metodologías utilizadas para paliar dicho problema. El estudio se centra en el Río Ebro y en particular en los tapetes microbianos del delta del Ebro, que reciben finalmente los contaminantes que arrastra el río y que proceden de la utilización de plaguicidas en las zonas agrícolas y de la contaminación industrial. Finalmente se describen los objetivos de la tesis, que se fundamentan en la selección de microorganismos con capacidad para captar metales y la importancia de los consorcios en la bioreparación de cultivos contaminados, especialmente por dos metales, el cobre y el plomo que se han seleccionado por su toxicidad. La finalidad es analizar el papel que la microalga y las cianobacterias tienen en la bioreparación de metales, ya que dichos microorganismos son los más abundantes en los tapetes microbianos, a la vez que son responsables de la estabilización de los ecosistemas deltaicos.

Material y métodos: En el capítulo de Material y métodos se describe el ambiente natural estudiado; los microorganismos seleccionados tanto los que provienen del ambiente natural como de la colección de cultivos Pasteur y la preparación de los medios de cultivo y de las soluciones de metales ensayadas.

Se hace especial énfasis en la optimización de la preparación de las mezclas de microorganismos (consorcios) para determinar tanto su capacidad de tolerancia-resistencia frente a los metales como su habilidad para biocaptarlos.

Las técnicas de microscopía de alta resolución: óptica (microscopía láser confocal) y electrónica: de barrido y de transmisión acopladas a un difractor de Rayos X se describen también en esta sección, así como su optimización para los ensayos en consorcios. Finalmente se describen también las técnicas de biología molecular utilizadas para la identificación de los microorganismos aislados de los tapetes microbianos del delta del Ebro: la cianobacteria DE2011 y la microalga DE2009. La identificación se ha hecho en colaboración con la Dra. Asunción de los Rios, Científica Titular adscrita al Instituto de Recursos Naturales, Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), Madrid, España.

Resultados: Los resultados se han estructurado en tres secciones que se corresponden con: la identificación molecular de los microorganismos aislados del delta del Ebro; la optimización metodológica y los resultados presentados como artículos en los apartados 3.3.1; 3.3.2 y 3.3.3.

Discusión general: En este capítulo se discuten de manera relacionada los tres artículos y se comparan los resultados obtenidos en los consorcios con respecto a los encontrados en cultivos separados, para determinar si los consorcios tienen un mayor potencial bioreparador. Este apartado contiene tablas comparativas sobre la resistencia al plomo y al cobre y la biocaptación de metales de cada microorganismo en los consorcios con la finalidad de determinar si estos últimos potencian o inhiben la capacidad de bioreparar ambientes contaminados por metales.

Conclusiones.

Finalmente de los resultados obtenidos se extraen las conclusiones más relevantes, tanto metodológicas como experimentales.

1. Introducción.

El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido evaluar el papel de las asociaciones entre microorganismos para la detoxificación de metales en ecosistemas contaminados. Estas asociaciones, denominadas consorcios, establecen relaciones de simbiosis entre los microorganismos que los componen, para metabolizar de manera más efectiva distintos tipos de contaminantes.

El término *Simbiosis* fue utilizado por primera vez en 1879 por el micólogo Alemán Heinrich Anton de Bary, quien la definió como “la convivencia de organismos diferentes”. A pesar de algunas controversias que se desprenden de este concepto, se puede afirmar que, la *Simbiosis* generalmente describe relaciones estrechas y de largo plazo entre diferentes especies biológicas. No obstante, las relaciones de simbiosis que se establecen entre los microorganismos pueden ser de distintos tipos: positivas (sintrofia, sinergismo), negativas (parasitismo, predación) y neutras (comensalismo).

El término sintrofia (que define la actividad metabólica complementaria entre microorganismos) fue utilizado por primera vez para describir el intercambio de compuestos de azufre entre los microorganismos fotótrofos (bacterias rojas y verdes del azufre) y los microorganismos quimiolitótrofos oxidadores de azufre. También se produce sintrofia en los ambientes metanogénicos en los que el hidrógeno y el formiato son utilizados como fuente de energía por las bacterias metanógenas, que producen CO_2 y CH_4 .

Los microorganismos que se asocian para llevar a cabo estos procesos forman consorcios, siendo crucial el papel de estos por ejemplo en el ciclo del

carbono. Así las bacterias oxidadoras de metano controlan la producción de este gas, que tiene un claro efecto en el calentamiento global del planeta (Banfield et al., 1998).

Adicionalmente, las relaciones simbióticas pueden ser obligadas o facultativas. En la primera de ellas, la relación es fundamental para la supervivencia de uno de los organismos y en la segunda la asociación causa un beneficio, pero no es esencial para ninguno de ellos (Zhiyong, 2009).

En la naturaleza es muy frecuente encontrar a los microorganismos asociados entre ellos y complementándose metabólicamente para un mayor aprovechamiento energético, pero también estableciendo asociaciones con organismos superiores. Un ejemplo de ello son las cianobacterias, que mantienen asociaciones con microorganismos heterótrofos, pero también con animales y plantas marinas: ascidias, poríferos y algas entre otros organismos vivos. Las cianobacterias juegan un papel muy importante en la fijación del CO₂ y del nitrógeno y en los ciclos biogeoquímicos (Pearl, 1996; Lindquist et al., 2005); y también en la producción primaria de los ecosistemas. Estos microorganismos producen abundante materia orgánica y oxígeno, por lo que establecen fácilmente relaciones de simbiosis con microorganismos quimioorganoheterótrofos respiradores de oxígeno. Además en la naturaleza existen diferentes ejemplos de bacterias, no solo capaces de atacar y degradar otras bacterias, sino también de lograr relaciones simbióticas estables con diferentes organismos eucariotas (Esteve & Gaju, 1999).

En la actualidad, se reconoce que los ciclos de la mayoría de elementos de la tabla periódica se afectan, directa o indirectamente, por las actividades

microbianas y que probablemente, ellos han sido los agentes responsables de más del 85% de los cambios geoquímicos en la historia de la tierra (Gadd, 2010).

Considerando lo expuesto, cabe resaltar que los microorganismos ya sea de manera individual o en asociaciones desempeñan papeles clave en la geoactividad de la biosfera, en particular en la biotransformación de los elementos, especialmente de metales y minerales, tanto en su descomposición, como en la formación de suelos y sedimentos.

Los microorganismos mediante su actividad metabólica también efectúan cambios en la especiación, la toxicidad y la movilidad de los metales, al estar asociados a la biomasa celular, y a las rocas y minerales lo que puede tener consecuencias beneficiosas o perjudiciales para los seres vivos (Gadd, 2010). Algunos de los papeles más representativos que realizan los microorganismos en los ciclos de los metales y otros elementos se pueden observar en la Tabla 1.1. donde se destaca que la mayoría de ellos pueden ser acumulados mediante su asociación con la biomasa microbiana dependiendo de las condiciones ambientales; que los microorganismos poseen sistemas de transporte metabólicos para metales esenciales y que los no esenciales también pueden ser captados a través de estos mismos mecanismos.

En el mismo sentido se debe destacar, que la contaminación por metales y otros contaminantes, como los vertidos de petróleo en los ecosistemas marinos y costeros se han convertido en un grave problema medioambiental a nivel global y que son una consecuencia adicional de la contaminación, que generan las industrias y la agricultura, tanto en mares como en lagos y ríos y, que luego se acumulan en el agua y en los sedimentos

Tabla 1.1. Relación de los microorganismos y los ciclos biogeoquímicos de algunos metales y otros elementos (Gadd, 2010).

Elementos	El papel de los microorganismos en el ciclo de los elementos.
C,H,O	Captación, asimilación, degradación y metabolismo de compuestos orgánicos e inorgánicos; respiración (producción CO ₂); fotosíntesis; fijación CO ₂ ; biosíntesis de polímeros, excreción de metabólicos orgánicos e inorgánicos; formación de humus; formación de oxalatos; ciclo del oxalato-carbonato; disolución de carbonatos; metanotróficos; metalogénesis (arquea); degradación de hidrocarburos; degradación de órgano metales y metaloides y su biometilación y desmetilación; oxidación de xenobióticos; utilización de CO; asimilación de agua; transporte de agua, translocación y conducción (hongos y micelios); producción y oxidación de hidrógeno.
N	Descomposición compuestos nitrogenados; asimilación y transformación compuestos de N orgánicos e inorgánicos; fijación de N ₂ (solo procariotas); nitrificación y desnitrificación; oxidación de amonio y nitritos; nitrificación aeróbica; biosíntesis de biopolímeros que contienen nitrógeno. Producción quitina; gases y metabolitos que contienen nitrógeno; NO ₂ ; fermentación de amonio en anaerobiosis, transferencia de N por micorrizas a plantas (hongos); transferencia de N fijado para plantas (fijadores simbióticos N ₂).
P	Disolución de fosfatos inorgánicos y minerales que contienen P en suelos y rocas; descomposición de compuestos orgánicos que contienen P; formación de fósforo insoluble como polifosfatos y minerales fosfatados secundarios; liberación de fósforo unido a sustancias orgánicas fosfatadas; transformación de fósforo orgánico del suelo; producción de difosfatos y fosfanatos; transferencia de P a plantas (micorrizas).
S	Degradación de compuestos orgánicos que contienen S; transformación de S orgánico - inorgánico; captación y asimilación de compuestos orgánicos e inorgánicos de S; sulfuro génesis; acumulación de S; SO ₂₋₄ reducción y asimilación; reducción de S; oxidación de compuestos reducidos de S como tiosulfato, tetratiónato; oxidación de H ₂ S hasta S; reducción de S hasta H ₂ S; disolución de minerales que contienen S en suelos y rocas como sulfatos y sulfitos.
Fe	Biometeorización de minerales que contienen hierro en rocas y suelos; solubilización de Fe mediante sideróforos, ácidos orgánicos, metabolitos, etc., reducción de Fe (III) a (II) oxidación de Fe(II) a Fe(III); biomineralización de Fe como óxidos, carbonatos, sulfitos, oxalatos; adsorción de metales por óxidos de Fe.
Mn	Oxidación de Mn (II) e inmovilización de óxidos de Mn (IV); reducción de Mn (IV) reducción indirecta de Mn (IV) mediante metabolitos, como oxalatos; bioacumulación de óxidos de Mn en superficies y en exopolímeros; bioabsorción; bioadsorción; precipitación intracelular; biomineralización de Mn.
Cr	Reducción de Cr (VI) hasta Cr (III); oxidación de Cr (III); acumulación de Cr.
Mg, Ca, Co, Ni, Zn, Cd	Biometeorización de minerales en rocas y suelos; bioabsorción; captación y bioadsorción; bioprecipitación como oxalatos, sulfitos, fosfatos, carbonatos; reducción de Co (III).
K, Na, Cs	Toma y acumulación; translocación a través de micelios (hongos); concentración en frutas (hongos); movilización desde minerales en el suelo.
Cu	Movilización desde minerales que contienen Cu en rocas y suelos; formación de CuSO ₄ ; bioabsorción; captación y bioadsorción; bioprecipitación como oxalatos.
Pb	Bioabsorción; formación de oxalatos de plomo; biometilación.
Cl, Br, I	Biometilación; acumulación en biomasas.
Sn	Absorción y bioadsorción de especies de Sn solubles; biometilación.
Au	Reducción de especies de Au solubles hasta Au (0); solubilización y dispersión de minerales que contienen Au.
Hg	Biometilación de Hg; reducción de Hg (II) hasta Hg (0); oxidación de Hg (0) hasta Hg (II); volatilización de Hg en forma de Hg (0); degradación de órgano mercuriales; bioabsorción.
Al	Movilización de Al en suelos y rocas; disolución de aluminosilicatos; precipitación de Al como óxidos (etapa temprana de bauxitización; bioadsorción).
Si	Captura de especies solubles de Si; formación de complejos orgánicos de Si desde silicatos inorgánicos; formación de siloxanos orgánicos; degradación de aluminosilicatos silica y silicatos; movilización de Si a través de la producción de quelatos, ácidos, bases, exopolímeros; silificación; biomineralización estructural (algunas algas y protozoos).

(Mateo et al., 1997; Prego & Cobelo-García, 2003; Martínez-Alonso & Gaju, 2005; Bouza-Deaño, 2008; Montouri et al., 2013). De ahí la importancia del desarrollo de tecnologías entre ellas la bioremediación de metales por microorganismos, la cual se basa en la utilización de organismos vivos para la detoxificación de la contaminación orgánica e inorgánica de los ecosistemas contaminados. En el caso de los metales, la inmovilización o la transformación de contaminantes metálicos y de radionúclidos por microorganismos es un tema que suscita gran interés (Banfield et al., 1998; Volesky, 2007; Moreno-Garrido, 2007; Gadd, 2010; Deniz et al., 2011; Boluda et al., 2011). Los principales mecanismos mediante los cuales las bacterias reaccionan ante los metales pesados del medio circundante se observan en la Fig. 1.1.

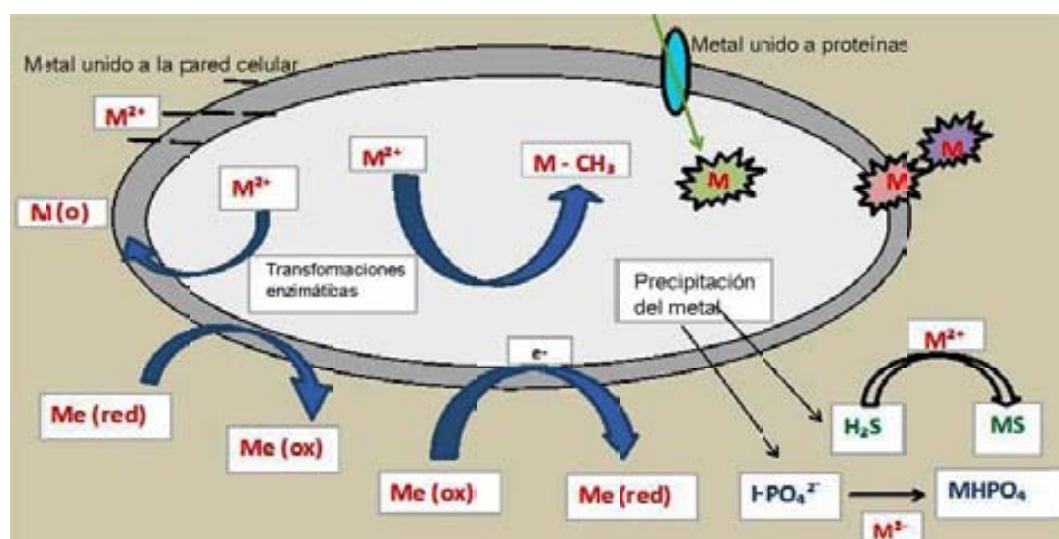


Fig. 1.1. Mecanismos de interacción de los microorganismos con los metales pesados (Valls & De Lorenzo, 2002).

De acuerdo con lo anterior, es importante destacar que los metales se pueden agrupar en tres grandes categorías: (i) Metales esenciales y

básicamente no tóxicos, como por ejemplo Ca y Mg; (ii) metales esenciales, pero tóxicos en altas concentraciones, como: Fe, Mg, Zn, Cu, Co, Ni y Mo y (iii) metales tóxicos, en bajas concentraciones, como Hg, Cd y Pb (Valls & De Lorenzo, 2002).

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado, desde hace muchos años, los tapetes microbianos que se encuentran en la desembocadura del río Ebro, un río no exento de la problemática de la contaminación por metales. El río Ebro conforma en su tramo final uno de los deltas más extensos del Mediterráneo con 320 km² de superficie aproximada (Fig. 1.2). El delta del Ebro presenta una forma triangular y lobulada, configuración que es el resultado de la interacción entre los procesos de sedimentación fluvial, las corrientes marinas, la climatología y la acción humana. Dicho delta forma parte de la Lista de Zonas Húmedas de Importancia Internacional (Convención Ramsar), un tratado intergubernamental que está en vigor desde 1975 para la protección de las zonas húmedas del mundo.

Los tapetes microbianos del delta del Ebro son ecosistemas estratificados bentónicos de pocos milímetros de grosor y que presentan diferentes coloraciones debidas a los pigmentos fotosintéticos de los microorganismos fotótrofos que son mayoritarios en estos ecosistemas. Las cianobacterias se sitúan en las capas más altas (capa verde) en las que incide la luz, dando un color verde intenso a los tapetes, las bacterias fotótrofas anoxigénicas (capa roja), en las capas intermedias donde además de utilizar la luz como fuente de energía, también utilizan el sulfhídrico como fuente de poder reductor. Este gas asciende desde las capas inferiores procedente de la actividad de las bacterias reductoras de sulfato que lo producen al utilizar el

sulfato como aceptor final de electrones. Estas bacterias se encuentran en las capas más profundas del tapete, que adquiere un color negruzco, al combinarse el sulfhídrico con el hierro presente en estos hábitats formando sulfuros metálicos (Esteve et al., 1992; Guerrero et al., 1993; Esteve et al., 1994; Guerrero et al., 1999).



Fig. 1.2. Imagen aérea de la desembocadura del río Ebro. (Fuente: Oficina catalana cambio climático. 2008).

En cuanto a las actividades que se realizan en el delta, la agricultura constituye una de las bases de su economía, que se encuentra fundamentada en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*). El porcentaje de cultivos por superficie y su comparación frente al porcentaje de otros cultivos aparece representado en la Fig. 1.3.

Por otra parte, en el cultivo del arroz se utilizan plaguicidas donde el cobre está presente y es altamente tóxico, inclusive a pequeñas dosis para las cianobacterias filamentosas, que son las responsables de la estabilidad de los

sedimentos del delta del Ebro, siendo éste uno de los motivos por el cual se ha seleccionado el cobre para este trabajo. Igualmente, se ha estudiado también el efecto del plomo sobre los microorganismos, ya que este metal, además de otras fuentes, se ha detectado en el agua por la antigua costumbre de usar proyectiles de éste en la caza de aves acuáticas (Mateo et al., 1997; Sánchez-Chardi et al., 2007; Bouza-Deaño et al., 2008)). Por todo lo expuesto es importante tratar de innovar tecnologías que pretendan mitigar los daños medio ambientales, causados por este tipo de contaminantes, mediante microorganismos como los ya mencionados.



Fig. 1.3. Porcentaje del área dedicada al arroz con respecto a otros cultivos. (Fuente: Oficina catalana cambio climático 2008).

Tal y como se indicó con anterioridad, los tapetes microbianos en general son especialmente sensibles a la acción de los metales, presentes en pesticidas y algunos fertilizantes, especialmente el plomo presente en abonos químicos fosfatados (Webber et al., 1984; Alloway et al., 1988; Nziguheba & Smolders, 2008) y en otros contaminantes. Se debe tener presente que la

acumulación de metales en sistemas naturales puede ser utilizada tanto por organismos vivos como por no vivos, además de encontrarse en forma de partículas en solución en la columna de agua, o en la fracción sedimentaria (Lovley, 2000). Todo ello determina en gran medida los criterios de aplicación de tecnologías para la identificación de microorganismos que puedan ser utilizados como bioindicadores y/o bioremediadores de ambientes contaminados.

En recientes trabajos, nuestro grupo de investigación ha demostrado que diferentes microorganismos fotótrofos, aislados de los tapetes microbianos del delta del Ebro, presentan la capacidad de tolerar o resistir (T-R) metales, especialmente plomo, cobre y cromo, así como la capacidad de bioadsorberlos (acumulándolos extracelularmente) y/o bioabsorberlos (acumulándolos intracelularmente). Es por ello que se han considerado, estos microorganismos, como potenciales bioindicadores o bioreparadores de ambientes naturales (Burnat et al., 2010; Maldonado et al., 2011; Puyen et al., 2011; Seder et al., 2012). Estos resultados se obtuvieron mediante la aplicación de diferentes tecnologías basadas en la microscopía láser confocal (CLSM y su función *λscan*) y la microscopía electrónica, tanto de barrido (SEM), como de transmisión (TEM), las dos últimas acopladas a un detector de dispersión de energía de rayos X.

Previamente se identificaron los microorganismos aislados directamente del ambiente natural mediante métodos de biología molecular.

No obstante, y a pesar de la amplia información aportada, se sabía muy poco del comportamiento de los consorcios en la bioreparación de metales, ya

que la mayoría de los trabajos publicados, tanto por otros autores como por los de nuestro grupo, se fundamentaban en su mayoría en analizar el efecto y la captación de estos en cultivos axénicos.

La mayor parte de los trabajos publicados se han realizado en cultivos de laboratorio (Hana et al., 2006; Pandia et al., 2009; Guo et al., 2010; Li et al., 2011), ensayando diferentes tipos de microorganismos: hongos (Congeevaram et al., 2007; Sari et al., 2009); algas (Doshi et al., 2008; Mar Areco et al., 2010); y diferentes microorganismos procariotas tanto heterótrofos (Nakajima & Tsuruta, 2004; Choi et al., 2009; Li et al., 2011) como fotótrofos (Sharma et al., 2008; Aksua et al., 2009; Chao et al., 2011).

Por este motivo en la presente tesis doctoral el objetivo global del trabajo ha sido: Determinar la capacidad bioreparadora con respecto al cobre y al plomo de los consorcios formados por diferentes microorganismos fotótrofos. Para ello se ha evaluado en los consorcios: (i) su capacidad para Tolerar y Resistir (T-R) cada uno de los metales ensayados; (ii) su capacidad para biocaptarlos y, (iii) finalmente poder comparar estos resultados con los obtenidos por los mismos microorganismos en su crecimiento individual.

Para este trabajo se han seleccionado cuatro microorganismos, dos de ellos cianobacterias procedentes de la colección de cultivos Pasteur: *Spirulina* sp. PCC 6313 y *Chroococcus* sp. PCC 9106; y dos microorganismos aislados del ambiente natural: la cianobacteria DE2011, una cianobacteria filamentosa dominante en los tapetes microbianos del Delta y la microalga DE2009. Como metales a ensayar, se han seleccionado el cobre y el plomo por encontrarse en el río Ebro y por las características anteriormente mencionadas. También, se

han optimizado diferentes metodologías de microscopía de alta resolución: óptica y electrónica, especialmente para cada microorganismo y metal ensayado.

Finalmente, dado que la mayoría de trabajos publicados se refieren a la captación de metales por microorganismos en cultivos de colección, en esta tesis doctoral se ha hecho especial énfasis en el papel de los consorcios y en la utilización de microorganismos aislados directamente del hábitat natural o en el caso de los cultivos de colección, aquellos en los que se haya demostrado previamente que son abundantes en estos ambientes.

2. Material y métodos.

A continuación se describe el ecosistema original de estudio, los microorganismos y los protocolos de preparación de las soluciones de los metales utilizados en el presente trabajo. También se presentan las técnicas moleculares para la identificación de los microorganismos y las técnicas de microscopía de alta resolución para determinar la capacidad bireparadora de los microorganismos que forman los consorcios y finalmente los métodos estadísticos.

2.1. Caracterización y lugar de muestreo de los tapetes microbianos del delta del Ebro.

Los tapetes microbianos del delta del Ebro están localizados cerca de las Salinas de la Trinidad, en la Península de *Els Alfacs*, Tarragona (España). Dicha zona, protegida por una barrera de dunas se caracteriza por alternar periodos de inundación y desecación, y por presentar cambios drásticos en las condiciones ambientales, que normalmente son muy extremas para la vida. La temperatura del agua que cubre estos tapetes suele oscilar entre 12 y 30°C, la conductividad entre 59 y 105 mS.cm⁻¹, la salinidad entre 40 y 75 ‰ y el pH entre 7.5 y 9.0, estando expuestos a una media de precipitación anual de 500 L.m⁻² (Esteve et al., 1994; Diestra et al., 2004; Ministerio Medio Ambiente, España; 2005). La visión general de los tapetes microbianos así como la estructura laminar vertical característica de dichos tapetes, que se distribuyen en capas de distintas coloraciones principalmente debidas a los pigmentos fotosintéticos de las poblaciones dominantes, se pueden observar en las Figs: 2.1. a, b y c.



Fig. 2.1. Delta del Ebro, la flecha ubica la Península Els Alfacs (a), lugar de muestreo (b), estructura del tapete microbiano en el que se indican mediante flechas las diferentes capas. Imagen cortesía de J. Maldonado (2013) (c).

2.2. Microorganismos y medios de cultivo.

En el presente trabajo se han seleccionado 4 microorganismos fotótrofos: 3 de ellos son cianobacterias, 2 procedentes de la Colección de Cultivos Pasteur: *Spirulina* sp. PCC 6313 (Sp) y *Chroococcus* sp. PCC 9106 (Ch) (Figs. 2.2. a y d), y 1 procedente del ambiente natural, la cianobacteria DE2011 (Ge) (Fig. 2.3. a).

También se seleccionó la microalga DE2009 (Sc) (Fig. 2.3. d) aislada, como la cianobacteria anterior, de los tapetes microbianos del delta del Ebro. Estos microorganismos, se escogieron: por ser de fácil cultivo en el laboratorio, y por ser (tanto los de colección como los aislados) muy abundantes en los tapetes.

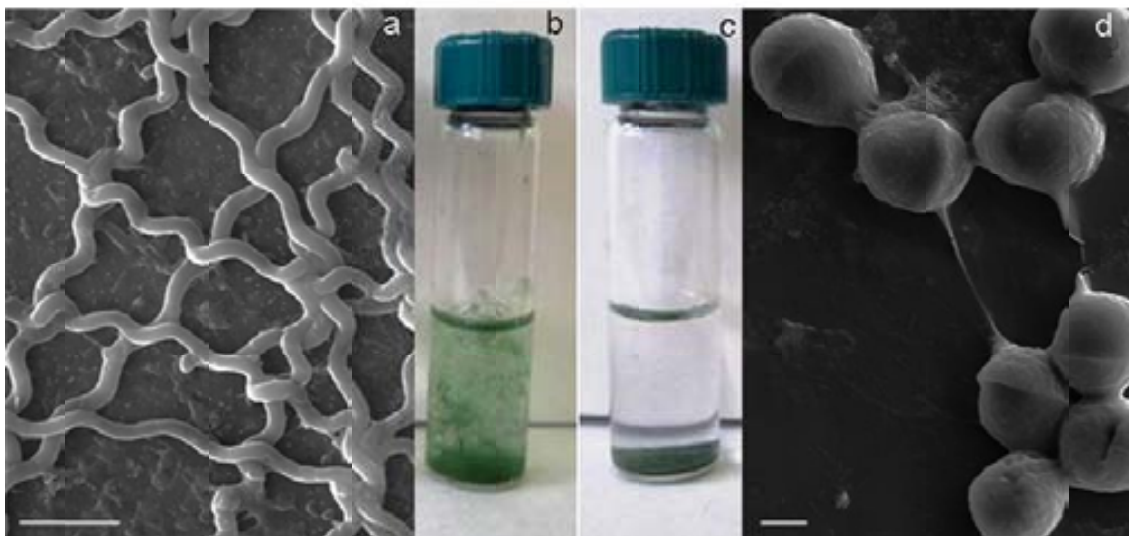


Fig. 2.2. Imagen obtenida por SEM de células de la cianobacteria *Spirulina* sp. PCC 6313 (a) y células de *Chroococcus* sp. PCC 9106 (d), crecidas en medio de cultivo líquido (b y c). Tamaño de las barras 10 μm .

Las dos cianobacterias de colección se cultivaron con los medios de cultivo mixto BG-11 y ASN III (1:1 v/v) cuya composición (Rippka et al., 1979),

se adjunta en el Anexo II. Mientras que la cianobacteria DE2011 y la microalga DE2009 crecieron en el medio de cultivo mineral Pfennig (Pfennig y Trüpper, 1992) (Anexo II). Todos los microorganismos se mantuvieron bajo condiciones de temperatura de 27°C y de iluminación de 15 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

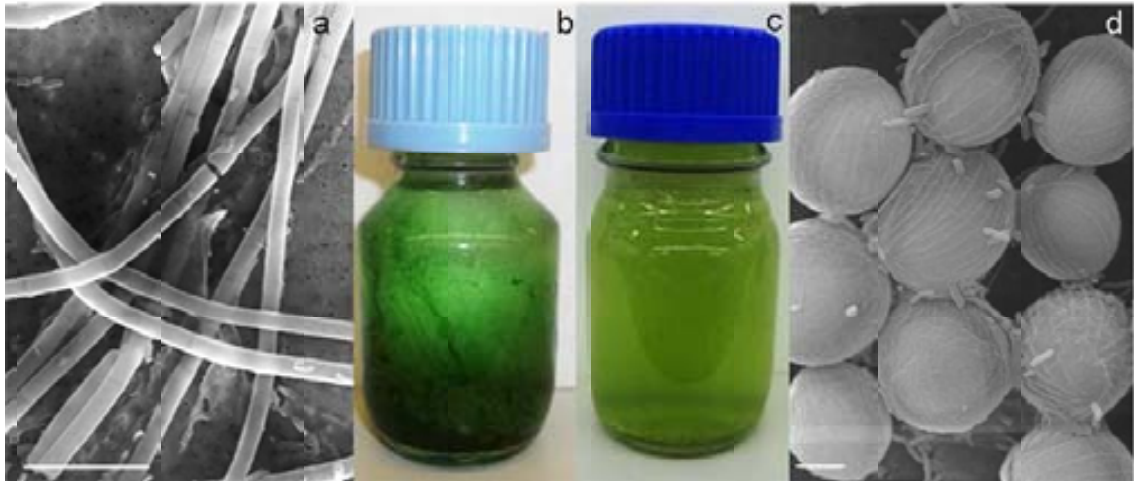


Fig. 2.3. Imagen obtenida por SEM de células de la cianobacteria DE2011 (a) y células de la microalga DE2009 (d) crecidas en medio de cultivo líquido (b y c). Tamaño de las barras 10 μm .

Además, para la preparación de los dos consorcios utilizados en este trabajo se mezclaron para el primer consorcio, 2 cultivos de las cianobacterias: *Spirulina* sp. PCC 6313 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 respectivamente, y para el segundo consorcio 2, cultivos de: la cianobacteria DE2011 y la microalga DE2009. Las condiciones de incubación fueron las mismas que se utilizaron para el crecimiento individual de estos microorganismos.

2.3. Preparación de las soluciones de metales y condiciones de contaminación de los cultivos.

Los metales cobre y plomo se seleccionaron para esta investigación en base a los criterios de ecotoxicidad y de impacto ambiental ya descritos en la Introducción. Para este trabajo las respectivas soluciones iniciales de cada uno de los metales a evaluar, se prepararon disolviendo las sales CuSO_4 y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en agua desionizada y esterilizada por filtración, utilizando filtros de membrana de policarbonato con poros de 0.22 μm de diámetro (Millipore, USA). Las concentraciones de las soluciones iniciales de cada metal fueron: 100 mM Cu y 100 mM Pb. A partir de éstas se realizaron diluciones seriadas para obtener las soluciones de las diferentes concentraciones que se han utilizado en este trabajo experimental. El agua Milli-Q utilizada se obtuvo a través de un equipo Milli-Q system (Millipore, USA). Las soluciones iniciales de cada metal se prepararon antes de su utilización.

Seguidamente, se describen las condiciones de contaminación para cada uno de los microorganismos seleccionados y sus respectivos consorcios.

Contaminación con cobre de los cultivos de *Spirulina* sp. PCC 6313 y de *Chroococcus* sp. PCC 9106.

Para determinar la T-R de las cianobacterias Sp y Ch al cobre y su capacidad para biocaptarlo; 2.5 mg de precipitado (obtenido de centrifugar un cultivo de cada uno de estos microorganismos a 8000 x g) se agregaron a 5 ml de la mezcla de los medios BG11 y ASNIII y se contaminaron con diferentes concentraciones de cobre. Los cultivos por separado se incubaron a 27°C y 15

$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante un período de 9 días. En cada caso se prepararon cultivos sin contaminar con el metal y se utilizaron como controles. El pH del medio se ajustó a 6.5 - 7, adicionando según cada caso NaOH 1 M o HCl 1 M. Las concentraciones de metales utilizadas para estos experimentos fueron: 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 3, 5, 7 y 10 μM de Cu.

Para todos los casos, las condiciones de incubación y los ajustes de pH de los cultivos se llevaron a cabo tal y como se indicó en el presente apartado, ya sea para el cultivo de los microorganismos por separado o en consorcio. Además, todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Contaminación con cobre de los cultivos de la cianobacteria DE2011 y de la microalga DE2009.

Para determinar la T-R de la cianobacteria Ge y la microalga Sc al cobre y su capacidad para biocaptarlo; 2.5 mg de precipitado (obtenido de centrifugar un cultivo de cada uno de estos microorganismos a 8000 x g) se agregaron a 9 ml de medio de cultivo mineral Pfennig y se contaminaron con diferentes concentraciones de Cu: 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 3, 5, 7 y 10 μM .

Contaminación con cobre del consorcio Sp+Ch.

Con el fin de determinar, la T-R del consorcio Sp+Ch, al cobre y su capacidad para captarlo extracelularmente, se aplicó el siguiente protocolo: al precipitado obtenido (2.5 mg) de centrifugar la mezcla de estos dos microorganismos a

8000 x g se le agregaron 5 ml de la mezcla de los medios BG11 y ASNIII y se contaminaron con diferentes concentraciones de cobre: 0, 1, 3, 5, 7 y 10 nM.

Contaminación con cobre del consorcio Ge+Sc.

Para la determinación de la T-R del consorcio Ge+Sc, al cobre y su capacidad para captarlo extracelularmente, se aplicó el siguiente protocolo: al precipitado obtenido (2.5 mg) de centrifugar la mezcla de estos dos microorganismos a 8000 x g se le agregaron a 9 ml de medio de cultivo mineral Pfennig y se contaminaron con diferentes concentraciones de cobre: 0, 0.1, 0.3, 1, 5 y 7 μ M.

Contaminación con plomo del consorcio Sp+Ch.

En el caso del plomo no se realizaron experimentos en cultivos separados ya que, se tenía esta información de artículos previos (Maldonado et al., 2010). Con el fin de determinar, la T-R del consorcio Sp+Ch, al plomo y su capacidad para captarlo tanto extra como intracelularmente, se aplicó el siguiente protocolo: al precipitado obtenido (2.5 mg) de centrifugar la mezcla de estos dos microorganismos a 8000 x g se le agregaron 5 ml de la mezcla de los medios BG11 y ASNIII y se contaminaron con diferentes concentraciones de plomo: 0, 0.1, 0.5, 0.75, 1 y 2 mM.

Contaminación con plomo del consorcio Ge+Sc.

Para el consorcio Ge+Sc, la T-R al cobre y su capacidad para captarlo tanto extra como intracelularmente, se determinó mediante el siguiente protocolo: al precipitado obtenido (2.5 mg) de centrifugar la mezcla de estos dos microorganismos a 8000 x g se agregaron 9 ml de medio de cultivo mineral Pfennig y se le contaminaron con diferentes concentraciones de plomo: 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 0.7 mM.

2.4. Técnicas de biología molecular aplicadas a la identificación de los microorganismos aislados.

En esta sección se indican los métodos, basados en técnicas moleculares, utilizados para identificar la cianobacteria DE2011 y la microalga DE2009 respectivamente. A partir de los cultivos celulares de ambos microorganismos se realizó su identificación gracias a la colaboración con la Dra. Asunción de los Rios, Científica Titular adscrita al Museo de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid, España.

A. Extracción de DNA, amplificación por PCR de los genes de rRNA de la cianobacteria DE2011, secuenciación y análisis filogenético.

El DNA genómico total del cultivo de la cianobacteria DE2011, se extrajo de acuerdo con el protocolo basado en bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) propuesto por Cubero et al., (1999). Este DNA fue empleado para la amplificación por PCR de la región del DNA ribosómico que codifica al gen 16S

del RNA ribosómico y de una sección de la región espaciadora intergénica 16S-23S, con el uso de dos cebadores específicos para cianobacterias: CYA359r y 373R (Nübel et al., 1997 & Janse et al., 2003). Para ello se preparó un volumen de reacción de 25 µl que contenía: 75 mM Tris a pH 9.0; 50 mM KCl; 20 mM $((\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4)$; 1 unidad de Taq polimerasa; 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTP; 0,4 mM de cada cebador; 100 µg de albúmina sérica bovina; 1,5 mM de MgCl_2 ; 5 µl de 5xTaq Maestro PCR Enhancer y aproximadamente 10-50 ng de DNA genómico. La temperatura de alineamiento fue de 60°C. Los productos obtenidos por la PCR se purificaron utilizando el UltraClean PCR Clean-Up Kit (Mobio Laboratories Inc.).

El DNA se secuenció en los dos sentidos (5'-3' / 3'-5'), con los mismos pares de cebadores utilizados en la etapa de amplificación, por MacroGen Laboratories Inc. (Corea del Sur). Con el fin de encontrar las secuencias homólogas más cercanas a las secuencias de la cianobacteria DE2011, estas fueron comparadas con secuencias presentes en la base de datos del GenBank utilizando la herramienta BLAST.

B. Extracción de DNA, amplificación por PCR de genes de rRNA de la microalga DE2009, secuenciación y análisis filogenético.

Para la identificación de la microalga DE2009 se utilizaron tres marcadores genéticos: (i) región del DNA ribosómico que codifica para el gen 18S del RNA ribosomal (ii) región del DNA ribosómico que codifica para el gen 23S del RNA ribosomal y (iii) los genes que codifican para la enzima Rubisco. El DNA genómico total se extrajo a partir del cultivo de la microalga DE2009 según el

protocolo de Cubero et al., (1999). Para facilitar el análisis filogenético posterior se extrajo también el DNA de cultivos de algas obtenidos de la Colección de Cultivos del Instituto de Botánica de la Academia de Ciencias de la República Checa, Centro de Ficología (CCALA). Los microorganismos de colección utilizados fueron *Apatococcus lobatus* CCALA 214, *Coelastrella multistriata* CCALA 309 y *Stichococcus bacillaris* CCALA 906.

Los fragmentos de los genes que codifican para: 18S rRNA, 23S rRNA y Rubisco se amplificaron por PCR utilizando el Kit comercial PureTq™ Ready-to-go™ PCR (Laboratories GE Healthcare) y los siguientes pares de cebadores: SR1 y SR12 (Nakayama et al., 1996) para el gen 18S rRNA; p23SrV_f1 y p23SrV_r1 (Presting, 2006) para el gen 23S rRNA y RH1 (Manhart, 1994) y rbc590 (Hayden et al., 2002) para el gen de la Rubisco. La Temperatura de alineamiento fue de 56°C, 45°C y 55°C respectivamente. Los productos de amplificación se purificaron utilizando el kit UltraClean PCR Clean-Up (Mbio Laboratories Inc.). Ambas direcciones de la cadena de DNA (5'-3' / 3'-5') se secuenciaron con los mismos pares de cebadores utilizados en la etapa de amplificación (Macrogen Laboratories Inc. Corea del Sur). Se preparó un alineamiento con las secuencias obtenidas en este estudio, 18S rRNA (1114 nts), rRNA 23S (nts 376) y Rubisco (527 nts), y secuencias de la base de datos GenBank utilizando los programas *Clustal X* (Thompson et al., 1997) y *G-blocks* (Castresana, 2000). Se realizó un análisis filogenético multigénico utilizando el software MrBayes.3: <http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes>. Para ello, se realizó en el alineamiento una partición en tres regiones correspondiente a los tres genes seleccionados y se utilizó el programa jModeltest (Posada, 2008) para la selección estadística de los modelos de

sustitución nucleotídica para cada uno de los marcadores genéticos. En el análisis se corrieron 200.000 generaciones, de las cuales fueron descartadas las 5000 primeras y con una frecuencia de muestreo de cada 100 generaciones. Como grupos externos de referencia se utilizaron las secuencias de *Chlorella variabilis*, *Apatococcus lobatus* (CCALA 214) y *Stichococcus bacillaris* (CCALA 906) para la adecuada construcción del árbol filogenético.

2.5. Técnicas de microscopía de alta resolución.

En este apartado se describen las técnicas de microscopía de alta resolución utilizadas en este trabajo para determinar la T-R de los diferentes microorganismos a los metales pesados, y su capacidad para captarlos externa y/o internamente.

2.5.1. Microscopía láser confocal (CLSM).

La T-R se determinó en cultivos individuales y en consorcios contaminados con diferentes concentraciones de cobre y plomo, mediante el microscopio láser confocal TCS SP5 AOBS (Leica Heidelberg, Alemania) acoplado a un detector espectrofluorimétrico.

La aplicación CLSM-*λscan* permitió el análisis *in vivo* del estado de los pigmentos fotosintéticos en células individuales de los microorganismos fotótrofos utilizados, tomando en cuenta la región de longitud de onda de emisión y la intensidad de la fluorescencia emitida (autofluorescencia). Las muestras se observaron utilizando un objetivo de inmersión de 63 aumentos.

En cada caso se obtuvo una secuencia de imágenes mediante la exploración de la misma sección óptica xy a lo largo de todo el espectro de luz visible. Las imágenes se adquirieron en la posición z en la cual la fluorescencia era máxima, y las condiciones del microscopio para obtener dichas imágenes fueron constantes durante todo el experimento. La excitación de la muestra se realizó con una fuente de luz láser de argón de 488 nm ($\lambda_{\text{exe}} 488$), cada 3 nm (λ_{step}) de longitud de onda a lo largo del espectro visible comprendido entre 550 y 750 nm, obteniéndose finalmente una secuencia de imágenes correspondientes a la fluorescencia detectada en cada λ de excitación utilizada. Con el fin de medir la intensidad de fluorescencia media emitida por los pigmentos fotosintéticos (Mean Fluorescence Intensity, MFI) de las imágenes $xy\lambda$, se utilizó la función *regions-of-interest* (ROIs) del programa informático Leica Confocal (Leica Microsystems CMS GmbH) y se analizaron 70 regiones de interés de $1 \mu\text{m}^2$ de las células de cada uno de los microorganismos evaluados. Finalmente, se determinó la dosis mínima de metal capaz de alterar significativamente la intensidad de fluorescencia en cada uno de los experimentos.

2.5.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

El microscopio SEM (*Scanning Electron Microscopy*) se utilizó para observar la estructura externa de las células de las cianobacterias de cultivos de colección: *Spirulina* sp. PCC 6313 y *Chroococcus* sp. PCC 9106, así como de los microorganismos fotótrofos aislados del ambiente natural: la cianobacteria DE2011 y la microalga DE2009 y los respectivos consorcios ya descritos con anterioridad. Las muestras de los cultivos (5 ml), tanto las contaminadas con

metales como las controles, se filtraron utilizando filtros Nucleopore de 0.22 μm de diámetro de poro que luego se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en tampón fosfato Millonig (Anexo III) durante 2 h a 4°C. Seguidamente las muestras se lavaron en el mismo tampón, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90, y 100 %) y se desecaron al punto crítico. A continuación se montaron sobre soportes metálicos y se sombrearon con oro para adquirir un mejor contraste de las muestras. Finalmente, todas las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6300 (Jeol, Tokio, Japón).

2.5.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El microscopio TEM (*Transmission Electron Microscopy*) se utilizó para observar la ultraestructura de *Spirulina* sp. PCC 6313 y *Chroococcus* sp. PCC 9106, así como de la cianobacteria DE2011 y la microalga DE2009 y los respectivos consorcios. Las muestras de los cultivos (5 ml), tanto las contaminados con metales como las controles, se centrifugaron a 8000 x g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. A continuación se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en tampón fosfato Millonig durante 2 h a 4°C, se lavaron en el mismo tampón, se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1 % (OsO_4) a 4°C durante 2 h y se lavaron de nuevo con el mismo tampón fosfato. Seguidamente las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 90, y 100 %) y se embebieron en resina Spurr. Una vez la resina estuvo polimerizada, se utilizó un piramidotomo (TM 60, C. Reichert AG, Wien, Austria) para piramidar las muestras y un ultramicrotomo (Leica EM UC6 ULTRACUT, Leica Microsystems, GmbH, Heidelberg, Germany) para obtener secciones ultrafinas

de cada una de ellas. Para obtener imágenes de mejor calidad, se realizaron cortes ultrafinos de 70 nm y se montaron en rejillas de cobre recubiertas de carbono que finalmente se tiñeron con citrato de plomo según el método descrito por Reynolds et al. (1963), excepto cuando el metal a determinar era el plomo. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón).

2.5.4. Microanálisis por espectrometría de energía dispersiva de rayos X.

El EDX (*Energy Dispersive X-ray*) es una técnica adecuada para el análisis elemental de muestras biológicas preparadas para microscopía electrónica. El análisis de rayos X emitidos una vez las partículas cargadas (electrones) colisionan con la muestra, permite conocer los elementos químicos superficiales, ya que la energía de los rayos X es específica para cada uno de ellos. Tras la colisión, un electrón de un orbital externo del elemento salta a un orbital vacío. La radiación producida por este salto de electrones entre orbitales tiene una propiedad fundamental, y es que la energía de los fotones emitidos (rayos X) está directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor. De este modo se puede asociar cada valor de energía emitida con un elemento químico de la tabla periódica. El número y la energía de los rayos X emitidos en una muestra se puede medir semicuantitativamente por un espectrómetro de dispersión de energía. Este detector, que puede estar acoplado tanto al SEM como al TEM, está conectado a un sistema informático que utiliza el programa INCA v.4.13 (Oxford Instruments, Bucks, Inglaterra), el cual genera gráficos espectrales con diferentes picos correspondientes a cada

uno de los elementos químicos presentes en el área analizada. Por lo general, el análisis de un área de la muestra se realiza en 60 segundos.

Sistema EDX acoplado al SEM:

El EDX acoplado al SEM (SEM-EDX) se utilizó para determinar la capacidad de los microorganismos fotótrofos evaluados para captar extracelularmente (bioadsorción) los metales cobre y plomo respectivamente. Para este análisis, las muestras siguieron el mismo protocolo de preparación que para el SEM convencional, como anteriormente se ha explicado. Para la observación de las muestras y su posterior análisis se utilizó una unidad de EDX Link Isis-200 (Oxford Instruments, Bucks, Inglaterra) acoplada a un microscopio SEM Zeiss EVO® MA 10 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany), operando a 20 kV.

Sistema EDX acoplado al TEM:

El EDX acoplado al TEM (TEM-EDX) se utilizó para determinar la capacidad de los microorganismos fototróficos evaluados para bioacumular (bioabsorción) los metales cobre y plomo. Para este análisis se utilizó el mismo protocolo de preparación de muestras que para el TEM antes mencionado, pero en este caso las secciones se hicieron aproximadamente de 200 nm. Estos cortes se montaron sobre rejillas de carbono recubierto con oro y/o titanio. Para la observación de las muestras y posterior análisis se utilizó una unidad de EDX

Link Isis-200 (Oxford Instruments, Bucks, Inglaterra) acoplada a un microscopio TEM Jeol Jem-2011 (Jeol LTD, Tokio, Japón), operando a 20 kV.

Tanto para el SEM como para el TEM, la detección de los metales cobre y plomo en cada espectro EDX obtenido en las muestras analizadas se determinó por la presencia de un pico principal de cada uno de ellos, a 8 Kv y 10,5 KeV de energía respectivamente.

2.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) aplicada a los valores de la MFI de los experimentos *λscan*. Además, se aplicaron las pruebas de Tukey y Bonferroni para el análisis intragrupal. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS (versión 19.0 para Windows).

3. Resultados.

En este capítulo se representan los resultados obtenidos considerando en primer lugar, la optimización de los métodos utilizados especialmente en la preparación de los consorcios de microorganismos para determinar la T-R de los mismos mediante el CLSM- λ scan. Se hace especial énfasis en las optimizaciones para la preparación de las muestras, y puesto que los consorcios los forman microorganismos fotótrofos y por tanto con autofluorescencia natural, se han realizado diferentes experimentos para evitar solapamientos entre la fluorescencia emitida por cada uno de ellos.

También se han optimizado los protocolos de preparación de muestras tanto para el SEM-EDX como para el TEM-EDX, considerando que también en este caso no se trata de cultivos individuales sino de mezclas de cultivos (consorcios). El objetivo es obviar las interferencias, que en la captación de metales por los distintos microorganismos, pueda crear el material de preparación (rejillas soporte, material de filtración, fijadores, etc.), así como la contaminación externa debida a los propios microscopios.

En esta tesis, también se ha determinado, por primera vez, la sensibilidad de los microscopios, es decir la mínima dosis de metal presente en una muestra, capaz de dar una señal que identifique el efecto del metal o su captación: en el caso del CLSM por variaciones significativas en la intensidad de fluorescencia media (MFI) y en el SEM-EDX y en el TEM-EDX por la detección de un pico correspondiente al metal ensayado en el espectro analizado. Para ello se ha estudiado un amplio rango de concentraciones de ambos metales, cobre y plomo, en los mismos microorganismos. Los resultados obtenidos se detallan en la sección 3.1.

Una vez optimizados los protocolos y antes de presentar los resultados obtenidos en la utilización de consorcios como posibles bioreparadores de metales, se han identificado los dos microorganismos aislados del ambiente natural por técnicas moleculares. Los resultados se indican en la sección 3.2.

Finalmente, en la sección 3.3, se presentan los resultados en forma de artículos y que constituyen el objetivo principal de esta tesis.

El objetivo global que era probar la eficacia de los consorcios en la bioreparación de metales, frente a los cultivos individuales se ha desarrollado en tres fases que se corresponden con los artículos presentados.

En el primer artículo: **The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined *in vivo* and at cellular level by confocal laser microscopy**, se ha determinado la T-R de los microorganismos ensayados en su crecimiento individual mediante el CLSM- $\lambda scan$. También se ha determinado la sensibilidad de esta técnica (apartado 3.3.1.)

En el segundo: **Scanning Electron microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray detector to study copper removal on different phototrophic microorganisms**, se ha ensayado la capacidad de los mismos microorganismos para captar metales extra e intracelularmente. Las técnicas utilizadas han sido el SEM-EDX y el TEM-EDX. Aunque en este artículo no consta la sensibilidad de ambas técnicas, los resultados obtenidos se han presentado previamente en el apartado 3.3.2.

Finalmente, en el tercer artículo: **Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester**

heavy metals, se ha probado la capacidad bioreparadora de los dos consorcios formados respectivamente por Sp+Ch y por Ge+Sc (apartado 3.3.3.). Para ello se han utilizado todas las metodologías previamente ensayadas en los apartados 3.3.1. y 3.3.2.

3.1. Identificación de los microorganismos aislados del delta del Ebro mediante técnicas de biología molecular.

La identificación de la cianobacteria DE2011 y la microalga DE2009, ambos microorganismos aislados del delta del Ebro, por técnicas moleculares se describen en esta sección.

3.1.1. Identificación de la cianobacteria DE2011.

A partir del DNA extraído del cultivo de la cianobacteria DE2011 y según los métodos descritos en la sección 2.4, se encontró una homología del 99 % de esta cianobacteria con las secuencias de la cianobacteria *Geitlerinema* sp. PCC 7105, en el 16S rRNA, de acuerdo con la base de datos del GenBank. El árbol filogenético obtenido se puede observar en la Figura 3.1.1. De acuerdo con estos resultados se ha identificado la cianobacteria como *Geitlerinema* sp. DE2011.

3.1.2. Identificación de la microalga DE2009.

Con respecto a la microalga DE2009, el análisis multigénico muestra que ésta forma parte de un clado, que se corresponde con el orden *Spharopleales*. Así la microalga forma un grupo con *Coelastrella multistriata* (CCALA 3009) y con *Scenedesmus* sp.1. Debido a que la sistemática de *Coelastrella* aún no está totalmente resuelta, y considerando un trabajo previo de Maldonado et al., (2010), que muestra las características morfológicas y estructurales de la microalga, se ha propuesto, a la espera de nuevos resultados, identificarla como un microorganismo perteneciente al género *Scenedesmus*. En la Fig.3.1.2, se representa el árbol filogenético de la microalga DE2009.

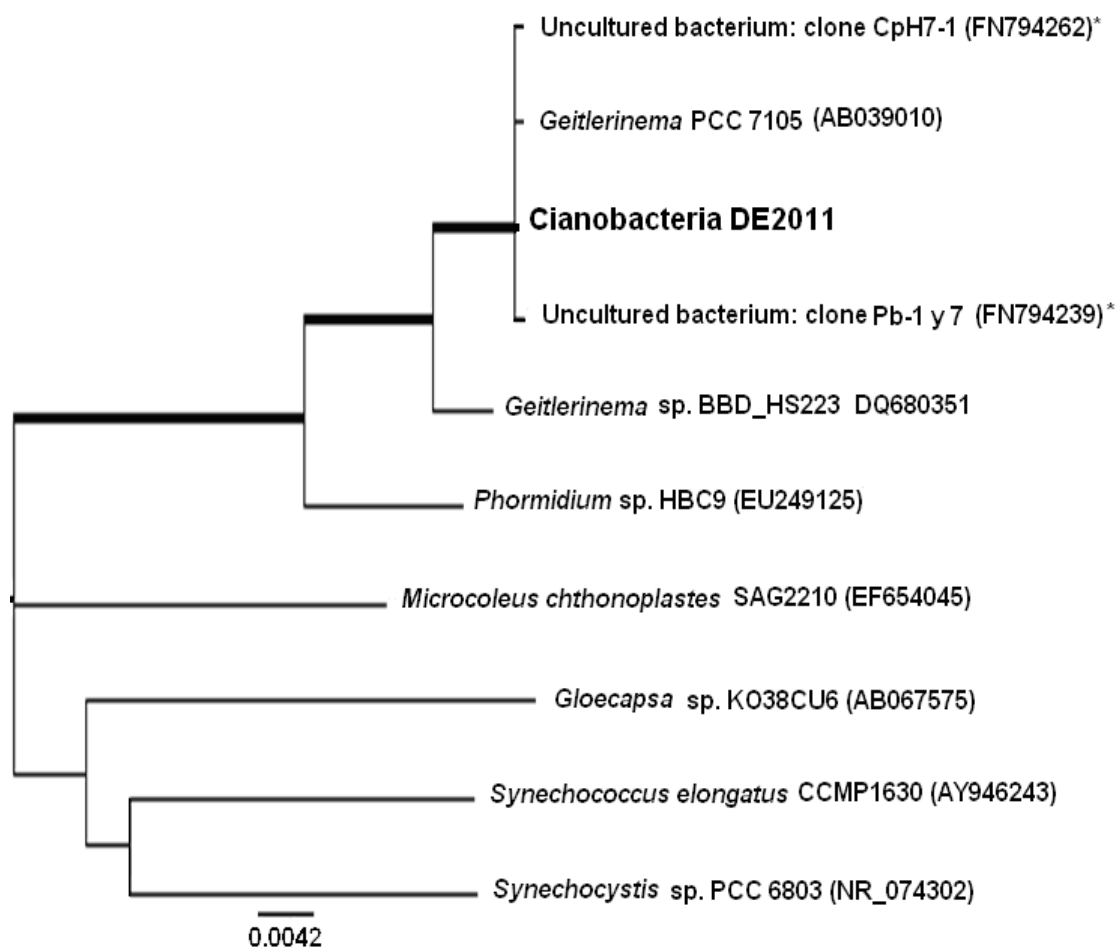


Fig. 3.1.1. Árbol filogenético de la cianobacteria DE2011 identificada como *Geitlerinema* sp. DE2011.

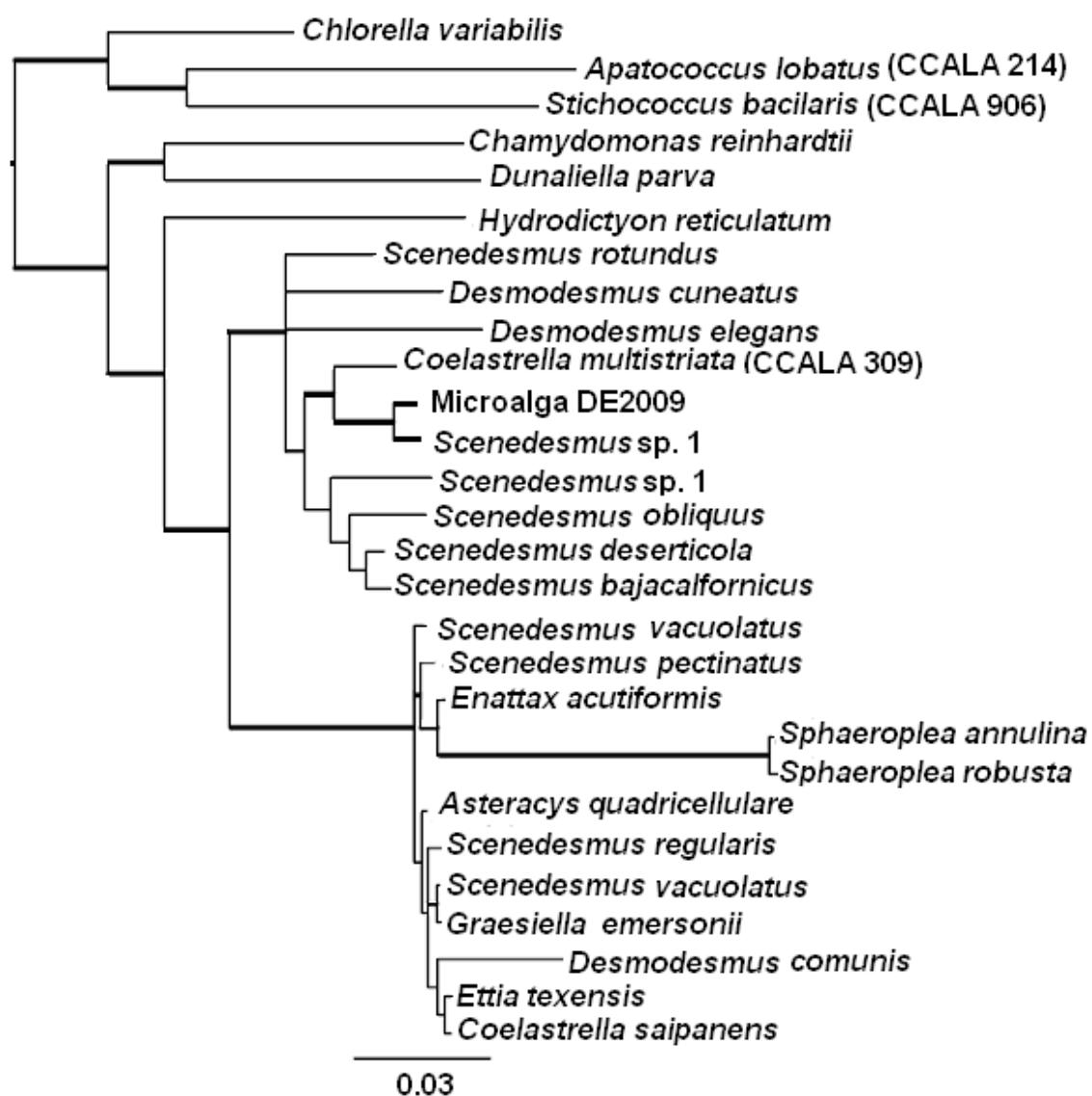


Fig. 3.1.2. Árbol filogenético de la microalga DE2009, tentativamente identificada como *Scenedesmus* DE2009.

3.2. Optimización metodológica.

En esta sección, se describe la optimización de todos los métodos utilizados en dos apartados: en el primero los correspondientes a las técnicas utilizadas, especialmente las de microscopía de alta resolución, a la vez que se determina la sensibilidad de estas técnicas de microscopía para detectar metales (apartado 3.2.1); el segundo en la preparación de los consorcios para evitar interferencias provocadas por la autofluorescencia emitida por los diferentes microorganismos que integran cada consorcio.

3.2.1. Sensibilidad de las técnicas de microscopía utilizadas.

Uno de los aspectos más importantes a considerar en las valoraciones sobre la T-R de los microorganismos ensayados frente a los metales y también en su capacidad para biocaptarlos, ha sido determinar previamente la sensibilidad de las técnicas de microscopía utilizadas. Este estudio se ha realizado tanto para el CLSM- $\lambda scan$, como para el SEM y el TEM acoplados a un detector de Rayos X respectivamente.

Para determinar la sensibilidad de la técnica en el caso del CLSM- $\lambda scan$, el objetivo era evaluar la dosis mínima de metal ensayado capaz de producir señal de fluorescencia utilizando como marcador la chl *a*. Para este experimento se utilizó el cobre y el microorganismo *Spirulina* sp. PCC 6313 (Sp) ya que por ensayos previos se conocía que este microorganismo toleraba únicamente concentraciones muy bajas de este metal. Las dosis de cobre ensayadas fueron: 1, 3, 5, 7, y 10 nM de Cu. Los resultados obtenidos demuestran que la sensibilidad de esta técnica es de 1 nM, lo que hace que esta metodología sea especialmente indicada, incluso cuando la dosis de metal

existente en la muestra es muy baja. En la Fig. 3.2.1. a., se representa el espectro de la MFI de este microorganismo a una dosis de 1 nM de Cu.

Análogos experimentos se realizaron para determinar la sensibilidad de la técnica para detectar la captación de metales externamente mediante el SEM-EDX en las envueltas de EPS. Se ensayaron también en Sp diferentes concentraciones de cobre: 1, 3, 5, 7, y 10 nM y se determinó la mínima dosis de metal en la que se detectaba el cobre extracelularmente.

En todos los casos se hicieron controles (cultivos de los distintos microorganismos sin el metal) y se comprobó que el resultado en estos casos fuese siempre negativo. También en cada caso se analizaron los filtros utilizados para la preparación de las muestras para ser observadas al SEM-EDX, para comprobar que el resultado fuese en este caso también negativo.

Un resultado positivo habría indicado la precipitación del metal en toda la muestra y no específicamente en el EPS de los microorganismos. La mínima dosis de metal detectada por el SEM-EDX fue de 10 nM (Figs. 3.2.2. a y b).

Finalmente, también se analizó en este caso mediante el TEM-EDX la mínima dosis de metal capaz de producir señal intracelularmente en los mismos microorganismos. Para ello se ensayaron las mismas concentraciones de metales que en el caso anterior. En estos experimentos también se realizaron controles tanto en las resinas de inclusión de las muestras como en el entorno externo de las células, comprobando nuevamente que los resultados fueran negativos.

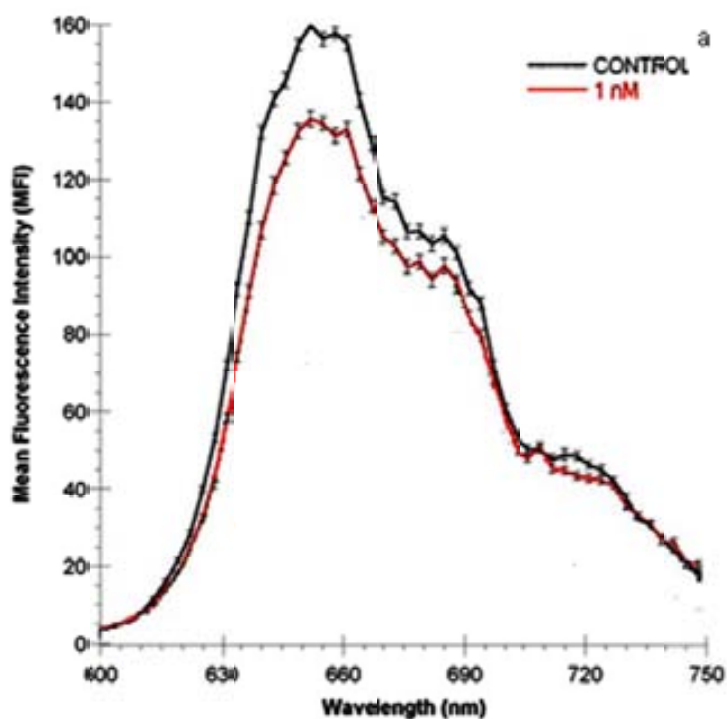


Fig. 3.2.1. Espectros obtenidos por CLSM- λ scan, del experimento control y de un cultivo de *Spirulina* sp. PCC 6313 contaminada con 1 nM de cobre. (a).

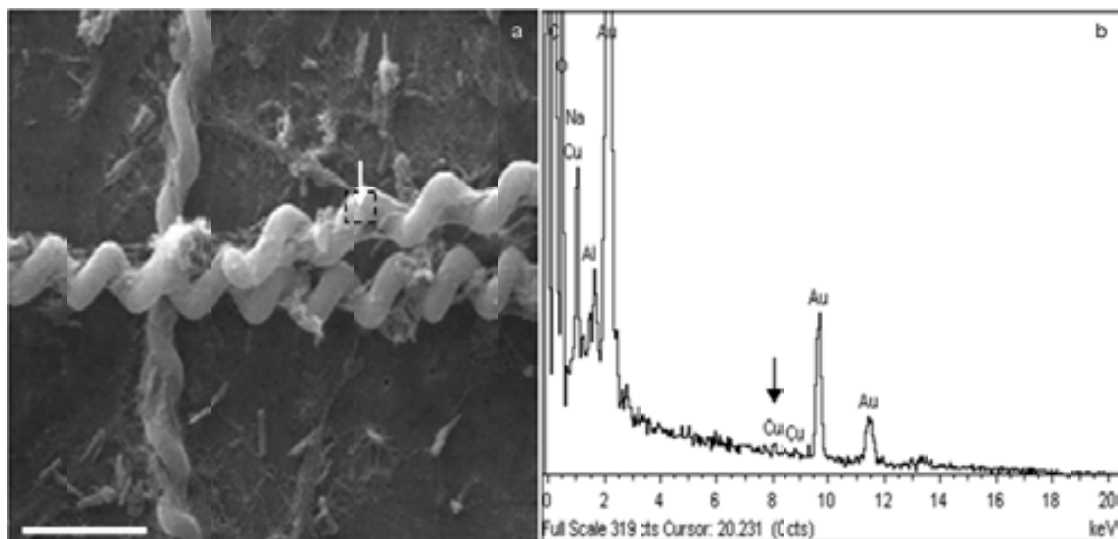


Fig. 3.2.2. Imagen obtenida por SEM para Sp (a) y su espectro EDX con el pico de cobre (b) a una concentración de 10 nM. Tamaño de la barra 10 μ m.

Los resultados demostraron que, en el caso del cobre se producen contaminaciones externas de este metal, ya que el resultado era positivo, tanto fuera como dentro de la célula, por lo que estos resultados se consideraron no concluyentes.

En cambio los experimentos con plomo permitieron determinar la sensibilidad de esta técnica que fue de 0.1 mM. Figs. 3.2.3. a y b.

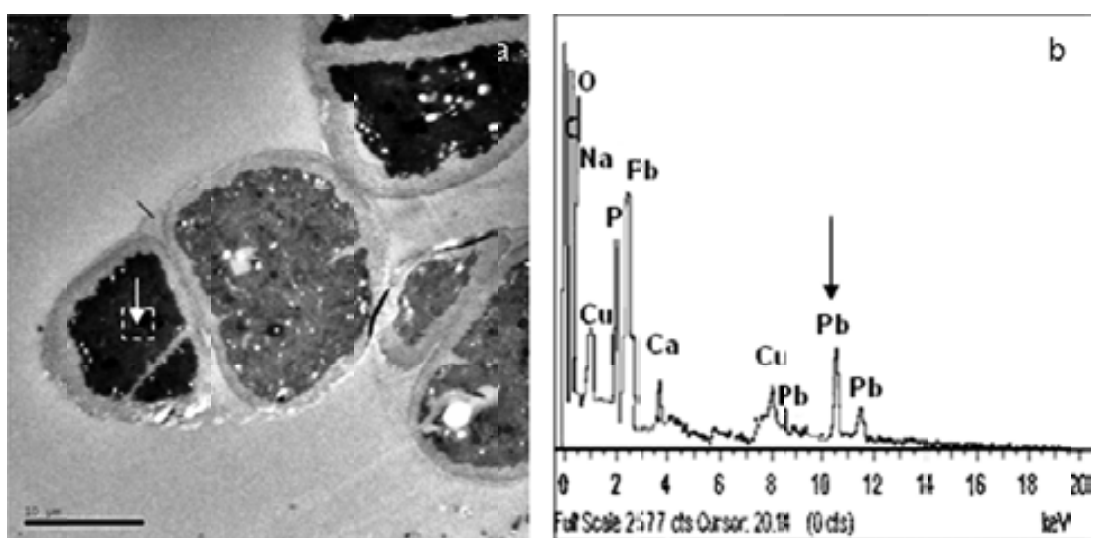


Fig. 3.2.3. Imagen obtenida por TEM para Ch(a) y su espectro EDX con el pico de plomo (b) a una concentración de 0.1 mM. Tamaño de la barra 10 μm.

También en este último caso se tuvieron en consideración el tipo de rejilla utilizado y los protocolos de preparación de las muestras, para no introducir contaminación externa. Así en el caso del cobre, las rejillas utilizadas fueron de titanio, y en el caso del plomo no se tiñeron las células con citrato de plomo.

3.2.2. Optimización de los protocolos utilizados en microscopía de alta resolución.

En el capítulo de Material y métodos del presente trabajo se describió el protocolo para obtener, a partir del CLSM- λ scan, el espectro de la MFI emitida por la chl *a* de las células de los microorganismos fotótrofos, evaluados a partir de los cultivos individuales. Mediante esta técnica, también se determinó la tolerancia-resistencia (T-R) de estos microorganismos al ser expuestos a diferentes concentraciones de los metales cobre y plomo respectivamente.

Por primera vez, a través de la optimización del protocolo descrito en el apartado 2.5.1, se ha determinado el espectro de la (MFI) de microorganismos cultivados en consorcios: Sp+Ch y Ge+Sc, y expuestos a diferentes concentraciones de cobre y plomo, mediante la utilización del CLSM- λ scan. Por lo tanto, a continuación se describirá la optimización de este protocolo tomando como modelo el consorcio formado por Ge+Sc.

Para este objetivo se ajustaron las condiciones ópticas para *Geitlerinema* sp. DE2011 en un cultivo sin contaminar. El protocolo optimizado fue el siguiente: en primer lugar, se obtuvo la secuencia de imágenes mediante la exploración de una misma sección óptica xy a lo largo de todo el espectro de luz visible; luego se obtuvieron las imágenes en la posición z, para determinar la máxima fluorescencia emitida por este microorganismo (Fig. 3.2.4. a). La imagen corresponde a la morfología externa de la cianobacteria filamentosa *Geitlerinema* sp DE2011 y su fluorescencia máxima; con este protocolo, en la misma imagen, se puede observar el contorno de la microalga *Scenedesmus*

sp DE2009 con una intensidad de fluorescencia muy tenue, por lo que no afecta ni interfiere con los resultados obtenidos para *Geitlerinema* sp. DE2011.

A continuación, se repitió el mismo protocolo para la microalga *Scenedesmus* sp DE2009. En la Fig. 3.2.4. b., se observa claramente la máxima fluorescencia emitida por este microorganismo y su morfología redondeada y en la misma imagen se puede observar el contorno de las células de *Geitlerinema* sp. DE2011 con una intensidad de fluorescencia muy tenue, sin afectar ni interferir con los resultados obtenidos para *Scenedesmus* sp DE2009.

Así mismo, en la Fig. 3.2.4. c y en la Fig. 3.2.4. d., se pueden observar representadas las curvas del espectro de emisión de la MFI obtenidas al aplicar un láser de excitación de 488 nm.

Para la obtención de las MFI se utilizó la función: *regions-of-interest* (ROIs) del programa informático Leica Confocal (Leica Microsystems CMS GmbH), considerándose 70 regiones de interés de $1 \mu\text{m}^2$ para cada uno de los microorganismos por separado.

Finalmente, una vez optimizado el protocolo se determinó la dosis mínima de metal, capaz de alterar significativamente el espectro de la MFI, al compararla con la obtenida con el mismo microorganismo en el experimento control.

El protocolo descrito se aplicó a cada uno de los consorcios y para los metales cobre y plomo respectivamente.

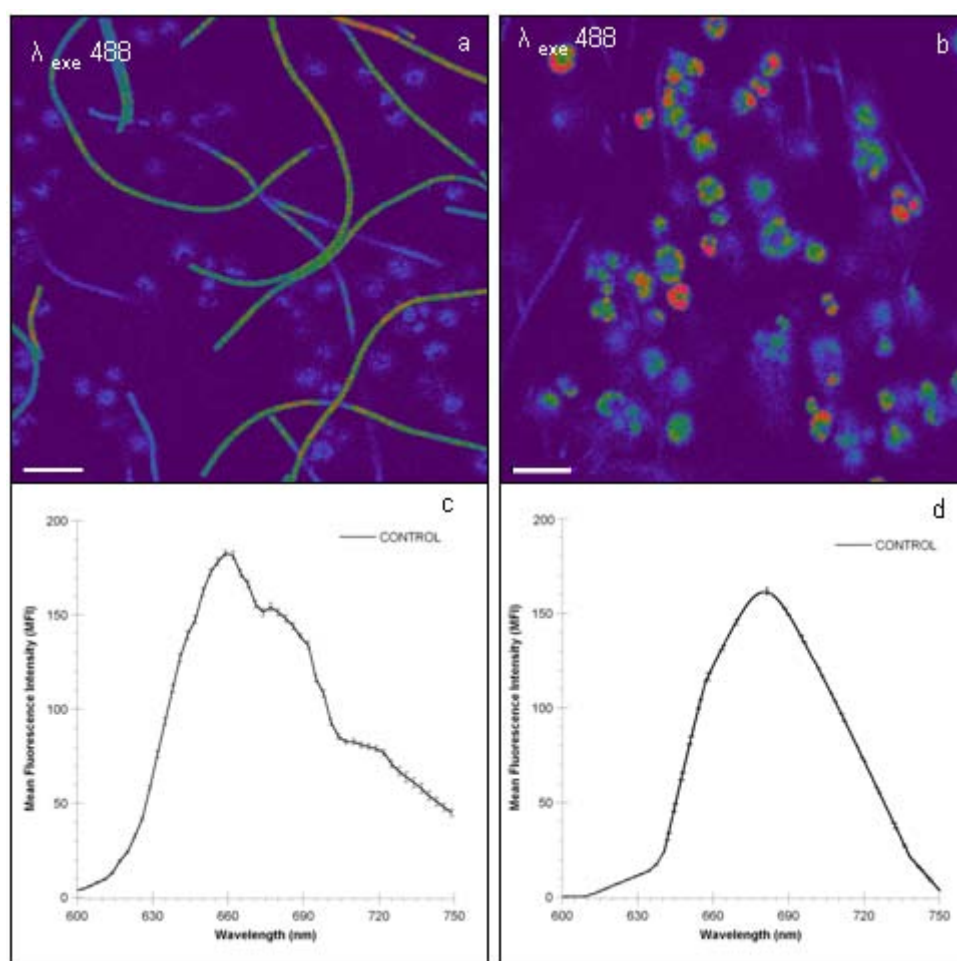


Fig. 3.2.4. Las Imágenes (protocolo de optimización) obtenidas por CLSM- λ scan, corresponden a un cultivo control del consorcio (Ge+Sc); arriba, las imágenes (a) y (b) representan a la cianobacteria Ge y a la microalga Sc respectivamente; abajo, se observan sus respectivos espectros de la MFI para Ge y Sc (d y c). El tamaño de la barra es de 10 μ m.

3.3. Resultados presentados como artículos.

Finalmente en esta sección se determinan los resultados obtenidos a partir de los tres artículos presentados.

3.3.1. The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined *in vivo* and at cellular level by confocal laser microscopy.

En estudios anteriores, nuestro grupo de trabajo había desarrollado un método basado en la microscopía láser confocal acoplada a un detector espectrofluorimétrico (CLSM- λ scan). Esta técnica, que podía ser aplicada *in vivo*, a nivel celular y sin manipulación de las muestras, se había ensayado originariamente en la cianobacteria *Microcoleus* sp. DE2006, para determinar el efecto del plomo en la intensidad de fluorescencia de la chl *a* con respecto a un experimento control (sin el metal).

En el artículo que se presenta a continuación, se ha ensayado esta metodología para determinar la tolerancia-resistencia (T-R) al cobre de diferentes cultivos de microorganismos fotótrofos. En el presente trabajo se han seleccionado 4 microorganismos fotótrofos: 3 de ellos son cianobacterias, 2 procedentes de la Colección de Cultivos Pasteur: *Spirulina* sp. PCC 6313 (Sp) y *Chroococcus* sp. PCC 9106 (Ch), y 1 procedente del ambiente natural: *Microcoleus*-like, ahora identificado en este trabajo como *Geitlerinema* sp DE2011 (Ge). También se seleccionó la microalga DE2009, identificada en este trabajo como *Scenedesmus* sp. DE2009 (Sc), aislada como la anterior de los tapetes microbianos del delta del Ebro. Los cultivos independientes de cada uno de estos microorganismos se contaminaron con diferentes concentraciones de cada metal.

Además se ha determinado también la sensibilidad de la técnica, ensayando un amplio margen de concentraciones de este metal sobre los microorganismos mencionados.

Con respecto a la T-R de estos microorganismos los resultados indican que la mínima dosis de cobre capaz de alterar significativamente la intensidad de fluorescencia de la chl *a* es de 0.1 μM en Ch y Sp; 0.3 μM en Ge y 5 μM en Sc. Lo que indica que Sc es más tolerante-resistente al cobre que Ge y que este último microorganismo lo es más que Ch y Sp.

También se puede concluir de estos resultados que el cobre tiene una elevada toxicidad a dosis muy bajas para las tres cianobacterias, siendo más resistente la microalga. Considerando la importancia del cultivo del arroz en el delta del Ebro, y que se suelen utilizar alguicidas que contienen cobre y que pueden incorporan este metal en estos ecosistemas, es previsible el efecto negativo que estos productos puedan tener en las cianobacterias, que son por otra parte esenciales para la estabilización de los sedimentos deltaicos.

Por otra parte se debe resaltar la importancia de la utilización de una técnica, como es el CLSM-*lscan*, que como se ha mencionado, se aplica *in vivo*; produce rápidos resultados y que como se demuestra en este trabajo tiene una sensibilidad de 0.1 μM , lo que significa que permite ensayos a dosis muy bajas de metal. Además esta técnica está especialmente indicada para las cianobacterias filamentosas, que no crecen en medios sólidos y que por tanto para estos microorganismos no pueden utilizarse los métodos clásicos, como por ejemplo la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

**The effect of copper on different phototrophic microorganisms
determined in vivo and at cellular level by confocal laser
microscopy**

**M. Seder-Colomina, A. Burgos, J. Maldonado,
A. Solé and I. Esteve.**

Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici
C, Campus de la UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Spain.

² Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Universidad de Nariño, Pasto (N),
Colombia.

Abstract

Microbial mats are coastal ecosystems that consist mainly of cyanobacteria, primary producers in these habitats that play an important role in stabilising delta sediments. However, these ecosystems are subject to various kinds of pollution, including metal contamination, placing their survival at risk. Among heavy metals, copper is an essential metal at low doses and toxic at high doses. This metal is present in different pesticides used in rice production, a thriving agro-industry in the Ebro Delta (Spain). For several years, our group has been studying the Ebro Delta microbial mats and has developed a method for determining the effect that metals cause on cyanobacteria populations. This method is based on confocal laser microscopy coupled to a spectrofluorometer,

which rapidly provides simultaneous three-dimensional information on photosynthetic microorganisms and their fluorescence spectra profiles. The current study determines the copper effect on different photosynthetic microorganisms from culture collection (*Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313) and isolated from the environment (*Microcoleus*-like and the microalga DE2009). Comparing all results obtained it can be observed that the minimum dose of Cu that is capable of significantly altering chlorophyll *a* (chl *a*) fluorescence intensity were 1×10^{-7} M in *Chroococcus* sp. PCC 9106; 1×10^{-7} M in *Spirulina* sp. PCC 6313.

Introduction

The high quantity of metals that are released every day into the environment as a result of agricultural and industrial activity can be highly toxic in ecosystems and this affects living beings, sometimes irreversibly (Nogales et al. 2011). In recent years, cyanobacteria have been the object of research into metal biosorption and toxicity studies (Gong et al. 2005; Solisio et al. 2006; Babu et al. 2010). Until now, different studies have focused on the changes in diversity and biomass, especially in microorganism populations, to determine the effect of metals. The application of molecular techniques, extraction and pigment quantification techniques (in the case of photosynthetic microorganisms) (Chakraborty et al. 2010; Kalinowska and Pawlik-Skowronska 2010), and the use of the minimum inhibitory concentration (MIC) assays (Maldonado et al. 2010a) have been, among others, the most widely used methodologies. However, most of these methods require long protocols, which means that the

information obtained does not show a direct effect of metals at the cellular level (i.e. cytotoxicity) It is important to note that when perform a study of cyanobacteria and algae, which is the main objective of this paper, the application of some of these techniques is even more problematic, as many of these microorganisms, especially the filamentous, grow irregularly on a Petri dish or do not grow on a solid medium.

The advantages of using a confocal laser scanning microscope (CLSM), coupled to a spectrofluorometric detector for the study of cyanobacteria were described by Roldán et al. (2004). Our study group has optimised this methodology to determine the effect of metals on different populations of photosynthetic microorganisms. The advantage of the technique is that it does not require any type of staining, as the CLSM captures the natural fluorescence emitted by the photosynthetic pigments of these microorganisms. When working with consortia of microorganisms *in vivo*, this technique allows the distinction to be made between autofluorescence of phototrophic microorganisms without making the heterotrophic bacteria visible (Burnat et al. 2010; Maldonado et al. 2010b, 2011). The Ebro Delta (40°40'N, 0° 40'E, Tarragona, Spain) is an ecosystem of major ecological and economic value, for the large expanses of land are used for rice crops. The Ebro Delta is a protected area, although both the river and the delta today are subjected to anthropogenic pollution, mainly as a consequence of industrial activities that result in waste being discharged into the river and onto the agricultural crops (rice and fruit), which in turn increases the level of pesticides in the Delta (Mañosa et al. 2001). In order to prevent the effect of algae in rice crops, widespread use is made of pesticides, which contains copper sulphate (Salam and El-Fadel 2008). Copper is an essential

metal at low doses that acts as a cofactor for different enzymes, including plastocyanin (De la Cerda et al. 2008). Nevertheless, the doses used in pesticides can affect cyanobacteria, which are the most abundant microorganisms in the Ebro Delta microbial mats, and also the greatest primary producers of microbial mats, which occupy a large area of the Ebro Delta (Esteve et al. 1994; Guerrero et al. 2002). The aim of this study is: (1). To determine the effect of the copper, in vivo and at the cellular level, on phototrophic microorganisms using CLSM coupled to a spectrofluorometric detector (CLSM-λscan) and (2). To determine the minimum metal dose capable of significantly altering the fluorescence intensity of chlorophyll a, chl a (used as a marker). To do this, we assayed the effect of copper in culture collection strains and in microorganisms that had been isolated from the natural environment. We also studied the sensitivity of the technique and its reliability at very low metal concentrations.

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

For this work four phototrophic microorganisms were selected: two cyanobacteria from Pasteur Culture Collection (PCC) (Herdman et al. 2005), *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313, and two microorganisms isolated from Ebro Delta microbial mats, *Microcoleus*-like and the microalga DE2009. Cyanobacteria from culture collection were grown in BG-11 and ASN III (1:1 v/v) medium, respectively (Rippka et al. 1979), while the photosynthetic microorganisms isolated from microbial mats were grown in

Pfennig mineral medium (Pfennig and Trüper 1992). All microorganisms were maintained at 27°C and under light conditions of 15 IEm-2 s-1. Different concentrations of CuSO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) from 1 x 10⁻⁷ to 10 x 10⁻⁶ M Cu, were used in dose response experiments. All experiments were performed for 9 days using the media, light and temperature conditions mentioned above.

Confocal laser microscopy

Samples from the different polluted and unpolluted cultures were observed in vivo in standard microscopy glass slides. The analysis of pigments was carried out using the function of the CLSM-λscan (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany). The information obtained with this technique shows the emission spectrum of the pigments according to the region of the emitted wavelength and intensity of fluorescence emitted. Each image sequence was obtained by scanning the same xy optical section throughout the visible spectrum. Images were acquired at the z position at which the fluorescence was maximal, and acquisition settings were constant throughout the experiment (Maldonado et al. 2010b). The sample excitation was carried out with an Argon Laser at 488 nm (λ_{exe} 488) with a 3 nm λ step size and an emission wavelength between 600 and 750 nm. In order to measure the mean fluorescence intensity (MFI) of the xyλ, CLSM data sets obtained by means of the Leica Confocal Software (Leica Microsystems CMS GmbH) were used. In these confocal images the pseudo-colour palette 4 was used, where warm colours represent the maximum intensities and cold colours represent the low intensities of fluorescence. The regions-of-interest (ROIs) function of the software was used to measure the

spectral signature. For each sample, 70 ROIs of 1 μm^2 taken from cells were analyzed.

Statistical analysis

The statistical analyses used were One-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni and Tukey comparisons post hoc tests. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$ and/or $p < 0.01$. PASW Statistics software (v.18 for Windows XP) was used to perform the analyses. The EC50 values were calculated by fitting the data obtained with a log normal sigmoidal curve, using a nonlinear regression (GraphPad Prism, version 5 for Mac OS X). Two microorganisms selected from culture collection: *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313 were chosen since they are found in abundance in microbial mats.

Results and discussion

Two microorganisms selected from culture collection: *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313 were chosen since they are found in abundance in microbial mats. *Chroococcus* sp. PCC 9106 is a unicellular marine cyanobacterium that reproduces by binary fission. Cells are coccoid and vary in size from 28 to 32 μm in diameter. Cells occur singly or in pairs and are surrounded by a thick sheath. *Spirulina* sp. PCC 6313 is a marine gliding filamentous cyanobacterium that divides exclusively by binary fission and grows in the form of a helix. The cross walls are thin and invisible or nearly so with light microscopy and no sheath is visible.

The width of the trichomes is 2 μm . In the present study, and to calculate the minimum concentration affecting the pigment intensity, in the first experiment we assayed high metal doses from 1×10^{-6} to 10×10^{-6} M of Cu, and in the second used lower doses from 1×10^{-7} to 10×10^{-7} M. The differences between the control and all the concentrations assayed in *Chroococcus* sp. PCC 9106 were statistically significant both for the first experiment ($F = 674.344$) ($p < 0.05$) and for the second ($F = 57.636$) ($p < 0.05$) (Fig. 1). Analogous results were obtained for *Spirulina* sp. PCC 6313, the differences between the control and all the concentrations assayed in were statistically significant both for the first experiment ($F = 614.865$) ($p < 0.05$) and for the second ($F = 177.658$) ($p < 0.05$) (Fig. 2). These results demonstrate that low doses of the metal have a cytotoxic effect on both culture collection cyanobacteria. It must be considered that the lowest dose tested (1×10^{-7} M) is very close to the dose in the culture medium (BG11–ASNIII) used (3.16×10^{-7} M). Moreover, it is important to highlight that even these doses of metal could become lower than those used in algaecides ($0.3\text{--}2 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4$) (Salam and El-Fadel 2008). Meanwhile, the graphs (Figs 1b, d, 2b, d) show how MFI for both microorganisms is inversely proportional to the concentration of the metal. It can also be seen that *Spirulina* sp. PCC 6313 has a distorted fluorescence peak, probably due to the degradation of the photosynthetic pigments at the highest concentrations. On the other hand, the EC50 values obtained were: 3.6×10^{-7} M for *Chroococcus* sp. PCC 9106 and 1.1×10^{-6} M for *Spirulina* sp. PCC 6313. Analogous experiments to the above were performed with cultures of *Microcoleus*-like and the microalga DE2009 isolated from the Ebro Delta microbial mats.

Microcoleus-like is the dominant filamentous cyanobacterium in Ebro Delta microbial mats (Solé et al. 2009), and plays a very important role in the stabilisation of the deltaic sediments. This cyanobacterium, which also forms a consortium with other heterotrophic bacteria, was isolated by our study group and maintained in laboratory cultures (Diestra et al. 2005).

Filaments of this cyanobacterium are densely packed and surrounded by a homogeneous sheath that is sometimes coiled together in an irregularly screw like form. Cells from filaments vary in size from 3.13 to 3.75 μm . The identification and characterization of the strain has been carried out according to Bergey's manual (Castenholz, 2001). Control and contaminated cultures with different concentrations (from 1×10^{-7} to 10×10^{-6} M) of copper were analysed using the CLSM- λ scan. Figure 3a, c shows the autofluorescence detected in the control culture of *Microcoleus*-like. The graph in Fig. 3b, d, shows, like the previous experiments in culture collection cyanobacteria, how the MFI peak decreases in inverse proportion to the concentration of the assayed metal from the control culture to the maximum dose (10×10^{-6} M Cu). As in the previous results, the differences were statistically significant both for the first experiment ($F = 896.166$) ($p < 0.05$) and for the second experiment ($F = 13.630$) ($p < 0.05$) (Fig. 3). The minimum dose of Cu capable of significantly altering the fluorescence intensity of chl *a* was 3×10^{-7} M. The EC50 value obtained for *Microcoleus*-like was 1×10^{-6} M. The microalga DE2009 was also isolated by our group from the Ebro Delta samples (Maldonado et al. 2010b). This is an eukaryote phototrophic microorganism, which like *Microcoleus*-like, forms a consortium with different heterotrophic bacteria. The microalga DE2009 cells are spherical, with a diameter of 7–9 μm and its chloroplasts are distributed

laterally in the cell. The autofluorescence detected in the control culture of the microalga DE2009 is shown in Fig. 4a. The graph of the MFI obtained from the different cultures (Fig. 4b) is similar to that for *Microcoleus*-like but in this case the minimum dose of Cu capable of significantly altering the fluorescence intensity of chl *a* was 5×10^{-6} M of Cu. The EC50 value obtained for the microalga DE2009 was 5.47×10^{-6} M. Comparing all the results obtained it can be seen that the minimum dose of Cu capable of significantly altering the fluorescence intensity of chl *a* was: 1×10^{-7} M in *Chroococcus* sp. PCC 9106; 1×10^{-7} M in *Spirulina* sp. PCC 6313; 3×10^{-7} M in *Microcoleus*-like and 5×10^{-6} M in microalga DE2009, by which could be interpreted that microalga DE2009 is more tolerant-resistant than *Microcoleus* which in turn is more tolerant-resistant than *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313. Comparing these results with those obtained by assaying the effect of lead on *Microcoleus*-like by Burnat et al. (2010); and the microalga DE2009 (Maldonado et al. 2010b) using the same methodology, we concluded that copper has a cytotoxic effect at smaller doses than lead, probably because copper is necessary in cellular homeostasis (De la Cerda et al. 2008).

Finally, through the above-mentioned experiments, we have determined the sensitivity of the technique, which is 1×10^{-7} M for copper.

Conclusions

Using the CLSM-λscan methodology, which is applied in vivo, we conclude that: copper has a very toxic effect at low doses for *Chroococcus* sp. PCC 9106, *Spirulina* sp. PCC 6313 and *Microcoleus*-like. The microalga DE2009 was the

most tolerant resistant to copper among the phototrophic microorganisms assayed.

Acknowledgments

This research was supported by the following grant: DGICYT (CGL2008 01891/BOS). We express our thanks to the staff of the Servei de Microscòpia and the Servei de Llengües both at the Universitat Autònoma de Barcelona, Marc Alamany from Ecología Portuaria S. L. and Cristina Sosa for their help in this work.

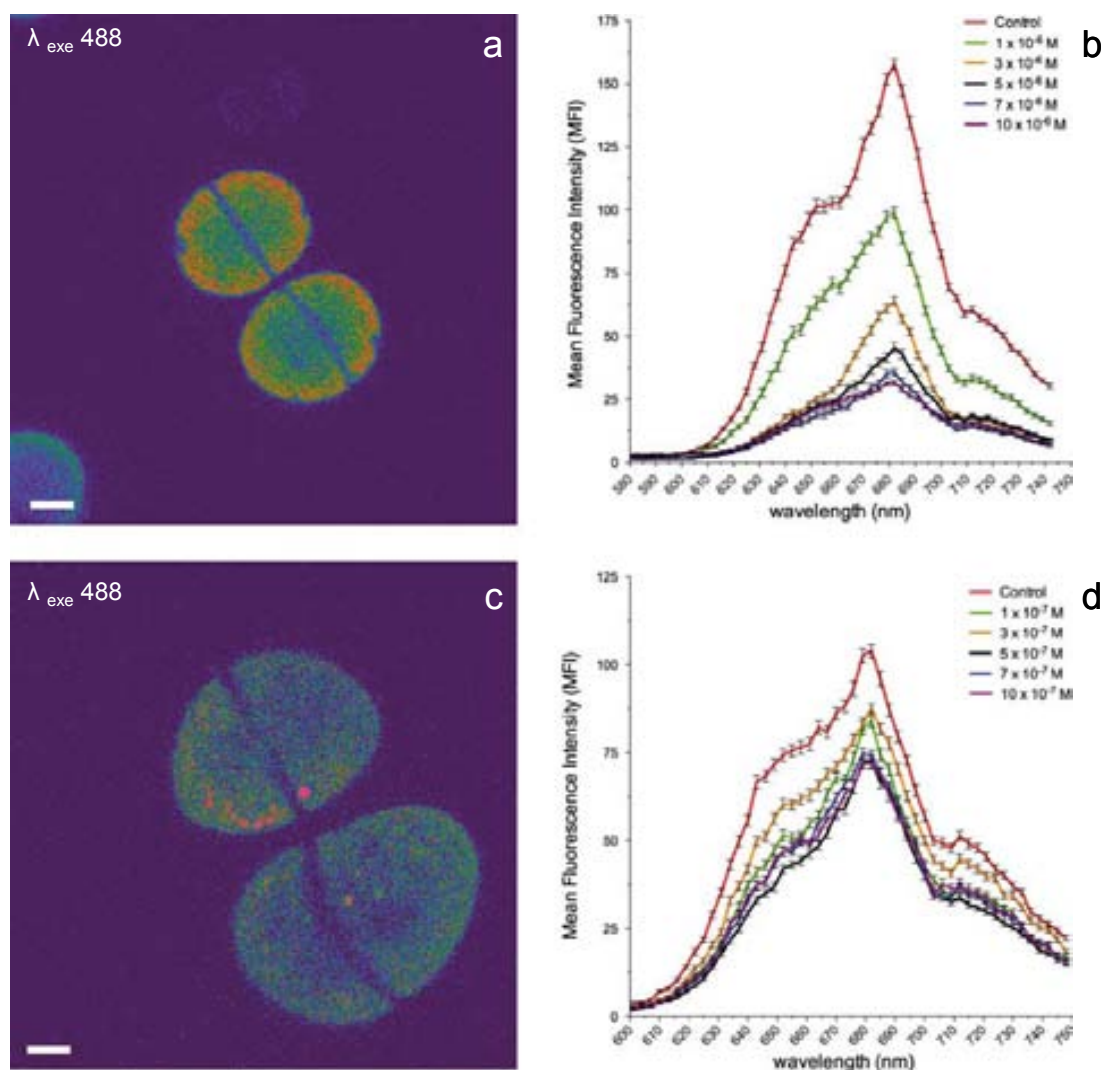


Figure 1: Images of control cultures of *Chroococcus* sp. PCC 9106 obtained by CLSM (a) and (c). The scale bar represents 10 μm . Graphs of MFI obtained by means of λ_{scan} (b) and (d).

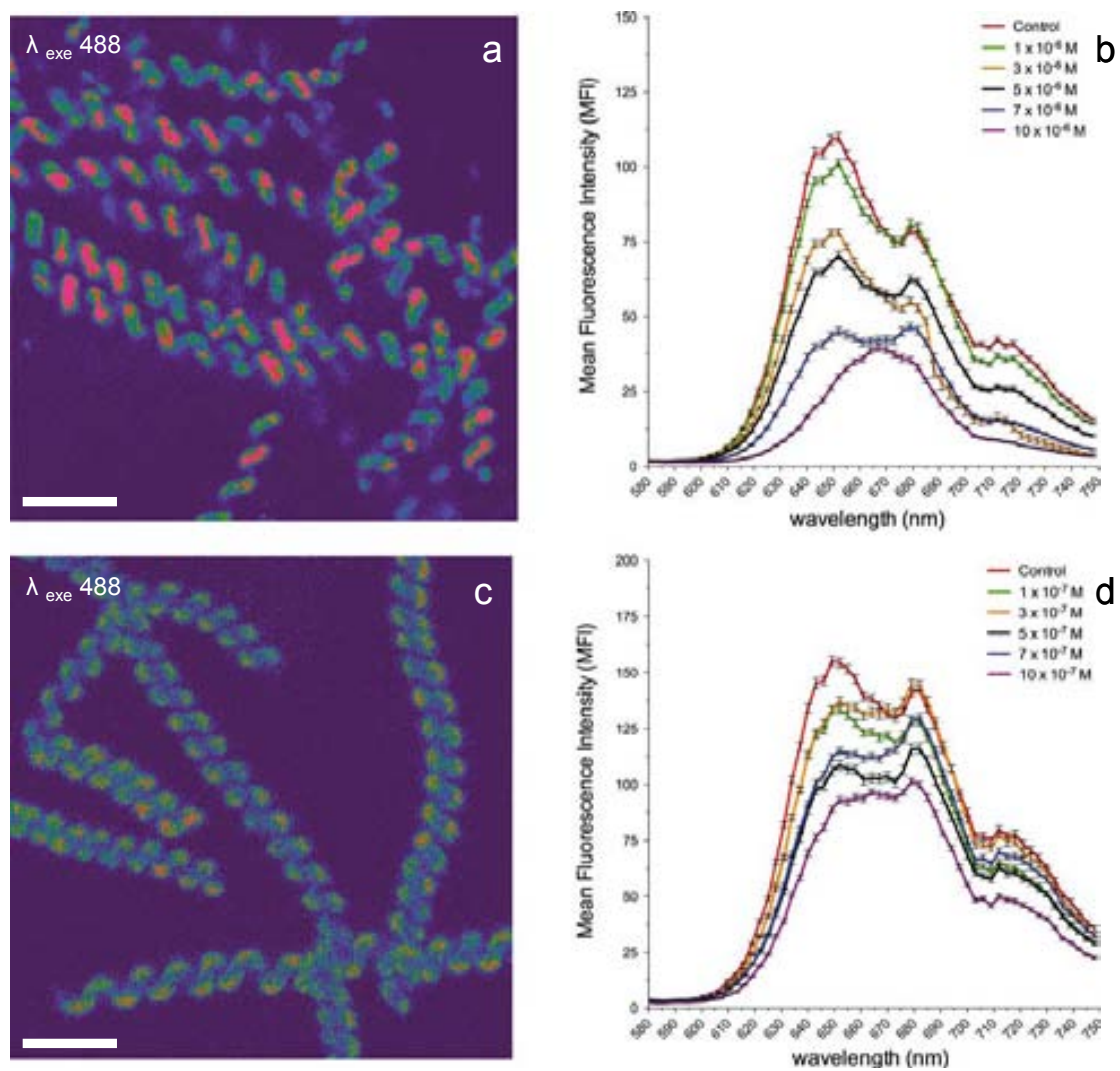


Figure 2: Images of control cultures of *Spirulina* sp. PCC 6313 obtained by CLSM (a) and (c). The scale bar represents 10 μm . Graphs of MFI obtained by means of λ_{scan} (b) and (d).

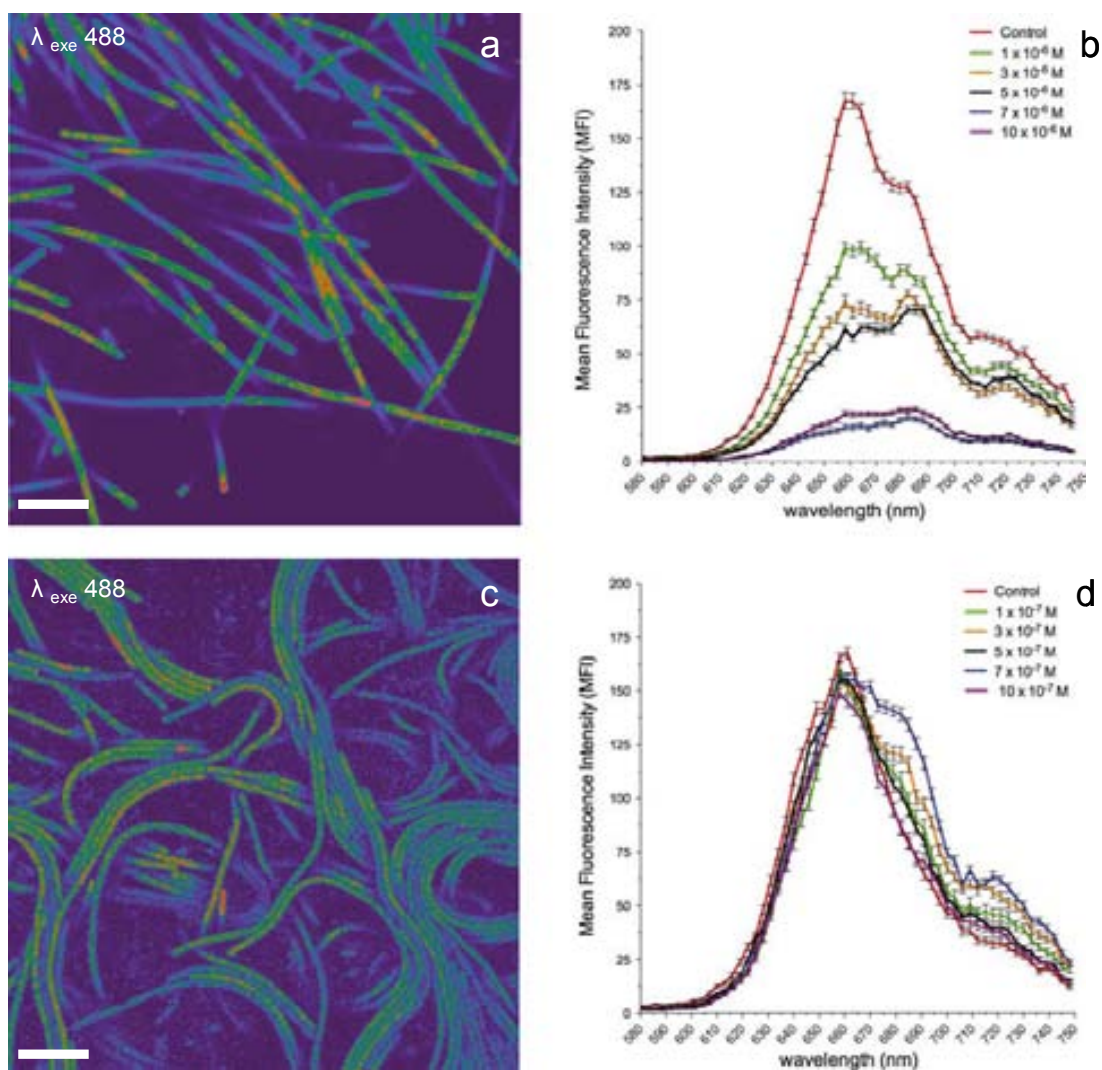


Figure 3: Images of control cultures of *Microcoleus*-like obtained by CLSM (a) and (c). The *scale* bar represents 10 μm . Graphs of MFI obtained by means of λscan (b) and (d).

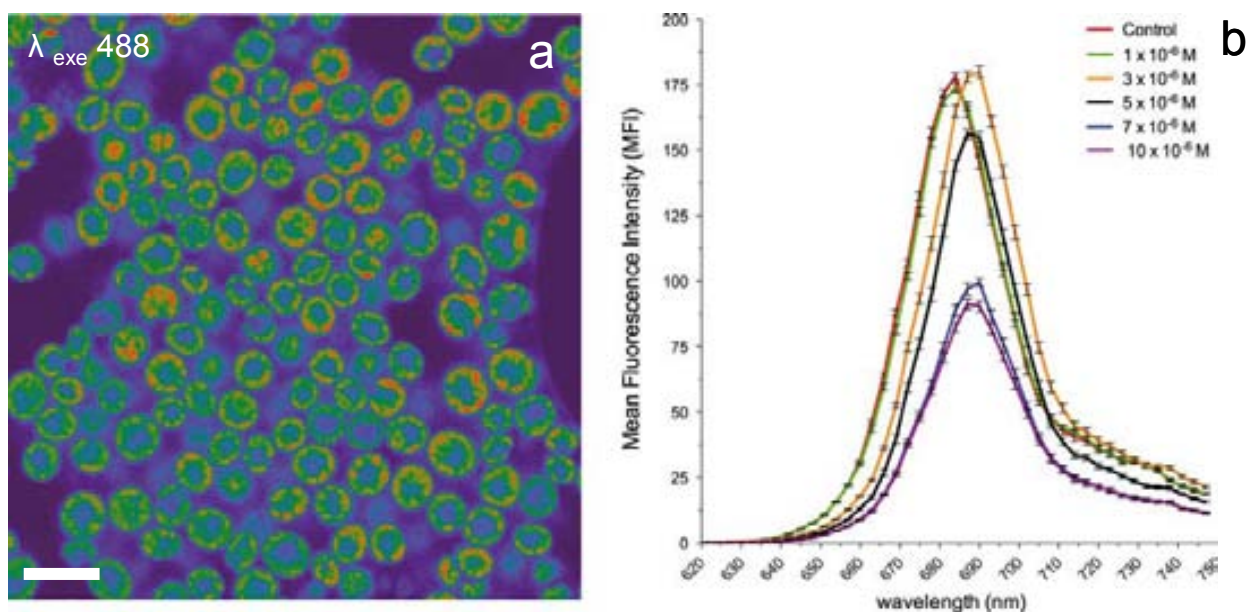


Figure 4: Image of control cultures of the microalga DE2009 obtained by CLSM (a). The scale bar represents 10 μm . Graph of MFI obtained by means of λscan (b).

References

- Babu NG, Sarma PA, Attitalla IH, Murthy SDS (2010) Effect of selected heavy metal ions on the photosynthetic electron transport and energy transfer in the thylakoid membrane of the cyanobacterium. *Spirulina platensis* Acad J Plant Sci 3:46–49
- Burnat M, Diestra E, Esteve I, Solé A (2010) Confocal laser scanning microscopy coupled to a spectrofluorometric detector as a rapid tool for determining the in vivo effect of metals on phototrophic bacteria. *Bull Environ Contam Toxicol* 84:55–60
- Castenholz RW (2001) Phylum BX Cyanobacteria Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (Eds) *Bergey's manual systematic bacteriology. The Archea and deeply branching and phototrophic bacteria*, vol 1. Springer, New York, pp 473–599
- Chakraborty P, Raghunadh Babu PV, Acharyya T, Bandyopadhyay D (2010) Stress and toxicity of biologically important transition metals (Co, Ni, Cu and Zn) on phytoplankton in a tropical freshwater system: an investigation with pigment analysis by HPLC. *Chemosphere* 80:548–553
- De la Cerda B, Castielli O, Durán RV, Navarro JA, Herva's M, De la Rosa MA (2008) A proteomic approach to iron and copper homeostasis in cyanobacteria. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6:322–329
- Diestra E, Solé A, Martí M, García de Oteyza T, Grimalt JO, Esteve I (2005) Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Scanning* 27:176–180

- Esteve I, Ceballos D, Martínez-Alonso M, Gaju N, Guerrero R (1994) Development of versicolored microbial mats: succession of microbial communities. Microbial mats: structure, development and environmental significance. In: Stal LJ, Caumette P (Eds) NATO ASI Series G: Ecological Sciences. Springer, Heidelberg, pp 4165–4420
- Gong R, Ding Y, Liu H, Chen Q, Liu Z (2005) Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. Chemosphere 58:125–130
- Guerrero R, Piqueras M, Berlanga M (2002) Microbial mats and the search for minimal ecosystems. Int Microbiol 5:177–188
- Herdman M, Iteman I, Rippka R (2005) Catalogue of cyanobacterial strains, 2nd edn. Institut Pasteur, Paris
- Kalinowska R, Pawlik-Skowronska B (2010) Response of two terrestrial green microalgae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress. Environ Poll 158:2778–2785
- Maldonado J, Diestra E, Huang L, Dome`nech AM, Villagrasa E, Puyen ZM, Duran R, Esteve I, Sole´ A (2010a) Isolation and identification of a bacterium with high tolerance to lead and copper from a marine microbial mat in Spain. Ann Microbiol 60:113–120
- Maldonado J, de los Rios A, Esteve I, Ascaso C, Puyen ZM, Brambilla C, Sole´ A (2010b) Sequestration and in vivo effect of lead on DE2009 microalga, using high-resolution microscopic techniques. J Hazard Mater 183:44–50
- Maldonado J, Sole´ A, Puyen ZM, Esteve I (2011) Selection of bioindicators

to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquat Toxicol* 104:135–144

Mañosa S, Mateo R, Guitart R (2001) A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environ Monit Assess* 71:187–205

Nogales B, Lanfranconi MP, Piña-Villalonga JM, Bosch R (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 35:275–298

Ochoa-Herrera V, León G, Banihani Q, Field JA, Sierra-Alvarez R (2011) Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Sci Total Environ* 412–413:380–385

Pfennig N, Trüper HG (1992) The family of Chromatiaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 3200–3221

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111:1–61

Roldán M, Thomas F, Castel S, Quesada A, Hernández-Marine´ M (2004) Non-invasive pigment identification in single cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl Environ Microbiol* 70:3745–3750

Salam D, El-Fadel M (2008) Mobility and availability of copper in agricultural soils irrigated from water treated with copper sulphate algaecide. *Water Air Soil Pollut* 195:3–13

Solé A, Diestra E, Esteve I (2009) Confocal laser scanning microscopy image analysis for cyanobacterial biomass determined at microscale level in different microbial mats. *Microb Ecol* 57:649–656

Solisio C, Lodi A, Torre P, Converti A, Del Borghi M (2006) Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. *Bioresour Technol* 97:1756–1760 The effect of copper on different phototrophic microorganisms 205

3.3.2. Scanning Electron microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray detector to study copper removal on different phototrophic microorganisms.

En el apartado anterior se determinó la tolerancia-resistencia al cobre de diferentes microorganismos fototrófos, mediante el CLSM- λ scan. En este apartado se analiza la capacidad de los mismos microorganismos para captar el mismo metal, extracelularmente, mediante el SEM-EDX.

El objetivo de la aplicación de esta metodología era analizar el posible potencial bioreparador de los mismos microorganismos fotótrofos ensayados en el artículo anterior y por eso los cultivos se contaminaron con distintas concentraciones de cobre.

Para el SEM-EDX, muestras procedentes de cultivos contaminados y sin contaminar (controles) se fijaron, lavaron y deshidrataron, después de haber sido filtradas a través de un filtro Nucleopore, y finalmente se sombrearon con oro.

El análisis por SEM-EDX demostró que todos los microorganismos tenían la capacidad de acumular cobre en las sustancias extrapoliméricas que se encuentran en las capas más externas de las células y que tienen la capacidad de quelar los metales. Los cultivos no contaminados dieron negativo para el cobre y también los filtros que retenían las muestras de los cultivos contaminados.

Aunque en este artículo no se incluyen los resultados obtenidos para el TEM-EDX; si se mencionan en este resumen.

El análisis por TEM-EDX, no fue concluyente, ya que además de detectarse cobre en el interior de las células, se detectó también este metal en la resina de inclusión que contenía las muestras. Aún cuando se examinaron cuidadosamente todos los pasos del protocolo de preparación: fijaciones de las muestras, lavados, deshidrataciones, inclusiones en resinas y selección de rejillas soporte (se desestimaron las que contenían cobre), no se pudo descartar la contaminación de cobre externa a la preparación de las muestras. Por lo que los resultados, aunque tienden a indicar que los microorganismos estudiados también tienen la capacidad de captar cobre intracelularmente, no se han considerado y no se han incluido en este artículo.

También en estos experimentos se ha evaluado la sensibilidad de la técnica, que fue de 10 nM en el caso del SEM-EDX; y de 0.1 mM en el caso del TEM-EDX.

A partir de los resultados presentados puede concluirse, que de los microorganismos estudiados con respecto al cobre *Scenedesmus* sp. DE2009 podría ser considerado como el microorganismo mejor bioremediador para el cobre, ya que es: autóctono; fácil de cultivar, y es capaz de captar este metal.

Finalmente, el SEM-EDX, es una técnica rápida y eficaz para valorar si un microorganismo es capaz de captar metales.

El TEM-EDX tiene mayor dificultad en su aplicación, y solo sería la técnica indicada en el caso de que se precisara determinar la captación interna del metal (quelación del metal que requiere células en crecimiento, ya que se trata de un proceso activo).

**Scanning Electron Microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray
detector to study copper removal on different phototrophic
microorganisms**

**Álvaro Burgos^{1,2}, Marina Seder-Colomina¹, Juan Maldonado¹,
Antonio Solé¹ and Isabel Esteve^{*,1}**

¹Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Campus de la UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Spain.

²Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Universidad de Nariño, Pasto (N), Colombia.

Abstract

Ebro Delta microbial mats are coastal ecosystems that consist mainly of phototrophic microorganisms, that play an important role in stabilizing delta sediments. However, these ecosystems are subjected to various kinds of pollution, including copper metal contamination. This metal is present in pesticides used against microalgae, which cause significant losses in rice production.

The current study determines the capacity of different cyanobacteria and a microalga, to sequester copper by means of Scanning Electron Microscopy (SEM) coupled to an Energy Dispersive X-ray detector (EDX). For that, unpolluted and polluted cultures of these microorganisms were analysed by this technique. The results obtained demonstrated that all the microorganisms tested are able to remove copper accumulating this metal extracellularly in

extrapolymeric substances (EPS). SEM-EDX application in natural habitats open up broad prospects for future studies of metal ecotoxicity.

Introduction

Microbial mats are benthic stratified ecosystems, widely distributed around the globe in different environments, such as marine waters [1-4], fresh waters [5], hypersaline ponds [6], estuaries [7], hot deserts [8], hot springs [9], soils [10], antarctic ice ponds [11] and hydrothermal vents in deep oceans [12].

The Ebro Delta is the third largest delta in the Mediterranean with a 320 km² triangular surface and it is located at the northeastern coastline of the Iberian Peninsula (0°35'E–0°56'E; 40°33'N–40°47'N). Different ecosystems such as: microbial mats, marshes, salt ponds, dunes and sandy beaches provide habitat for a large number flora and fauna species that form part of the Ebro Delta.

In the last years our research team has studied the Ebro Delta microbial mats (Fig. 1a). These ecosystems, developed in water-sediment interfaces, are formed by multilayered benthic microbial communities that are distributed along vertical micro-gradients of different physical-chemical parameters (Fig. 1b). Microorganisms such as cyanobacteria, algae, colorless sulfur bacteria, purple sulfur bacteria and sulfate reducing bacteria, among others, are living in these mats. Cyanobacteria are the most abundant phototrophic microorganisms and they are located mainly in the upper green layer of microbial mats playing a very important role in the stabilization of the sediments.

Deltas are nowadays subjected to anthropogenic pollution, mainly as a consequence of industrial activities that discharge their waste into the river and the agriculture crops (rice and fruits), which increase the amount of pesticides in deltas. All this circumstances causes serious environmental effects attributable to the accumulation of the contaminants in sediments, water, soil and biota. The predominant pollutants in these habitats are: herbicides, insecticides, hydrocarbons and heavy metals [13].

The Ebro Delta is an ecosystem of major ecological and economic value, for the large expanses of land are used for rice crops. In order to prevent the effect of algae, widespread use is made of pesticides, which contains copper sulfate [14]. Nevertheless, the doses used in pesticides can affect cyanobacteria, which are the greatest primary producers of microbial mats and occupy a large area of the aforesaid Delta. Copper (Cu) is an essential metal for cyanobacteria because forms part of the plastocyanin and a c-type cytochrome oxidase (necessary proteins for the photosynthesis) but at high concentrations cause serious toxic effects [15, 16].

Faced with this problem, our group of work have studied how heavy metals affect the cyanobacteria and microalgae by means of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). On the other hand, many studies have been carried out to demonstrate the capacity of these microorganisms to sequester metals using electron microscopic techniques [17-20].

Among these methodologies SEM-EDX was selected to analyze morphological differences among cyanobacteria and microalgae growing in unpolluted and polluted cultures, and to demonstrate the presence of copper in

the EPS in the same cultures. The advantages of using this methodology is that it allows a qualitative and semi-quantitative analysis of the sample, through determining the chemical constituents of this sample and their respective ratios by comparing the spectra obtained from the assayed microorganisms.

Bearing in mind the problems that copper contamination present in these ecosystems, the aim of this work is to determine the capacity of different phototrophic microorganisms to sequestrate Cu by means of SEM-EDX, and the role of these microorganisms in the copper bioremediation of the Ebro Delta microbial mats.

Materials and Methods

Microorganisms and culture conditions

For this research, four phototrophic microorganisms were chosen: two cyanobacteria from the Pasteur Culture Collection (PCC) [21], *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313, and two microorganisms isolated from Ebro Delta microbial mats, *Microcoleus* sp. DE2006 and the microalga DE2009 [22, 18]. The collection strains were grown in BG-11 and ASN III (1:1 v/v) medium [23], while the isolated microorganisms were grown in Pfennig mineral medium [24]. All microorganisms were maintained at 27 °C and under light conditions ($15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Different concentrations of CuSO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were used in the contamination experiments: 3 nM, 5 nM, 7 nM, 10 nM, 3 μM , 5 μM , 7 μM and 2 mM. All the studies were performed for 9 days in the above-mentioned culture conditions.

Scanning electron microscopy coupled to Energy dispersive X-Ray microanalysis.

For SEM-EDX analysis, samples were uniformly distributed and filtered in Nucleopore™ polycarbonate membrane filters (Whatman, Ltd.). Afterwards, the samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde Millonig's buffer [25] (0.1M and pH4) for 2 h and washed four times in the same buffer. Then, they were dehydrated in increasing gradient concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90 and 100%) and dried by critical point (CPD 030 Critical Point Drier, BAL-TEC GmbH D - 58579 Schalksmühle). Samples were mounted on aluminum metal stubs using an electrically-conductive double-sided adhesive tape and then coated with a 5 µm gold layer (K550 Sputter Coater, Emitech, and Ashford, UK). Finally, samples were viewed in a Zeiss EVO® MA 10 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany) scanning electron microscope. An energy dispersive X-ray spectrophotometer (EDX) Link Isis-200 (Oxford Instruments, Bucks, England) operated at 20 kV coupled to the microscope was used for the elemental analysis of the samples.

Results and Discussion

In this section are listed and discussed the results obtained about the capacity to sequester copper of different cyanobacteria: *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313 from culture collection and *Microcoleus* sp. DE2006 and the microalga DE2009 isolated from Ebro Delta microbial mats.

Chroococcus sp. PCC 9106 is an unicellular marine cyanobacterium that reproduces by binary fission. Cells are coccoid and vary in size from 28 to 32

μm in diameter. Cells occur singly or in pairs and are surrounded by a thick sheath (Fig. 2a).

Spirulina sp. PCC 6313 is a marine gliding filamentous cyanobacterium that divides exclusively by binary fission and grows in the form of an helix. The cross walls are thin and invisible or nearly so with light microscopy. The width of the trichomes is 2 μm (Fig. 2b).

Microcoleus sp. DE2006 is the dominant filamentous cyanobacterium in Ebro Delta microbial mats [26], and plays a very important role in the stabilisation of the deltaic sediments. This cyanobacterium, which also forms a consortium with other heterotrophic bacteria, was isolated by our study group and maintained in laboratory cultures [22]. Filaments of this cyanobacterium are densely packed and surrounded by an homogeneous sheath that is sometimes coiled together in an irregularly screw-like form. Cells from filaments vary in size from 3.13 to 3.75 μm (Fig. 2c). The identification and characterization of the strain has been carried out according to Bergey's manual [27].

The microalga DE2009 was also isolated by our group from the Ebro Delta samples [18]. This is an eukaryote phototrophic microorganism, that like *Microcoleus* sp. DE2006, forms a consortium with different heterotrophic bacteria. The microalga DE2009 cells are spherical, with a diameter of 7-9 μm and its chloroplasts are distributed laterally in the cell (Fig. 2d).

All microorganisms studied present EPS cellular envelopes. With respect to the functions of the EPS, various authors have suggested protection against dehydration and UV radiation, biomineralization, phagocytosis and adhesion

capacity to sequester metals [28, 29]. In the present study, we essayed different metal doses from 3 nM to 2 mM of Cu on all the microorganisms tested.

Figure 3 details the results obtained from the *Chroococcus* sp. PCC 9106 experiments, showing the corresponding images of this microorganism at different tested concentrations and its EDX spectra. The graphs demonstrate the ability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 to extracellularly capture copper in EPS envelopes. In this case, a peak corresponding to this metal (Fig. 3f) is detected from 5 nM of Cu. In contrast, *Spirulina* sp. PCC 6313, though also able to sequester copper, did not yield a positive result until 2 mM of Cu (Fig. 4h).

As regards microorganisms from the natural environment (*Microcoleus* sp. DE2006 and the microalga DE2009), both sequestered copper in the EPS, the first from a concentration of 10 nM (Fig. 5h) and the second from 5 μ M (Fig. 6f).

Comparison of the obtained results demonstrates that all tested microorganisms are capable of extracellularly sequestering copper. However, the fact that *Spirulina* sp. PCC 6313 has a much thinner envelope than the other microorganisms might explain why higher doses of the metal are required to obtain a positive result. From these results, we think, that the sensitivity of the technique is very good since it can detect metal uptake at very low doses (5 nM of Cu). Moreover, it is also important to highlight that the doses of metal used in this work could be lower than those used in pesticides to inhibit the growth of algae in rice fields. Additionally, the results obtained by Seder-Colomina et al., (sent to *Ecotoxicology*) demonstrate that the limits between the copper dose having cytotoxic effect and that having an essential effect are very close in cyanobacteria.

Conclusions

From the results obtained in this paper, it can be concluded that phototrophic microorganisms play a very important role in the bioreparation of sediments polluted by copper, due to their ability to bioaccumulate this metal in the EPS. We have also been led to conclude that SEM-EDX is an effective tool for this type of study.

Finally, we believe that the use of pesticides containing copper salts in agricultural areas close to microbial mats should be reviewed, due to the toxicity of copper, which mainly affects the cyanobacteria responsible for the stability of these ecosystems.

Acknowledgments This research was supported by the following grant: DGICYT (CGL2008-01891/BOS). We express our thanks to the staff of the *Servei de Microscòpia* and the *Servei de llengües* both at the *Universitat Autònoma de Barcelona*; Marc Alamany from *Ecologia Portuària S. L.* and Cristina Sosa for their help in this work.

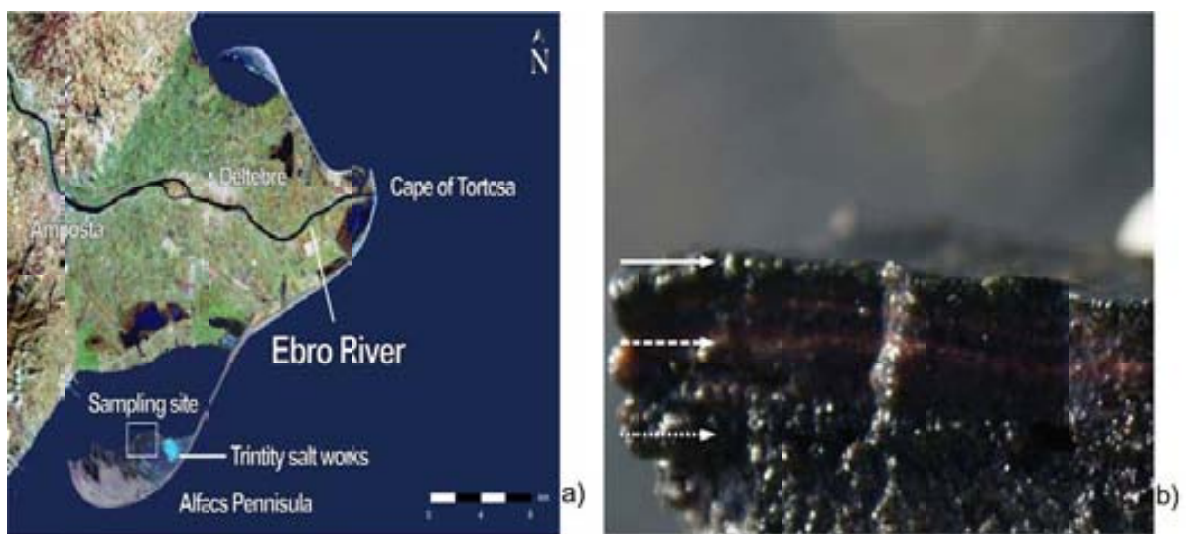


Fig. 1 Ebro Delta microbial mats location a). Microbial mat structure. Phototrophic microorganisms, green layer (—); purple sulfur bacteria, red layer (---) and sulfate reducing bacteria, black layer (····) b).

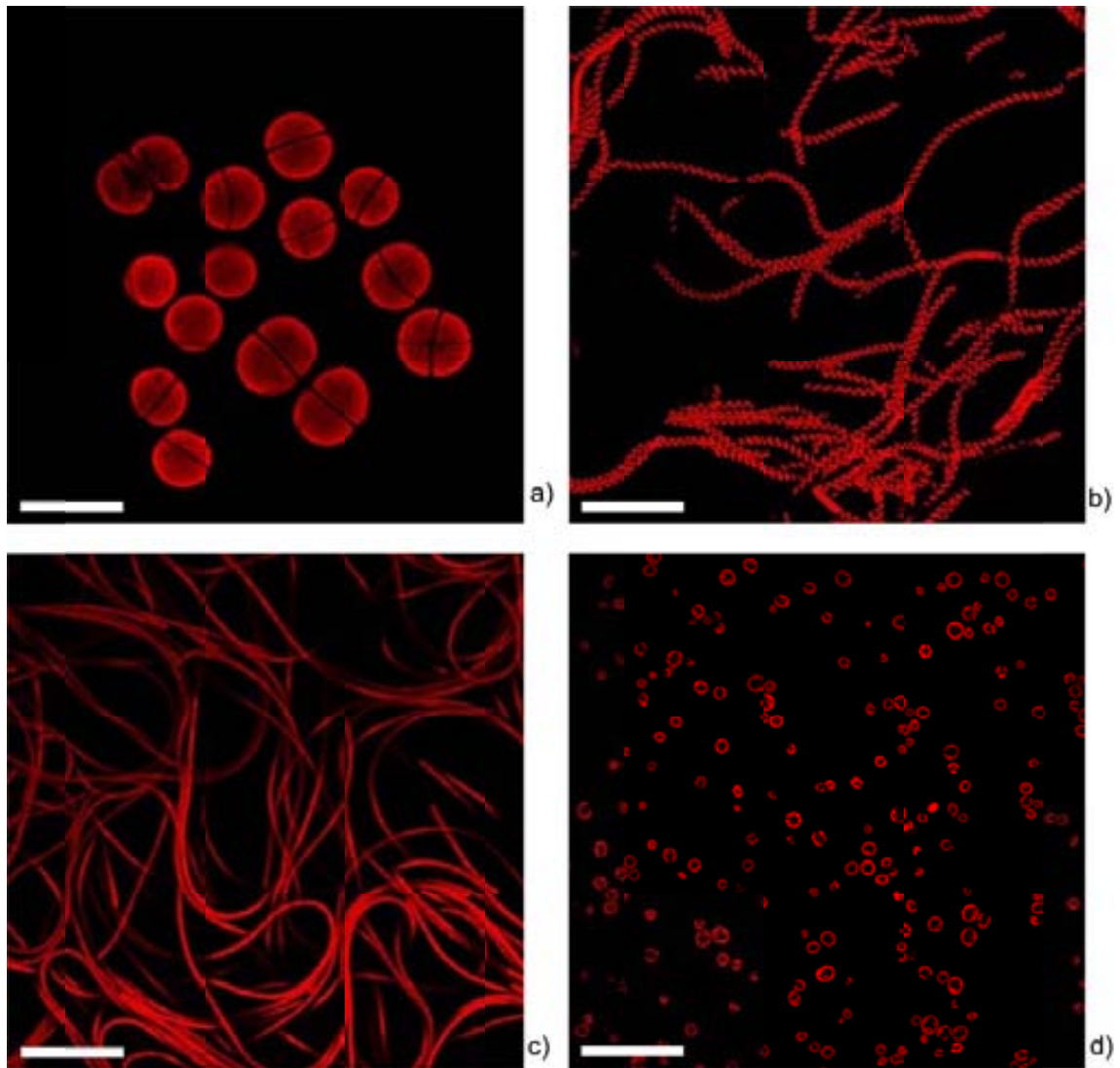


Fig. 2 Confocal images of *Chroococcus* sp. PCC 9106 a), *Spirulina* sp. PCC 6313 b), *Microcoleus* sp. DE2006 c) and microalga DE2009 d). Scale bar represents 50 μm .

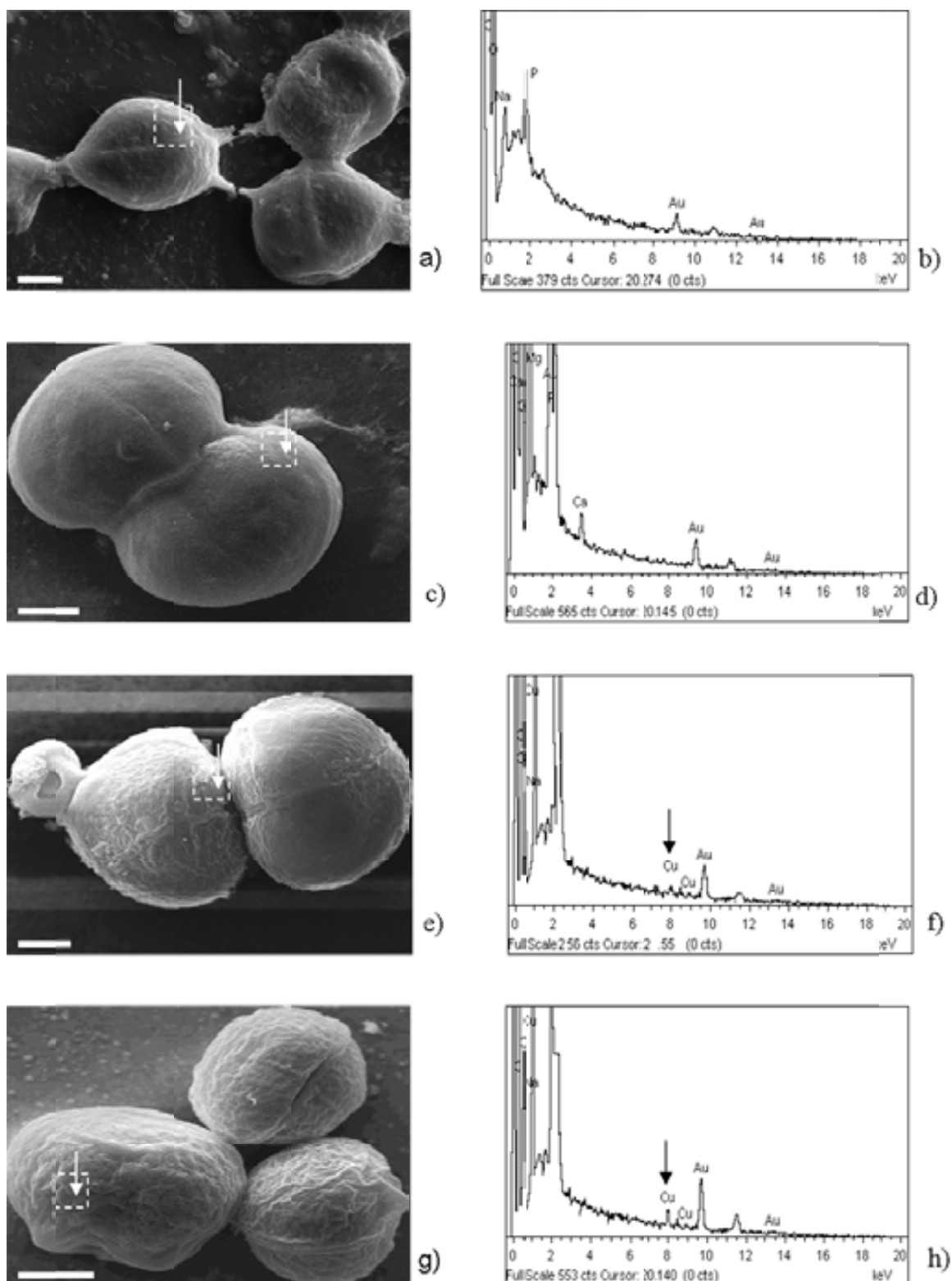


Fig. 3 SEM images of *Chroococcus* sp. PCC 9106. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (3, 5 and 7 nM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peaks are indicated by arrows. Bars represent 5 μ m.

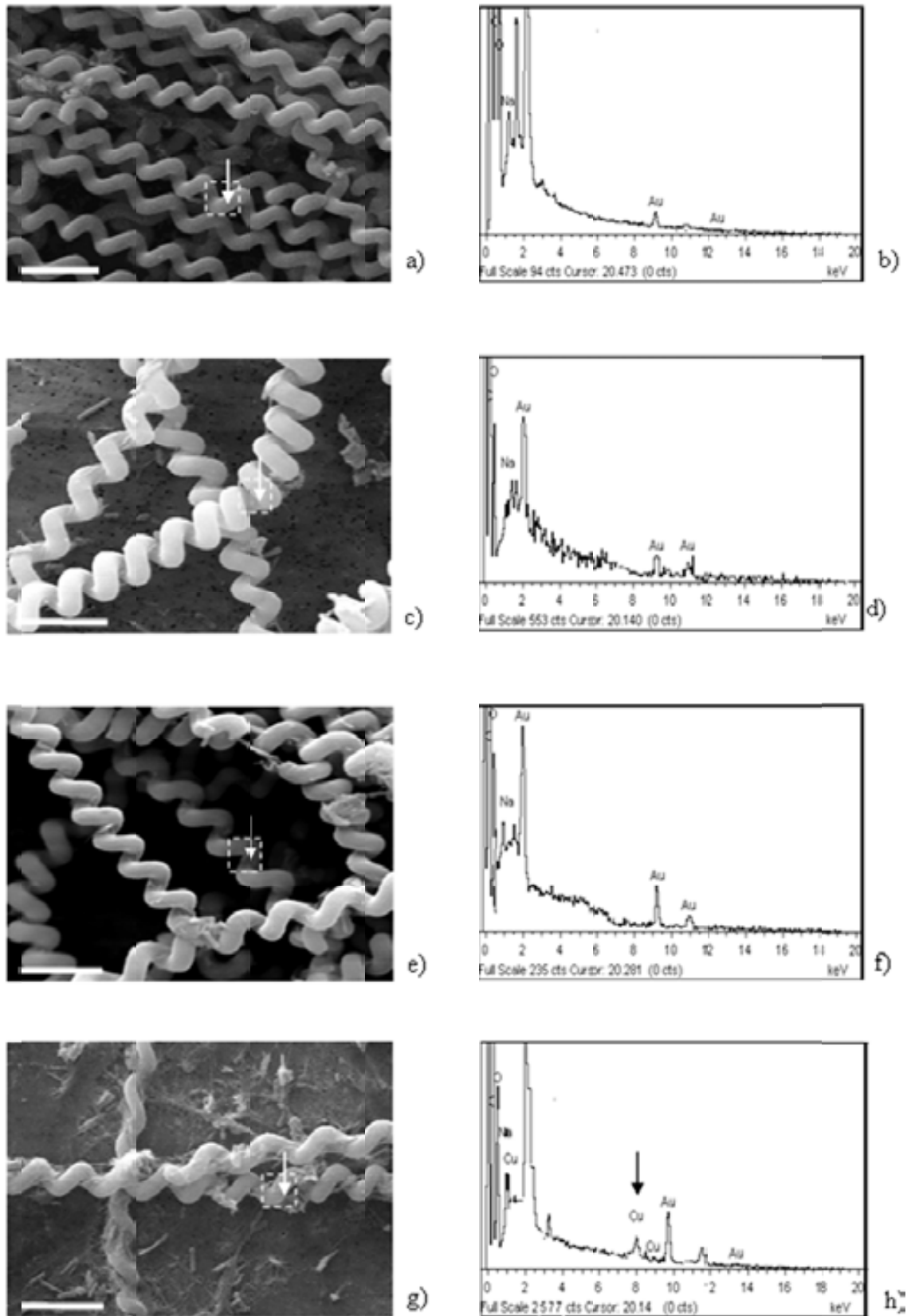


Fig. 4 SEM images of *Spirulina* sp. PCC 6313. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (7 and 10 nM; and 2 mM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peak is indicated by arrow. Bars represent 5 μm.

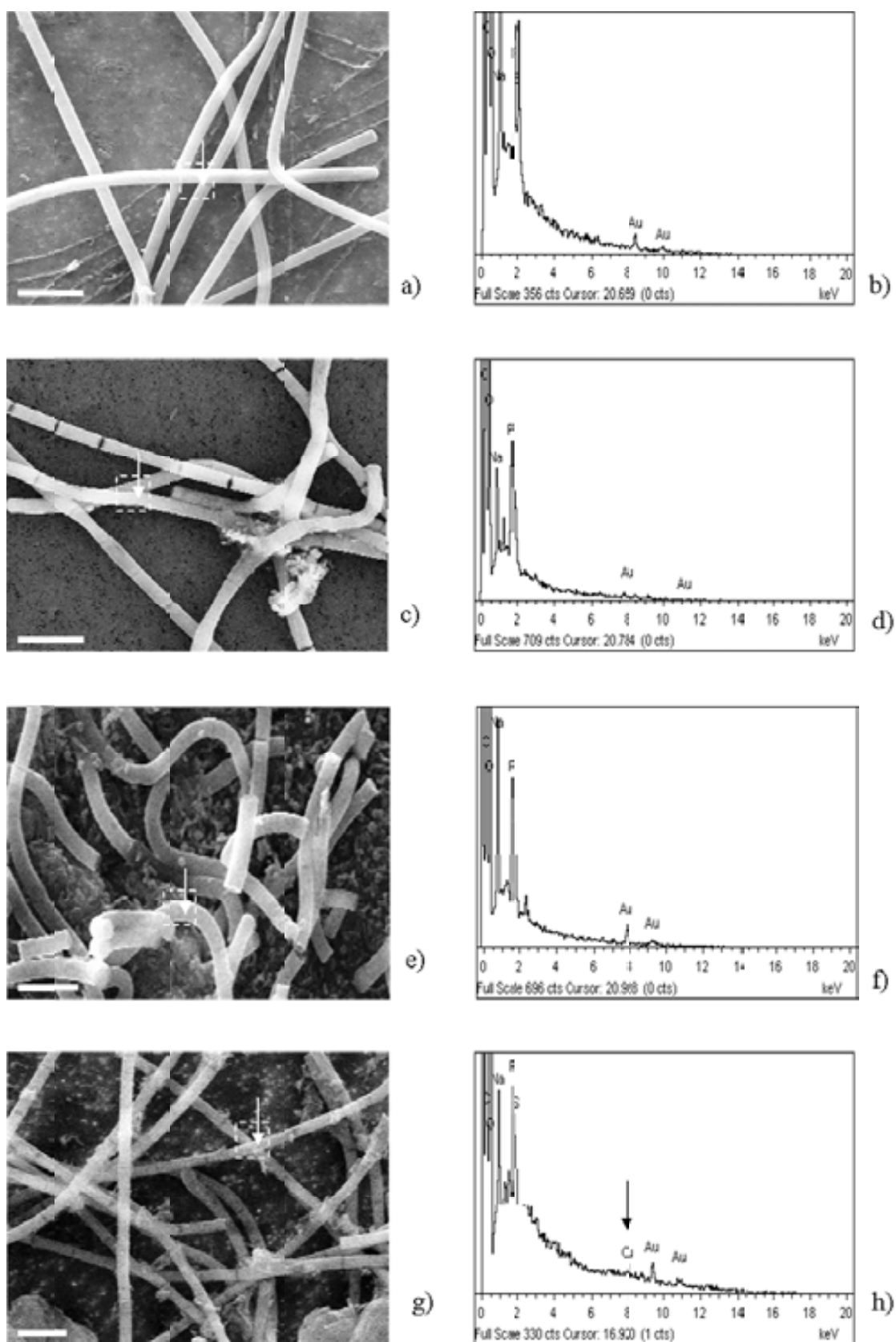


Fig. 5 SEM images of *Microcoleus* sp. DE2006. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (3, 7, and 10 nM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peak is indicated by arrow. Bars represent 10 μ m.

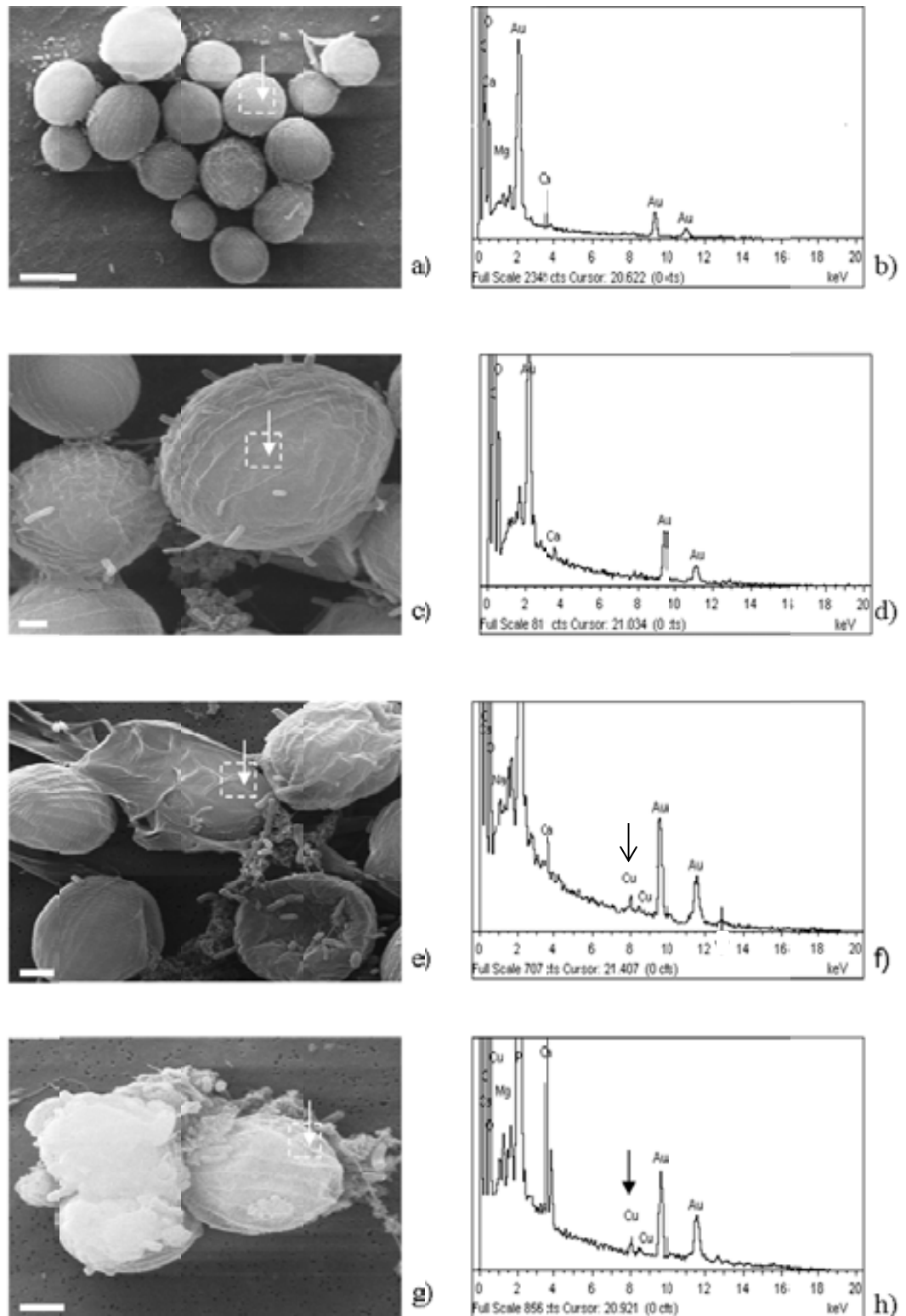


Fig. 6 SEM images of the microalga DE2009. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (3, 5 and 7 μM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peaks are indicated by arrows. Bar represents 10 μm in figure a) and 2 μm in figures c), e) and g).

Chroococcus sp. PCC 9106 is an unicellular marine cyanobacterium that reproduces by binary fission. Cells are coccoid and vary in size from 28 to 32 μm in diameter. Cells occur singly or in pairs and are surrounded by a thick sheath (Fig. 2a).

Spirulina sp. PCC 6313 is a marine gliding filamentous cyanobacterium that divides exclusively by binary fission and grows in the form of an helix. The cross walls are thin and invisible or nearly so with light microscopy. The width of the trichomes is 2 μm (Fig. 2b).

Microcoleus sp. DE2006 is the dominant filamentous cyanobacterium in Ebro Delta microbial mats [26], and plays a very important role in the stabilisation of the deltaic sediments. This cyanobacterium, which also forms a consortium with other heterotrophic bacteria, was isolated by our study group and maintained in laboratory cultures [22]. Filaments of this cyanobacterium are densely packed and surrounded by an homogeneous sheath that is sometimes coiled together in an irregularly screw-like form. Cells from filaments vary in size from 3.13 to 3.75 μm (Fig. 2c). The identification and characterization of the strain has been carried out according to Bergey's manual [27].

The microalga DE2009 was also isolated by our group from the Ebro Delta samples [18]. This is an eukaryote phototrophic microorganism, that like *Microcoleus* sp. DE2006, forms a consortium with different heterotrophic bacteria. The microalga DE2009 cells are spherical, with a diameter of 7-9 μm and its chloroplasts are distributed laterally in the cell (Fig. 2d).

All microorganisms studied present EPS cellular envelopes. With respect to the functions of the EPS, various authors have suggested protection against dehydration and UV radiation, biomineralization, phagocytosis and adhesion capacity to sequester metals [28, 29]. In the present study, we assayed different metal doses from 3 nM to 2 mM of Cu on all the microorganisms tested.

Figure 3 details the results obtained from the *Chroococcus* sp. PCC 9106 experiments, showing the corresponding images of this microorganism at different tested concentrations and its EDX spectra. The graphs demonstrate the ability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 to extracellularly capture copper in EPS envelopes. In this case, a peak corresponding to this metal (Fig. 3f) is detected from 5 nM of Cu. In contrast, *Spirulina* sp. PCC 6313, though also able to sequester copper, did not yield a positive result until 2 mM of Cu (Fig. 4h).

As regards microorganisms from the natural environment (*Microcoleus* sp. DE2006 and the microalga DE2009), both sequestered copper in the EPS, the first from a concentration of 10 nM (Fig. 5h) and the second from 5 μ M (Fig. 6f).

Comparison of the obtained results demonstrates that all tested microorganisms are capable of extracellularly sequestering copper. However, the fact that *Spirulina* sp. PCC 6313 has a much thinner envelope than the other microorganisms might explain why higher doses of the metal are required to obtain a positive result. From these results, we think, that the sensitivity of the technique is very good since it can detect metal uptake at very low doses (5 nM of Cu). Moreover, it is also important to highlight that the doses of metal used in this work could be lower than those used in pesticides to inhibit the growth of algae in rice fields. Additionally, the results obtained by Seder-Colomina et al.,

(sent to *Ecotoxicology*) demonstrate that the limits between the copper dose having cytotoxic effect and that having an essential effect are very close in cyanobacteria.

Conclusions

From the results obtained in this paper, it can be concluded that phototrophic microorganisms play a very important role in the bioreparation of sediments polluted by copper, due to their ability to bioaccumulate this metal in the EPS. We have also been led to conclude that SEM-EDX is an effective tool for this type of study.

Finally, we believe that the use of pesticides containing copper salts in agricultural areas close to microbial mats should be reviewed, due to the toxicity of copper, which mainly affects the cyanobacteria responsible for the stability of these ecosystems.

Acknowledgments This research was supported by the following grant: DGICYT (CGL2008-01891/BOS). We express our thanks to the staff of the *Servei de Microscòpia* and the *Servei de llengües* both at the *Universitat Autònoma de Barcelona*; Marc Alamany from *Ecología Portuaria S. L.* and Cristina Sosa for their help in this work.

References

- [1] Esteve I, Martínez-Alonso M, Mir J. Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain. Preliminary studies. *Limnetica*. 1992; 8:185-195.
- [2] Guerrero R, Piqueras M, Berlanga M. Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *International Microbiology*. 2002; 5:177-188.
- [3] Wieland A, Kuhl M, McGowan L, Fourçans A, Duran R, Caumette P, García de Oteyza T, Grimalt JO, Solé A, Diestra E, Esteve I, and Herbert RA. Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. *Microbial Ecology*. 2003; 46:371-390.
- [4] Fourçans A, García de Oteyza T, Wieland A, Solé A, Diestra E, van Bleijswijk J, Grimalt JO, Kuhl M, Esteve I, Muyzer G, Caumette P and Duran R. Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue, France). *FEMS Microbiology Ecology*. 2004; 51:55-70.
- [5] Brunberg AK, Nilsson E, Blomqvist P. Characteristics of oligotrophic hardwater lakes in a postglacial land-rise area in mid Sweden. *Freshwater Biology*. 2002; 47:1451-1462.
- [6] Hoehler TM, Bebout BM, Des Marais DJ. *Nature*. 2001;412:324-327.
- [7] Olendzenski LC. Growth, fine structure and cyst formation of a microbial mat ciliate: *Pseudocohnilembus pusillus* (Ciliophora, Scuticociliatida). *The Journal of Eukariotic Microbiology*. 1999;46:132-141.
- [8] Campbell SE. Soil stabilization by a prokaryotic desert crust: implications for Precambrian land biota. *Origins of Life*. 1979;9:335-348.
- [9] Nakagawa T, Fukui, M. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2002;48:211-222.
- [10] Watanabe Y, Martini JEJ, Ohmoto H. Geochemical evidence for terrestrial ecosystems 2.6 billion years ago. *Nature*, 2000;408:574-578.
- [11] Jungblut AD, Neilan BA. NifH-gene diversity and expression in a microbial mat community on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Antarctic Science*, 2010;22:117-122.
- [12] Kato S, Kobayashi C, Kakegawa T, Yamagishi A. Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology*. 2009;11:2094-2111.
- [13] Mañosa S, Mateo R, Guitart R. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2001;71:187-205.

- [14] Salam D, El-Fadel M. Mobility and availability of copper in agricultural soils irrigated from water treated with copper sulfate algacide. *Water, Air & Soil Pollution*. 2008;195:3-13.
- [15] De la Cerda B, Castielli O, Durán RV, Navarro JA, Hervás M, De la Rosa MA. A proteomic approach to iron and copper homeostasis in cyanobacteria. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*. 2008;6:322-329
- [16] Surosz W, Palinska KA. Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2004;48:40-48.
- [17] Burnat M, Diestra E, Esteve I, Solé A. Confocal laser scanning microscopy coupled to a spectrofluorometric detector as a rapid tool for determining the *in vivo* effect of metals on phototrophic bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010;84:55-60.
- [18] Maldonado J, de los Rios A, Esteve I, Ascaso C, Puyen ZM, Brambilla C, Solé A. Sequestration and *in vivo* effect of lead on DE2009 microalga, using high-resolution microscopic techniques. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;83:44-50.
- [19] Maldonado J, Solé A, Puyen ZM, Esteve I. Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquatic Toxicology*. 2011;104:135-144.
- [20] Esteve I, Maldonado J, Diestra E, Burnat M, Solé A. Confocal laser scanning and electron microscopic techniques as powerful tools for determining the *in vivo* effect and sequestration capacity of lead in cyanobacteria. In: A. da Silva Ferrão Filho, ed. *Cyanobacteria: Toxicity, Ecology and Management*. 2012 *In press*.
- [21] Herdman M, Iteman I, Rippka R. *Catalogue of Cyanobacterial strains*. 2nd ed. Paris, Institut Pasteur; 2005.
- [22] Diestra E, Solé A, Martí M, García de Oteyza T, Grimalt JO, Esteve I. Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Scanning*. 2005;27:176-180.
- [23] Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 1979;111:1-61.
- [24] Pfennig N, Trüper HG. The family of Chromatiaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH eds. *The prokaryotes*, 2nd edn. Berlin: Springer-Verlag; 1992:3200-3221.

-
- [25] Millonig GJ. Advantages of phosphate buffer OsO_4 solutions in fixation. *Journal of Applied Physics*. 1961;32:1637.
- [26] Solé A., Diestra E. and Esteve I. (2009) Confocal laser scanning microscopy image analysis for cyanobacterial biomass determined at microscale level in different microbial mats. *Microbial Ecology*. 2009;57:649-656.
- [27] Castenholz RW. Phylum BX Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, eds. *Bergey's Manual Systematic Bacteriology, vol. 1, The Archea and deeply branching and phototrophic bacteria*. New York: Springer-Verlag; 2001:473-599.
- [28] Decho AW. Exopolymers in microbial mats: assessing their adaptative roles. In: Stal LJ, Caumette P eds. *Microbial Mats. Structure, development and environment significance*. Berlin: Springer-Verlag, 1994:215-219.
- [29] Pereira S, Micheletti E, Zille A, Santos A, Moradas-Ferreira P, Tamagnini P, De Philippis R. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: Do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology*. 2011;157:451-458.

3.3.3. Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester heavy metals.

En los dos apartados anteriores se han estudiado separadamente diferentes microorganismos fotótrofos para determinar su capacidad para tolerar o resistir el cobre, un metal que se ha demostrado es muy tóxico incluso a muy bajas concentraciones. Estos mismos microorganismos se encuentran en el delta del Ebro (Tarragona, España), un área protegida, que recibe la contaminación por metales, que arrastra el río Ebro como resultado de la contaminación agrícola e industrial. Los tapetes microbianos ocupan un área importante de este ecosistema, los cuáles también a su vez se han visto afectados por dicha contaminación. Los microorganismos mencionados forman parte de los tapetes microbianos que estabilizan el delta al formar consorcios entre ellos y los microorganismos heterotróficos.

Diferentes estudios realizados por nuestro grupo de trabajo constatan la habilidad, especialmente de las cianobacterias y también de *Scenedesmus* sp DE2011 una microalga para captar metales. No obstante y en general no se conocen estudios que analicen la habilidad de las asociaciones entre microorganismos para captar metales frente a la captación de los mismos en su crecimiento individual.

El objetivo de este artículo ha sido, por tanto el determinar la capacidad de dos consorcios (Sp+Ch) y (Ge+Sc) tanto para tolerar-resistir el cobre y el plomo como para biocaptarlos. Al mismo tiempo se han considerado los mismos microorganismos por separado para comparar ambos resultados y de

este modo poder evaluar si los consorcios son más eficientes para captar metales.

Las técnicas utilizadas específicamente para este objetivo han sido: el CLSM-*Ascan*; el SEM-EDX y el TEM-EDX, que se ha descrito en la sección 2.5. Los resultados obtenidos demuestran que los dos consorcios son especialmente muy tolerantes-resistentes al plomo y con una gran capacidad para captarlo, tanto extracelularmente, en sus envueltas de sustancias poliméricas extracelulares, como intracelularmente, en sus inclusiones de polifosfato.

Sin embargo, aunque los consorcios mantienen también la capacidad de captar cobre extracelularmente, toleran dosis inferiores de este metal, por lo que se concluye que son mejores bioreparadores de plomo que de cobre.

No obstante en todos los casos es mayor el efecto bioreparador de los consorcios que de los microorganismos creciendo por separado, ya que suman su capacidad de captación sin que se observe ningún efecto inhibitorio entre los microorganismos que los forman.

El trabajo que se presenta en este artículo, abre nuevas perspectivas para una mejor comprensión del papel de los consorcios en los ecosistemas naturales contaminados por metales.

Este artículo está pendiente de publicación en la revista *Aquatic Toxicology*, por este motivo se adjunta en el Anexo I.

4. Discusión.

La actividad industrial y agrícola (como se ha mencionado con anterioridad) genera graves problemas al verter en los ríos sus residuos, los cuales se acumulan en los sedimentos durante su curso o se depositan finalmente en los deltas. Uno de los ejemplos más recientes de gravísima contaminación ambiental es la que ha soportado el río Ebro, durante muchos años, almacenando en sus sedimentos toneladas de fango, contaminado por el vertido indiscriminado de residuos procedentes de la fábrica de Flix (Tarragona). Desgraciadamente el tema es de actualidad, ya que la recuperación del río es una obra prácticamente de ingeniería, altamente costosa y que requiere un complejo equipo de profesionales para llevar a cabo la detoxificación.

Los deltas son zonas en general muy ricas desde un punto de vista agrícola y ecológico, y que por otra parte es necesario conservar, como es el caso del delta del Ebro ya que forma parte de la lista de Zonas Húmedas de Importancia Internacional (Convención Ramsar), un tratado intergubernamental que esta en vigor y además cabe resaltar que desde el año 1983 la mayor parte de las áreas naturales de este delta, se reconocen como “Parque Natural del delta del Ebro”, debido a su importancia biológica y cultural.

Diferentes estrategias se han ensayado para recuperar los ambientes que ya han sido y que continúan siendo contaminados por los vertidos, entre ellos los materiales pesados. Aunque haya una tendencia generalizada en identificar los vertidos industriales como responsables de la contaminación por metales, se debe considerar que muchos de los fertilizantes y plaguicidas utilizados en los cultivos agrícolas como en el caso del arroz contiene

contaminantes metálicos que por la frecuencia con la que estos productos se utilizan agravan el problema. En la presente tesis se han seleccionado dos metales el cobre y el plomo que se han encontrado como contaminantes habituales en el río Ebro, valorándose cuales son las fuentes de contaminación por estos metales y su impacto a nivel estatal. Así, dosis de plomo de 50-1450 mg Kg⁻¹ se han encontrado en los análisis químicos de los productos que se aplican en el cultivo de arroz en España, principalmente en los fertilizantes fosfatados (Webber et al., 1984 y Alloway et al., 1988). Más recientemente Nziguheba & Smolders, (2008) estimaron que en países europeos, incluida España, el vertido de plomo a través de los fertilizantes podría llegar a ser de 2.9 mg Kg⁻¹.

Por otra parte de acuerdo con Gimeno-García et al., (1996), trazas importantes de este metal se han encontrado también en los pesticidas de uso común en este mismo tipo de actividad agrícola en cantidades que van desde 5 hasta 10 mg Kg⁻¹.

En este mismo sentido, para el caso del cobre llama la atención que su fuente de contaminación no solo sean los alguicidas, sino también los fertilizantes que se constituyen en una importante fuente adicional de este metal. Según Gimeno-García et al., (1996), en un cálculo realizado en la década de los años 90, en España se utilizaba 99.3 Kg Ha⁻¹ de fertilizantes en las tierras cultivadas y 29.9 Kg Ha⁻¹ de pesticidas cada año. Estos datos, así como la información obtenida en esta tesis doctoral demuestran hasta que punto es necesaria la innovación constante de tecnologías, que ayuden a paliar este grave problema medioambiental.

Hasta ahora los métodos de extracción utilizados como se ha mencionado en el Capítulo 1 ante una contaminación considerada como grave, son métodos físico-químicos: electro químicos, de intercambio iónico, entre otros (Bai et al., 2008). Estos últimos además de muy costosos, normalmente generan a su vez nuevas contaminaciones. De ahí que aún siendo necesarios se considere a su vez, la utilización de microorganismos cuando ello sea posible.

Sin embargo, se conoce muy poco del papel que puedan tener los microorganismos, especialmente los consorcios, en su propio ambiente natural en la captación de metales, principalmente cuando las dosis de estos no son elevadas y que por tanto no se consideran como de alto riesgo ambiental.

Este es el caso del delta del Ebro, un ecosistema (descrito en el Capítulo 1 de esta tesis) en el que existe una abundante proliferación de tapetes microbianos, en los que se da una gran abundancia de cianobacterias y microalgas que forman estrechas interacciones entre ellas y otros microorganismos heterótrofos (consorcios).

Si resulta poco conocido el papel de estos microorganismos en forma individual en la detoxificación por metales, todavía es menos conocido el papel de los consorcios y especialmente de los microorganismos que son autóctonos en el ambiente natural, ya que la mayor parte de los trabajos publicados se han realizado en cultivos de laboratorio.

Estos estudios aunque aportan muchos datos, no son en ocasiones extrapolables a los hábitas naturales.

Considerando lo expuesto, y como ya se ha mencionado, el objetivo de la presente tesis doctoral, ha sido determinar la capacidad de los consorcios de microorganismos fotótrofos para reparar ambientes contaminados por metales, en este caso los tapetes microbianos del delta del Ebro. Para ello los microorganismos que forman los consorcios se han seleccionado a partir de microorganismos aislados del propio hábitat natural o de la colección de cultivos Pasteur, pero que se consideraron previamente que también eran muy abundantes en los tapetes microbianos. Se ha partido para esta tesis de la información obtenida en trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo, en lo que hace referencia a la capacidad bioreparadora o bioindicadora de diferentes microorganismos frente a distintos metales (Burnat et al., 2009; Maldonado et al., 2011; Puyen et al., 2012a; Puyen et al., 2012b, y **en la presente tesis**)

En el capítulo 3 se ha expuesto el trabajo experimental realizado en la presente tesis doctoral en tres secciones que se discuten a continuación.

Uno de los principales problemas para determinar la capacidad bioreparadora de los microorganismos fotótrofos, que por otra parte son los más abundantes en los tapetes microbianos y en muchos otros tipos de ecosistemas, es disponer de técnicas apropiadas tanto para determinar su capacidad de T-R a los metales, como para evaluar su habilidad para captarlos.

En este sentido tanto en trabajos previos como en la presente tesis se han puesto a punto metodologías alternativas, dada la imposibilidad de utilizar métodos clásicos, en microorganismos que tienen dificultad para crecer o que incluso no crecen en medios sólidos. Para ello se han realizado distintos

experimentos para solventar este problema. Los mejores resultados se han obtenido mediante la aplicación del CLSM-*λscan*, que permite determinar las variaciones de intensidad de fluorescencia media (MFI) de los microorganismos *in vivo*, a nivel celular y sin manipulación de la muestra (Burnat et al., 2010, Maldonado et al., 2010b, y **en la presente tesis**).

Sin embargo, se desconocía la sensibilidad de esta técnica y tampoco se había estudiado un amplio rango de concentraciones de metales que permitieran comparar en los consorcios los espectros de la MFI de las diferentes concentraciones de metales, con respecto a los experimentos control y además con precisión hasta un nivel de concentración nanomolar.

En este Capítulo de Discusión, se suman los resultados obtenidos mediante tablas, para una mejor comprensión de estos.

En la Tabla 1, se indican los resultados obtenidos mediante esta metodología con respecto al cálculo de la sensibilidad de la técnica y la T-R de los microorganismos que forman los consorcios con respecto al cobre y al plomo.

Tabla 1. Capacidad de los consorcios para tolerar o resistir diferentes concentraciones de cobre y plomo evaluada mediante **CLSM-λscan**.

Consortios	Microorganismo	Concentraciones de Cu ensayadas	T-R ⁵
Sp ¹ + Ch ²	Sp	1 [*] , 3, 5, 7, 10 nM	1 nM
	Ch	1, 3, 5, 7, 10 nM	1 nM
Ge ³ + Sc ⁴	Ge	0.1, 0.3, 1, 5, 7 μM	1 μM
	Sc	0.1, 0.3, 1, 5, 7 μM	1 μM
		Concentraciones de Pb ensayadas	
Sp + Ch	Sp	0.1, 0.5, 0.75, 1, 2 mM	0.1 mM
	Ch	0.1, 0.5, 0.75, 1, 2 mM	0.1 mM
Ge + Sc	Ge	0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mM	0.75 mM
	Sc	0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mM	0.1 mM

1. *Spirulina* sp. PCC 6313
 2. *Chroococcus* sp. PCC 9106
 3. *Geitlerinema* sp. DE2011
 4. *Scenedesmus* sp. DE2009
 5. Tolerancia - Resistencia
- *. Sensibilidad de la técnica

Por los resultados expuestos se ha determinado que la sensibilidad de la técnica es de 1nM. Ello indica la fiabilidad de este método, ya que permite detectar dosis muy bajas del metal. Cabe además resaltar que la técnica se aplica *in vivo*, y a nivel celular.

Por otra parte para que los consorcios puedan ser considerados bioreparadores de metales, es importante conocer su T-R a los metales. Los resultados indicados en la misma tabla, señalan que el consorcio formado por los microorganismos aislados del delta del Ebro (Ge+Sc) son más resistentes al cobre (1 μ M; 1 μ M) que los microorganismos de colección que forman el consorcio (Sp+Ch) (1 nM; 1 nM) y que por lo tanto este último consorcio es altamente sensible al metal. También, autores como Sunda et al., (1995), demostraron la alta toxicidad de este metal a dosis muy bajas (desde 0.5 hasta 5 nM) en *Synechococcus* sp. En esta tesis también, se demostró en el apartado 3.3.1 que la dosis tóxica para Sp y Ch está muy próxima a la dosis necesaria para su crecimiento.

En todos los resultados obtenidos se observa también una correlación inversa entre el espectro de la MFI y la dosis de metal ensayada, lo que se manifiesta por una disminución de la MFI a mayores concentraciones de metal. En este mismo sentido, resultados similares se mostraron en la presente tesis cuando se evaluó la T-R de estos mismos microorganismos frente al cobre, pero en cultivo individual, tal como se discutió en el apartado antes mencionado (3.3.1). En este mismo apartado se indica el efecto del cobre en la plastocianina que implica una disminución de la autofluorescencia en el proceso de la fotosíntesis según experimentos realizados por De la Cerda et al., (2008).

Sin embargo Ch y Sc mostraron en los cultivos de sus respectivos consorcios una fotoestimulación a dosis más altas de metal, que se ha descrito también por otros autores como un efecto negativo (Kimimura & Katoh, 1975). Similares resultados obtuvieron Shing et al., (2012) al exponer distintas cianobacterias a los metales pesados.

Con respecto al plomo, también el consorcio Ge+Sc es más resistente (0.75 mM; 0.1 mM) que el consorcio Sp+Ch (0.1 mM; 0.1 mM).

En general, puede además concluirse que ambos consorcios son más resistentes al plomo que al cobre, pero que el consorcio (Ge+Sc) tiene además una mayor T-R a ambos metales. Esto último tiene especial relevancia ya que los microorganismos que componen este consorcio son autóctonos del ambiente natural estudiado.

Como se ha indicado en el Capítulo de Resultados, una vez analizada la T-R de los consorcios, el siguiente objetivo era determinar su capacidad para captar metales, tanto extra como intracelularmente.

También en este caso, se habían ensayado con anterioridad diferentes microorganismos tanto heterótrofos como fotótrofos y distintos metales (Maldonado et al., 2010; Maldonado et al., 2011; Puyen et al., 2012 y **la presente tesis**) pero se desconocía igualmente en este aspecto el papel de los consorcios de microorganismos fotótrofos en dicha captación. Al igual que en el caso de la T-R, también se desconocía la sensibilidad del SEM-EDX y del TEM-EDX para captar metales.

En la Tabla 2., también se sumarizan los resultados obtenidos tanto de evaluar la sensibilidad del SEM-EDX, como de analizar la captación externa del metal por esta misma técnica.

Tabla. 2. Capacidad de los consorcios para la captación extracelular de diferentes concentraciones de cobre y plomo evaluada mediante el SEM-EDX.

ConSORCIOS	Microorganismo	Concentraciones de Cu ensayadas	C.E.C. Cu ⁵
Sp ¹ + Ch ²	Sp	1, 3, 5, 7, 10* nM	+ 10nM ⁸
	Ch	1, 3, 5, 7, 10 nM	+ 10nM ⁸
Ge ³ + Sc ⁴	Ge	0.1, 0.3, 1, 5, 7 μM	+ 5 μM ⁸
	Sc	0.1, 0.3, 1, 5, 7 μM	+ 0.3 μM ⁸
		Concentraciones de Pb ensayadas	C.E.C. Pb ⁶
Sp + Ch	Sp	0.1, 0.5, 0.75, 1, 2 mM	+ 1 mM ⁹
	Ch	0.1, 0.5, 0.75, 1, 2 mM	+ 1 mM ⁹
Ge + Sc	Ge	0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mM	+ 0.75 mM ⁹
	Sc	0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mM	N.D ⁷

1. *Spirulina* sp. PCC 6313

2. *Chroococcus* sp. PCC 9106

3. *Geitlerinema* sp. DE2011

4. *Scenedesmus* sp. DE2009

5. Captación Extracelular de cobre

6. Captación Extracelular de plomo

7. No detectado a las concentraciones ensayadas en este trabajo

8. Dosis desde la cual se detecta captación de cobre

9. Dosis desde la cual se detecta captación de plomo

*. Sensibilidad de la técnica

Con respecto a la captación extracelular de cobre y plomo, por parte de ambos consorcios, se ha podido demostrar mediante el SEM-EDX, que ambos consorcios son eficientes en la captación de ambos metales, que se retienen en las envueltas celulares de los microorganismos que están formadas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

La captación externa del cobre se detecta a partir de 10 nM en ambos microorganismos del consorcio (Sp+Ch), mientras que en el consorcio (Ge+Sc) se detecta a partir de 5000 nM y 30 nM respectivamente.

Para el plomo, la captación externa se detecta a partir de 1 mM en los dos microorganismos del consorcio (Sp+Ch), y a partir de 0.75 mM para el consorcio (Ge+Sc) con excepción del microorganismo Sc en el que no se pudo detectar plomo a las concentraciones ensayadas.

Se ha demostrado repetidas veces y por distintos autores que el EPS retiene en general los metales (Decho, 1994). También Sharma et al., (2008) demostraron la captación de cromo en cultivos de *Nostoc* y *Gloeocapsa* sp, en forma pasiva, lo que significa para el microorganismo el poder contar con una barrera detoxificadora de metales. Trabajos más recientes realizados por Puyen et al (2012) demostraron además la afinidad por los diferentes metales que pueden tener distintos componentes químicos de la célula como: ácidos urónicos, proteínas y carbohidratos, en *Micrococcus luteus* DE2008, un microorganismo heterótrofo también aislado de los tapetes microbianos del delta del Ebro. También en el presente trabajo se ha determinado la captación intracelular del cobre y el plomo por parte de ambos consorcios, mediante el TEM-EDX. Este tipo de captación implica que las células estén vivas, ya que se trata de un proceso activo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3, corresponden únicamente a la contaminación por plomo, ya que en el caso del cobre se detectó contaminación externa debida a este metal y por tanto los resultados no fueron concluyentes.

Tabla. 3. Capacidad de los consorcios para la captación intracelular de diferentes concentraciones de plomo evaluada mediante el **TEM-EDX**.

Consortios	Microorganismo	Concentraciones de Pb ensayadas	C.I.C. Pb ⁵
Sp ¹ + Ch ²	Sp	0.1, 0.5, 0.75, 1, 2 mM	+ 1 mM ⁶
	Ch	0.1, 0.5, 0.75, 1, 2 mM	+ 0.75 mM ⁶
Ge ³ + Sc ⁴	Ge	0.05, 0.1*, 0.25, 0.5, 0.75 mM	+ 0.1 mM ⁶
	Sc	0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 mM	+ 0.1 mM ⁶

1. *Spirulina* sp. PCC 6313
 2. *Chroococcus* sp. PCC 9106
 3. *Geitlerinema* sp. DE2011
 4. *Scenedesmus* sp. DE2009.
 5. Captación Intracelular de plomo
 6. Dosis desde la cual se detecta captación de plomo
- *. Sensibilidad de la técnica.

En esta tabla se observa que la captación intracelular del plomo para el consorcio (Sp+Ch) es de 1 mM y 0.75 mM respectivamente, mientras que para el consorcio (Ge+Sc) es de 0.1 mM en ambos casos.

Es interesante resaltar que en el caso del plomo y para el consorcio Ge+Sc, se produce una captación activa antes que pasiva demostrada por los resultados comparativos obtenidos mediante el SEM-EDX y el TEM-EDX respectivamente.

Los resultados demuestran que todos los microorganismos de los dos consorcios evaluados son capaces de captar plomo, en sus inclusiones intracitoplasmáticas (inclusiones de polifosfato). Además se ha podido demostrar mediante los espectros de EDX, que estas inclusiones son de polifosfato (PP) ya que contienen P y Ca. La afinidad por los metales que presentan estas inclusiones es conocida y ha sido demostrada en otros microorganismos por diferentes autores (Jensen & Sicko, 1974; Surosz & Palinska, 2004; Burnat et al., 2010; Maldonado et al., 2010b, Pereira et al., 2011; y **en esta tesis**).

Considerando todos los resultados expuestos se puede concluir que especialmente el consorcio (Ge+Sc) podría ser considerado para bioreparar ambientes contaminados, tanto por plomo como por cobre, de manera más eficiente que el consorcio (Sp+Ch), ya que los microorganismos que lo forman son de fácil cultivo, autóctonos en los tapetes microbianos del delta del Ebro y con capacidad para captar metales.

De los resultados obtenidos mediante la aplicación de las tres metodologías: CLSM, SEM-EDX y TEM-EDX y considerando los resultados de

manera global, se podría afirmar que los consorcios tienen un importante potencial bioreparador de ambientes contaminados por metales, ya que además los microorganismos que los forman no se inhiben entre ellos, sino que potencian su capacidad de captación, y por lo tanto es muy interesante considerar el papel, que estos probablemente realizan en su propio ambiente natural, donde las asociaciones entre microorganismos son habituales.

Por otra parte, cabe considerar, que los microorganismos que presentan una baja T-R a los metales podrían ser además buenos bioindicadores de contaminación, ya que presentan alteraciones del espectro de la MFI a dosis muy bajas de metal.

Estas conclusiones de manera más detallada se exponen a continuación en el capítulo de Conclusiones.

5. Conclusiones.

Conclusiones obtenidas a partir de la optimización metodológica.

En esta sección y de acuerdo a los objetivos de la presente tesis, se extraen las conclusiones más importantes obtenidas a partir de los resultados. En primer lugar se remarcan las conclusiones resultantes de la optimización de los métodos y en segundo lugar las de los resultados presentados como artículos.

Uno de los aspectos también importante del trabajo experimental presentado, ha sido determinar la sensibilidad de los métodos de microscopía utilizados, y optimizar las técnicas tanto para determinar la tolerancia resistencia de los consorcios a los metales como para analizar su capacidad para captarlos.

Las conclusiones que se derivan de esta optimización son las siguientes:

1. Para ensayar la T-R de los consorcios a los metales se ha determinado previamente la sensibilidad del CLSM- λ Scan. Para ello se ha utilizado un amplio margen de concentraciones tanto de cobre como de plomo que se han ensayado sobre los microorganismos seleccionados. La sensibilidad de la técnica es de 1nM, lo que significa que el CLSM- λ Scan es un método muy eficaz para detectar alteraciones a nivel de los espectros de la MFI debidas a la presencia de los metales en una muestra, incluso cuando la contaminación por metales es a dosis muy bajas. Además las muestras se analizan *in vivo* y a nivel celular.

2. Análogos experimentos se han realizado para la captación de metales por los consorcios. En este caso, los resultados indican que la sensibilidad del SEM-EDX es de 10 nM y que por tanto el SEM-EDX es un buen método para evaluar la captación extracelular de los metales (captación pasiva).

3. Con respecto al TEM-EDX, también se ha evaluado la sensibilidad de la técnica que es de 0.1 mM. Aunque esta técnica es menos sensible que la de los casos anteriores, sigue siendo una metodología muy útil para determinar la captación intracelular de metales (transporte activo) por parte de los microorganismos, ya que las dosis encontradas en ambientes contaminados son superiores a las ensayadas en el presente trabajo.

4. Por primera vez se optimizó una metodología que permita evaluar la fluorescencia emitida por cada uno de los microorganismos que forman los consorcios en cultivos contaminados por metales, sin ningún tipo de solapamiento entre ellos.

Conclusiones obtenidas a partir de los resultados presentados como artículos

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido determinar la capacidad bioreparadora de los consorcios: (Sp+Ch) y de (Ge+Sc) frente a los metales cobre y plomo. Las conclusiones que se han obtenido utilizando cada una de las metodologías aplicadas se detallan a continuación:

5. Aplicando el método CLSM- λ Scan se ha determinado que el consorcio (Ge+Sc) es más resistente al cobre (100 nM) que el consorcio (Sp+Ch) (1 nM) y que por lo tanto éste último es muy sensible al metal.

Con respecto al plomo, también el primer consorcio es más resistente (0.75 mM; 0.1 mM) que el segundo (0.1mM; 0.1 mM).

En general, puede además concluirse que ambos consorcios son más resistentes al plomo que al cobre, pero que el consorcio (Ge+Sc) tiene además una mayor T-R a ambos metales. Esto último tiene especial relevancia ya que los microorganismos que componen este consorcio son autóctonos.

6. Con respecto a la captación extracelular de cobre y plomo, por parte de ambos consorcios, se ha podido demostrar mediante el SEM-EDX, que ambos consorcios son eficientes en la captación de ambos metales, que retienen en las envueltas celulares de los microorganismos que están formadas por sustancias poliméricas extracelulares.

La captación externa del cobre se detecta a partir de 10 nM en ambos microorganismos del consorcio (Sp+Ch), mientras que en el consorcio (Ge+Sc)

lo hace a partir de 5 μM y 0.3 μM cada uno de sus microorganismos respectivamente.

7. Mediante el TEM acoplado al EDX se ha determinado la captación intracelular del plomo, que es para el consorcio (Sp+Ch): 1 y 0.75 mM respectivamente, mientras que para el consorcio (Ge+Sc) es de 0.1 mM en ambos casos. Los resultados demuestran que todos los microorganismos de los dos consorcios son capaces de captar plomo, en sus inclusiones intracitoplasmáticas (inclusiones de polifosfato). Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de los consorcios contaminados con cobre, no han sido considerados concluyentes, debido a la contaminación externa que provoca el mismo microscopio, enmascarando los resultados obtenidos.

8. Considerando todos los resultados expuestos se puede concluir que especialmente el consorcio (Ge+Sc) podría ser considerado para bioreparar ambientes contaminados, tanto por plomo como por cobre, de manera más eficiente que el consorcio (Sp+Ch), ya que los microorganismos que lo forman son de fácil cultivo, autóctonos en los tapetes microbianos del delta del Ebro y con capacidad para captar metales.

9. Por otra parte, cabe considerar, que los microorganismos que presentan una baja T-R a los metales podrían ser buenos bioindicadores de contaminación, ya que presentan alteraciones en el espectro de la MIF a dosis muy bajas de metal.

10. Finalmente, es muy importante resaltar, no solo el potencial bioreparador de los consorcios con respecto a los metales, sino que también se debería considerar el papel, que estos probablemente realizan en su propio ambiente natural, donde las asociaciones entre microorganismos son habituales.

6. Artículos publicados.

The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined in vivo and at cellular level by confocal laser microscopy

M. Seder-Colomina · A. Burgos · J. Maldonado ·
A. Solé · I. Esteve

Accepted: 29 October 2012 / Published online: 9 November 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract Microbial mats are coastal ecosystems that consist mainly of cyanobacteria, primary producers in these habitats that play an important role in stabilising delta sediments. However, these ecosystems are subject to various kinds of pollution, including metal contamination, placing their survival at risk. Among heavy metals, copper is an essential metal at low doses and toxic at high doses. This metal is present in different pesticides used in rice production, a thriving agro-industry in the Ebro Delta (Spain). For several years, our group has been studying the Ebro Delta microbial mats and has developed a method for determining the effect that metals cause on cyanobacteria populations. This method is based on confocal laser microscopy coupled to a spectrofluorometer, which rapidly provides simultaneous three-dimensional information on photosynthetic microorganisms and their fluorescence spectra profiles. The current study determines the copper effect on different photosynthetic microorganisms from culture collection (*Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313) and isolated from the environment (*Microcoleus*-like and the microalga DE2009). Comparing all results obtained it can be observed that the minimum dose of Cu that is capable of significantly altering chlorophyll *a* (chl *a*) fluorescence intensity were 1×10^{-7} M in *Chroococcus* sp. PCC 9106; 1×10^{-7} M in *Spirulina* sp.

PCC 6313; 3×10^{-7} M in *Microcoleus* and 5×10^{-6} M in the microalga DE2009. Moreover, the sensitivity of the technique used was 1×10^{-7} M.

Keywords CLSM · Copper · Cyanobacteria · Microalgae · Microbial mats

Introduction

The high quantity of metals that are released every day into the environment as a result of agricultural and industrial activity can be highly toxic in ecosystems and this affects living beings, sometimes irreversibly (Nogales et al. 2011). In recent years, cyanobacteria have been the object of research into metal biosorption and toxicity studies (Gong et al. 2005; Solisio et al. 2006; Babu et al. 2010).

Until now, different studies have focused on the changes in diversity and biomass, especially in microorganism populations, to determine the effect of metals. The application of molecular techniques, extraction and pigment quantification techniques (in the case of photosynthetic microorganisms) (Chakraborty et al. 2010; Kalinowska and Pawlik-Skowronska 2010), and the use of the minimum inhibitory concentration (MIC) assays (Maldonado et al. 2010a) have been, among others, the most widely used methodologies. However, most of these methods require long protocols, which means that the information obtained does not show a direct effect of metals at the cellular level (i.e. cytotoxicity). It is important to note that when perform a study of cyanobacteria and algae, which is the main objective of this paper, the application of some of these techniques is even more problematic, as many of these microorganisms, especially the filamentous, grow irregularly on a Petri dish or do not grow on a solid medium.

M. Seder-Colomina · A. Burgos · J. Maldonado · A. Solé ·
I. Esteve (✉)
Departament de Genètica i Microbiologia, Facultat de
Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193
Cerdanyola del Vallès (Bellaterra), Barcelona, Spain
e-mail: isabel.esteve@uab.cat

A. Burgos
Departamento de Recursos hidrobiológicos,
Universidad de Nariño, Pasto (N), Colombia

The advantages of using a confocal laser scanning microscope (CLSM), coupled to a spectrofluorometric detector for the study of cyanobacteria were described by Roldán et al. (2004). Our study group has optimised this methodology to determine the effect of metals on different populations of photosynthetic microorganisms. The advantage of the technique is that it does not require any type of staining, as the CLSM captures the natural fluorescence emitted by the photosynthetic pigments of these microorganisms. When working with consortia of microorganisms in vivo, this technique allows the distinction to be made between autofluorescence of phototrophic microorganisms without making the heterotrophic bacteria visible (Burnat et al. 2010; Maldonado et al. 2010b, 2011).

The Ebro Delta (40°40'N, 0°40'E, Tarragona, Spain) is an ecosystem of major ecological and economic value, for the large expanses of land are used for rice crops. The Ebro Delta is a protected area, although both the river and the delta today are subjected to anthropogenic pollution, mainly as a consequence of industrial activities that result in waste being discharged into the river and onto the agricultural crops (rice and fruit), which in turn increases the level of pesticides in the Delta (Mañosa et al. 2001). In order to prevent the effect of algae in rice crops, widespread use is made of pesticides, which contains copper sulphate (Salam and El-Fadel 2008). Copper is an essential metal at low doses that acts as a cofactor for different enzymes, including plastocyanin (De la Cerda et al. 2008). Nevertheless, the doses used in pesticides can affect cyanobacteria, which are the most abundant microorganisms in the Ebro Delta microbial mats, and also the greatest primary producers of microbial mats, which occupy a large area of the Ebro Delta (Esteve et al. 1994; Guerrero et al. 2002).

The aim of this study is: (1). To determine the effect of the copper, in vivo and at the cellular level, on phototrophic microorganisms using CLSM coupled to a spectrofluorometric detector (CLSM- λ scan) and (2). To determine the minimum metal dose capable of significantly altering the fluorescence intensity of chlorophyll *a*, chl *a* (used as a marker).

To do this, we assayed the effect of copper in culture collection strains and in microorganisms that had been isolated from the natural environment. We also studied the sensitivity of the technique and its reliability at very low metal concentrations.

Materials and methods

Microorganisms and culture conditions

For this work four phototrophic microorganisms were selected: two cyanobacteria from Pasteur Culture

Collection (PCC) (Herdman et al. 2005), *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313, and two microorganisms isolated from Ebro Delta microbial mats, *Microcoleus*-like and the microalga DE2009.

Cyanobacteria from culture collection were grown in BG-11 and ASN III (1:1 v/v) medium, respectively (Rippka et al. 1979), while the photosynthetic microorganisms isolated from microbial mats were grown in Pfennig mineral medium (Pfennig and Trüper 1992). All microorganisms were maintained at 27 °C and under light conditions of 15 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Different concentrations of CuSO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) from 1×10^{-7} to 10×10^{-6} M Cu, were used in dose response experiments. All experiments were performed for 9 days using the media, light and temperature conditions mentioned above.

Confocal laser microscopy

Samples from the different polluted and unpolluted cultures were observed in vivo in standard microscopy glass slides. The analysis of pigments was carried out using the function of the CLSM- λ scan (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany). The information obtained with this technique shows the emission spectrum of the pigments according to the region of the emitted wavelength and intensity of fluorescence emitted. Each image sequence was obtained by scanning the same *xy* optical section throughout the visible spectrum. Images were acquired at the *z* position at which the fluorescence was maximal, and acquisition settings were constant throughout the experiment (Maldonado et al. 2010b).

The sample excitation was carried out with an Argon Laser at 488 nm (λ_{exc} 488) with a 3 nm λ step size and an emission wavelength between 600 and 750 nm. In order to measure the mean fluorescence intensity (MFI) of the *xy* λ , CLSM data sets obtained by means of the Leica Confocal Software (Leica Microsystems CMS GmbH) were used. In these confocal images the pseudo-colour palette 4 was used, where warm colours represent the maximum intensities and cold colours represent the low intensities of fluorescence. The regions-of-interest (ROIs) function of the software was used to measure the spectral signature. For each sample, 70 ROIs of 1 μm^2 taken from cells were analyzed.

Statistical analysis

The statistical analyses used were One-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's and Tukey's comparisons post hoc tests. Differences were considered significant at $p < 0.05$ and/or $p < 0.01$. PASW Statistics software (v.18 for Windows XP) was used to perform the analyses.

The EC50 values were calculated by fitting the data obtained with a log normal sigmoidal curve, using a non-linear regression (GraphPad Prism, version 5 for Mac OS X).

Results and discussion

Two microorganisms selected from culture collection: *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313 were chosen since they are found in abundance in microbial mats.

Chroococcus sp. PCC 9106 is a unicellular marine cyanobacterium that reproduces by binary fission. Cells are coccoid and vary in size from 28 to 32 μm in diameter. Cells occur singly or in pairs and are surrounded by a thick sheath. *Spirulina* sp. PCC 6313 is a marine gliding

filamentous cyanobacterium that divides exclusively by binary fission and grows in the form of a helix. The cross walls are thin and invisible or nearly so with light microscopy and no sheath is visible. The width of the trichomes is 2 μm .

In the present study, and to calculate the minimum concentration affecting the pigment intensity, in the first experiment we assayed high metal doses from 1×10^{-6} to 10×10^{-6} M of Cu, and in the second used lower doses from 1×10^{-7} to 10×10^{-7} M.

The differences between the control and all the concentrations assayed in *Chroococcus* sp. PCC 9106 were statistically significant both for the first experiment ($F = 674.344$) ($p < 0.05$) and for the second ($F = 57.636$) ($p < 0.05$) (Fig. 1). Analogous results were obtained for *Spirulina* sp. PCC 6313, the differences between the

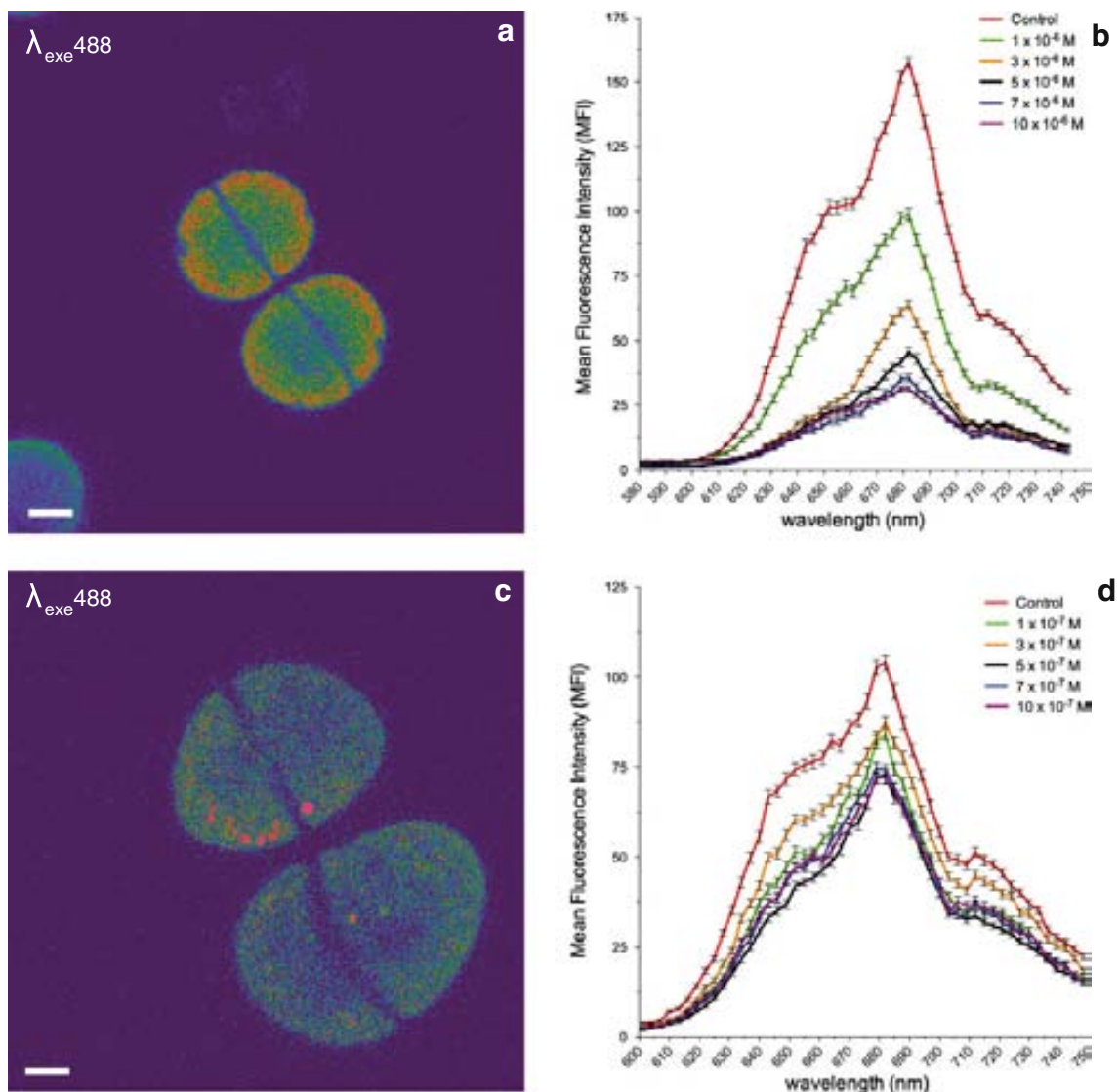


Fig. 1 Images of control cultures of *Chroococcus* sp. PCC 9106 obtained by CLSM (a, c). The scale bar represents 10 μm . Graphs of MFI obtained by means of λ_{scan} (b, d) (Color figure online)

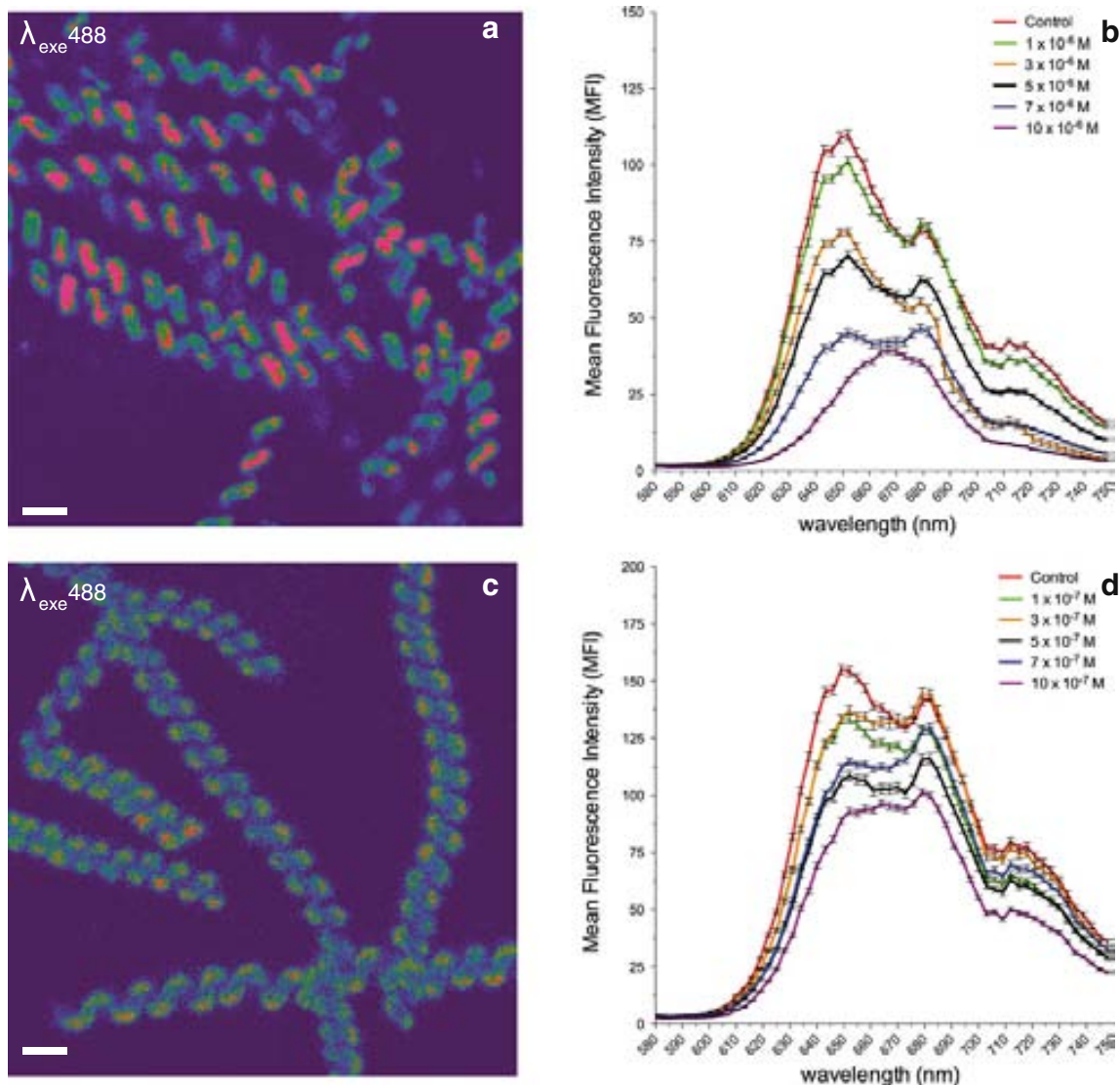


Fig. 2 Images of control cultures of *Spirulina* sp. PCC 6313 obtained by CLSM (a, c). The scale bar represents 10 μm. Graphs of MFI obtained by means of λ scan (b, d) (Color figure online)

control and all the concentrations assayed in were statistically significant both for the first experiment ($F = 614.865$) ($p < 0.05$) and for the second ($F = 177.658$) ($p < 0.05$) (Fig. 2).

These results demonstrate that low doses of the metal have a cytotoxic effect on both culture collection cyanobacteria. It must be considered that the lowest dose tested (1×10^{-7} M) is very close to the dose in the culture medium (BG11–ASNIII) used (3.16×10^{-7} M).

Moreover, it is important to highlight that even these doses of metal could become lower than those used in algacides ($0.3\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$ CuSO_4) (Salam and El-Fadel 2008).

Meanwhile, the graphs (Figs 1b, d, 2b, d) show how MFI for both microorganisms is inversely proportional to the concentration of the metal. It can also be seen that

Spirulina sp. PCC 6313 has a distorted fluorescence peak, probably due to the degradation of the photosynthetic pigments at the highest concentrations.

On the other hand, the EC50 values obtained were: 3.6×10^{-7} M for *Chroococcus* sp. PCC 9106 and 1.1×10^{-6} M for *Spirulina* sp. PCC 6313.

Analogous experiments to the above were performed with cultures of *Microcoleus*-like and the microalga DE2009 isolated from the Ebro Delta microbial mats.

Microcoleus-like is the dominant filamentous cyanobacterium in Ebro Delta microbial mats (Solé et al. 2009), and plays a very important role in the stabilisation of the deltaic sediments. This cyanobacterium, which also forms a consortium with other heterotrophic bacteria, was isolated by our study group and maintained in laboratory cultures (Diestra et al. 2005).

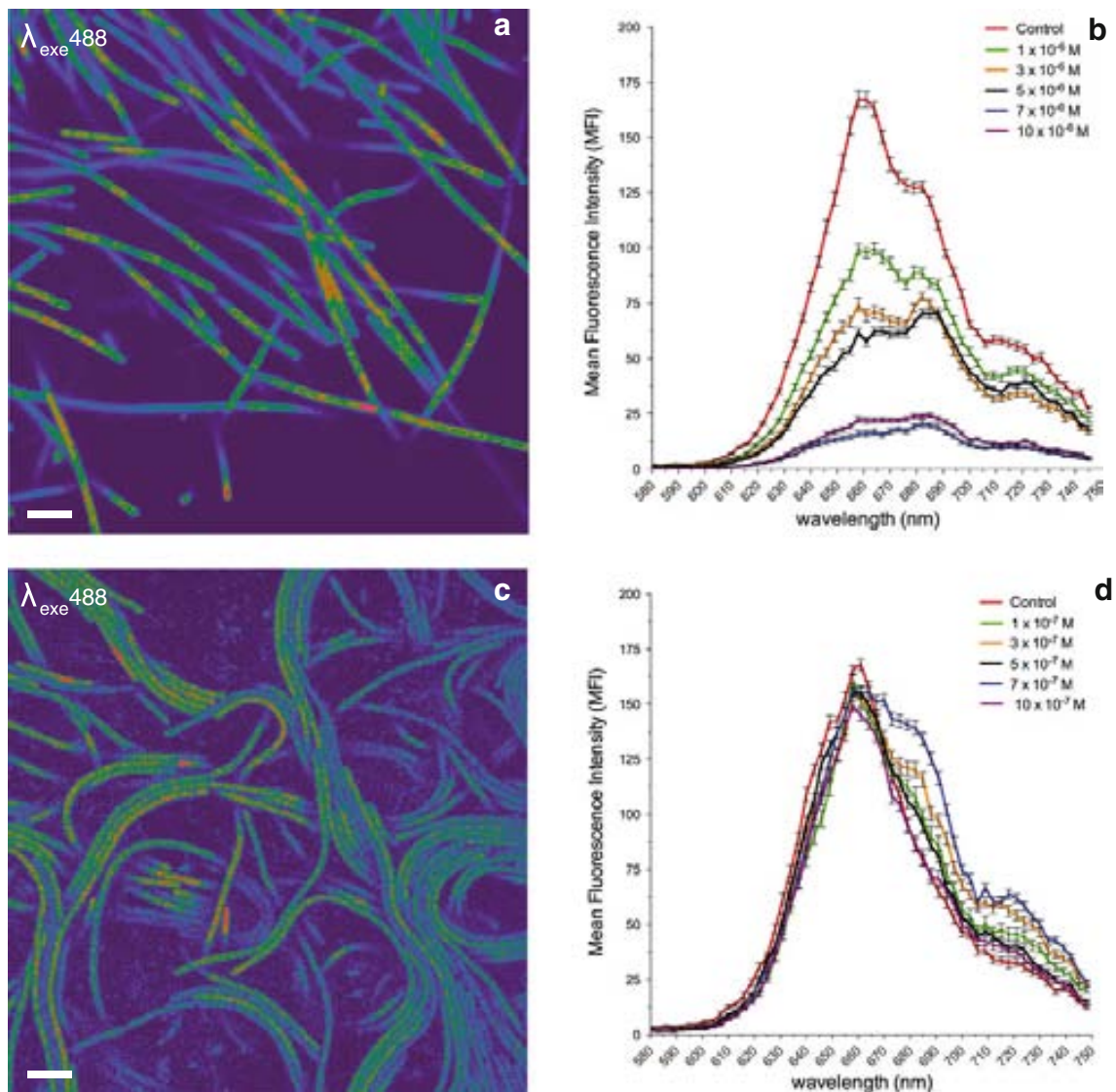


Fig. 3 Images of control cultures of *Microcoleus*-like obtained by CLSM (a, c). The scale bar represents 10 μm. Graphs of MFI obtained by means of λ scan (b, d) (Color figure online)

Filaments of this cyanobacterium are densely packed and surrounded by a homogeneous sheath that is sometimes coiled together in an irregularly screw-like form. Cells from filaments vary in size from 3.13 to 3.75 μm. The identification and characterization of the strain has been carried out according to Bergey's manual (Castenholz, 2001).

Control and contaminated cultures with different concentrations (from 1×10^{-7} to 10×10^{-6} M) of copper were analysed using the CLSM- λ scan. Figure 3a, c shows the autofluorescence detected in the control culture of *Microcoleus*-like. The graph in Fig. 3b, d, shows, like the previous experiments in culture collection cyanobacteria, how the MFI peak decreases in inverse proportion to the concentration of the assayed metal from the control culture to the maximum dose (10×10^{-6} M Cu). As in the

previous results, the differences were statistically significant both for the first experiment ($F = 896.166$) ($p < 0.05$) and for the second experiment ($F = 13.630$) ($p < 0.05$) (Fig. 3). The minimum dose of Cu capable of significantly altering the fluorescence intensity of chl *a* was 3×10^{-7} M. The EC₅₀ value obtained for *Microcoleus*-like was 1×10^{-6} M.

The microalga DE2009 was also isolated by our group from the Ebro Delta samples (Maldonado et al. 2010b). This is an eukaryote phototrophic microorganism, which like *Microcoleus*-like, forms a consortium with different heterotrophic bacteria. The microalga DE2009 cells are spherical, with a diameter of 7–9 μm and its chloroplasts are distributed laterally in the cell.

The autofluorescence detected in the control culture of the microalga DE2009 is shown in Fig. 4a. The graph of

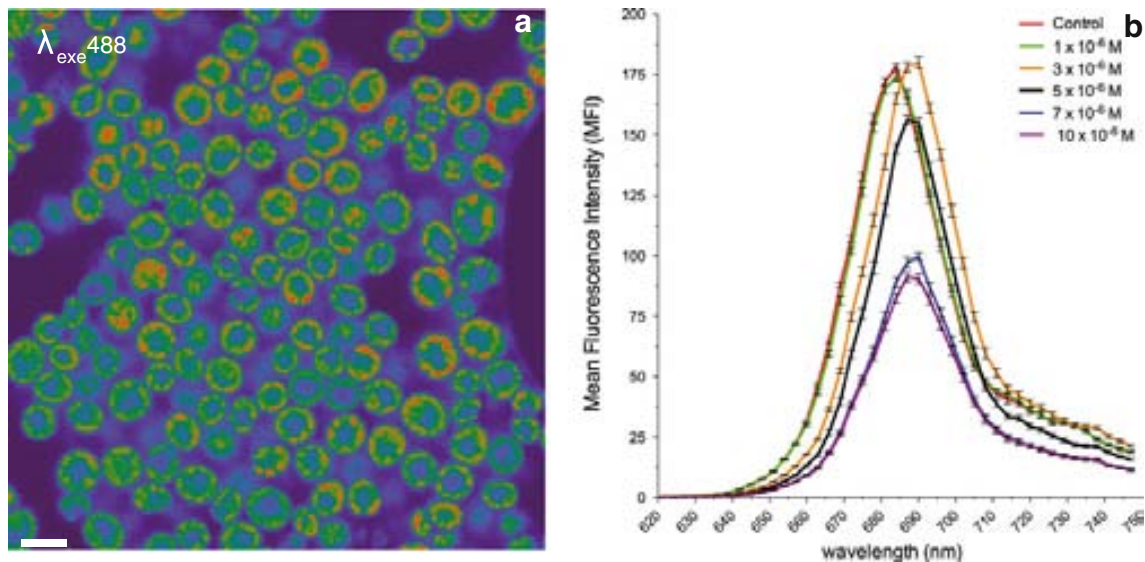


Fig. 4 Image of control cultures of the microalga DE2009 obtained by CLSM (a). The scale bar represents 10 μm . Graph of MFI obtained by means of λscan (b) (Color figure online)

the MFI obtained from the different cultures (Fig. 4b) is similar to that for *Microcoleus*-like but in this case the minimum dose of Cu capable of significantly altering the fluorescence intensity of chl *a* was 5×10^{-6} M of Cu. The EC50 value obtained for the microalga DE2009 was 5.47×10^{-6} M.

Comparing all the results obtained it can be seen that the minimum dose of Cu capable of significantly altering the fluorescence intensity of chl *a* was: 1×10^{-7} M in *Chroococcus* sp. PCC 9106; 1×10^{-7} M in *Spirulina* sp. PCC 6313; 3×10^{-7} M in *Microcoleus* and 5×10^{-6} M in microalga DE2009, by which could be interpreted that microalga DE2009 is more tolerant-resistant than *Microcoleus* which in turn is more tolerant-resistant than *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313.

Comparing these results with those obtained by assaying the effect of lead on *Microcoleus*-like by Burnat et al. (2010); and the microalga DE2009 (Maldonado et al. 2010b) using the same methodology, we concluded that copper has a cytotoxic effect at smaller doses than lead, probably because copper is necessary in cellular homeostasis (De la Cerda et al. 2008).

Finally, through the above-mentioned experiments, we have determined the sensitivity of the technique, which is 1×10^{-7} M for copper.

Conclusions

Using the CLSM- λscan methodology, which is applied in vivo, we conclude that: copper has a very toxic effect at low doses for *Chroococcus* sp. PCC 9106, *Spirulina* sp.

PCC 6313 and *Microcoleus*-like. The microalga DE2009 was the most tolerant-resistant to copper among the phototrophic microorganisms assayed.

Acknowledgments This research was supported by the following grant: DGICYT (CGL2008-01891/BOS). We express our thanks to the staff of the *Servei de Microscòpia* and the *Servei de Llentües* both at the *Universitat Autònoma de Barcelona*, Marc Alamany from *Ecologia Portuària S. L.* and Cristina Sosa for their help in this work.

References

- Babu NG, Sarma PA, Attitalla IH, Murthy SDS (2010) Effect of selected heavy metal ions on the photosynthetic electron transport and energy transfer in the thylakoid membrane of the cyanobacterium. *Spirulina platensis* Acad J Plant Sci 3:46–49
- Burnat M, Diestra E, Esteve I, Solé A (2010) Confocal laser scanning microscopy coupled to a spectrofluorometric detector as a rapid tool for determining the in vivo effect of metals on phototrophic bacteria. *Bull Environ Contam Toxicol* 84:55–60
- Castenholz RW (2001) Phylum BX Cyanobacteria Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (eds) *Bergey's manual systematic bacteriology. The Archaea and deeply branching and phototrophic bacteria*, vol 1. Springer, New York, pp 473–599
- Chakraborty P, Raghunadh Babu PV, Acharyya T, Bandyopadhyay D (2010) Stress and toxicity of biologically important transition metals (Co, Ni, Cu and Zn) on phytoplankton in a tropical freshwater system: an investigation with pigment analysis by HPLC. *Chemosphere* 80:548–553
- De la Cerda B, Castielli O, Durán RV, Navarro JA, Hervás M, De la Rosa MA (2008) A proteomic approach to iron and copper homeostasis in cyanobacteria. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6:322–329
- Diestra E, Solé A, Martí M, García de Oteyza T, Grimalt JO, Esteve I (2005) Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning

- electron microscopy and transmission electron microscopy. *Scanning* 27:176–180
- Esteve I, Ceballos D, Martínez-Alonso M, Gaju N, Guerrero R (1994) Development of versicolored microbial mats: succession of microbial communities. Microbial mats: structure, development and environmental significance. In: Stal LJ, Caumette P (eds) NATO ASI Series G: Ecological Sciences. Springer, Heidelberg, pp 4165–4420
- Gong R, Ding Y, Liu H, Chen Q, Liu Z (2005) Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. *Chemosphere* 58:125–130
- Guerrero R, Piqueras M, Berlanga M (2002) Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int Microbiol* 5:177–188
- Herdman M, Itean I, Rippka R (2005) Catalogue of cyanobacterial strains, 2nd edn. Institut Pasteur, Paris
- Kalinowska R, Pawlik-Skowronska B (2010) Response of two terrestrial green microalgae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress. *Environ Poll* 158:2778–2785
- Maldonado J, Diestra E, Huang L, Domènech AM, Villagrasa E, Puyen ZM, Duran R, Esteve I, Solé A (2010a) Isolation and identification of a bacterium with high tolerance to lead and copper from a marine microbial mat in Spain. *Ann Microbiol* 60:113–120
- Maldonado J, de los Rios A, Esteve I, Ascaso C, Puyen ZM, Brambilla C, Solé A (2010b) Sequestration and in vivo effect of lead on DE2009 microalga, using high-resolution microscopic techniques. *J Hazard Mater* 183:44–50
- Maldonado J, Solé A, Puyen ZM, Esteve I (2011) Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquat Toxicol* 104:135–144
- Mañosa S, Mateo R, Guitart R (2001) A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environ Monit Assess* 71:187–205
- Nogales B, Lanfranconi MP, Piña-Villalonga JM, Bosch R (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* 35:275–298
- Ochoa-Herrera V, León G, Banihani Q, Field JA, Sierra-Alvarez R (2011) Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Sci Total Environ* 412–413:380–385
- Pfennig N, Trüper HG (1992) The family of Chromatiaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (eds) *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 3200–3221
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111:1–61
- Roldán M, Thomas F, Castel S, Quesada A, Hernández-Mariné M (2004) Non-invasive pigment identification in single cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl Environ Microbiol* 70:3745–3750
- Salam D, El-Fadel M (2008) Mobility and availability of copper in agricultural soils irrigated from water treated with copper sulphate algicide. *Water Air Soil Pollut* 195:3–13
- Solé A, Diestra E, Esteve I (2009) Confocal laser scanning microscopy image analysis for cyanobacterial biomass determined at microscale level in different microbial mats. *Microb Ecol* 57:649–656
- Solisio C, Lodi A, Torre P, Converti A, Del Borghi M (2006) Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. *Bioresour Technol* 97:1756–1760

Scanning Electron Microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray detector to study copper removal on different phototrophic microorganisms

Álvaro Burgos^{1,2}, Marina Seder-Colomina¹, Juan Maldonado¹, Antonio Solé¹ and Isabel Esteve^{*,1}

¹ Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Campus de la UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Spain.

² Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Universidad de Nariño, Pasto (N), Colombia.

Ebro Delta microbial mats are coastal ecosystems that consist mainly of phototrophic microorganisms, that play an important role in stabilizing delta sediments. However, these ecosystems are subjected to various kinds of pollution, including copper metal contamination. This metal is present in pesticides used against microalgae, which cause significant losses in rice production.

The current study determines the capacity of different cyanobacteria and a microalga, to sequester copper by means of Scanning Electron Microscopy (SEM) coupled to an Energy Dispersive X-ray detector (EDX). For that, unpolluted and polluted cultures of these microorganisms were analysed by this technique. The results obtained demonstrated that all the microorganisms tested are able to remove copper accumulating this metal extracellularly in extrapolymeric substances (EPS). SEM-EDX application in natural habitats open up broad prospects for future studies of metal ecotoxicity.

Keywords SEM-EDX; microbial mats; phototrophic microorganisms; copper

1. Introduction

Microbial mats are benthic stratified ecosystems, widely distributed around the globe in different environments, such as marine waters [1-4], fresh waters [5], hypersaline ponds [6], estuaries [7], hot deserts [8], hot springs [9], soils [10], antarctic ice ponds [11] and hydrothermal vents in deep oceans [12].

The Ebro Delta is the third largest delta in the Mediterranean with a 320 km² triangular surface and it is located at the northeastern coastline of the Iberian Peninsula (0°35'E–0°56'E; 40°33'N–40°47'N). Different ecosystems such as: microbial mats, marshes, salt ponds, dunes and sandy beaches provide habitat for a large number flora and fauna species that form part of the Ebro Delta.

In the last years our research team has studied the Ebro Delta microbial mats (Fig. 1a). These ecosystems, developed in water-sediment interfaces, are formed by multilayered benthic microbial communities that are distributed along vertical micro-gradients of different physical-chemical parameters (Fig. 1b). Microorganisms such as cyanobacteria, algae, colorless sulfur bacteria, purple sulfur bacteria and sulfate reducing bacteria, among others, are living in these mats. Cyanobacteria are the most abundant phototrophic microorganisms and they are located mainly in the upper green layer of microbial mats playing a very important role in the stabilization of the sediments.

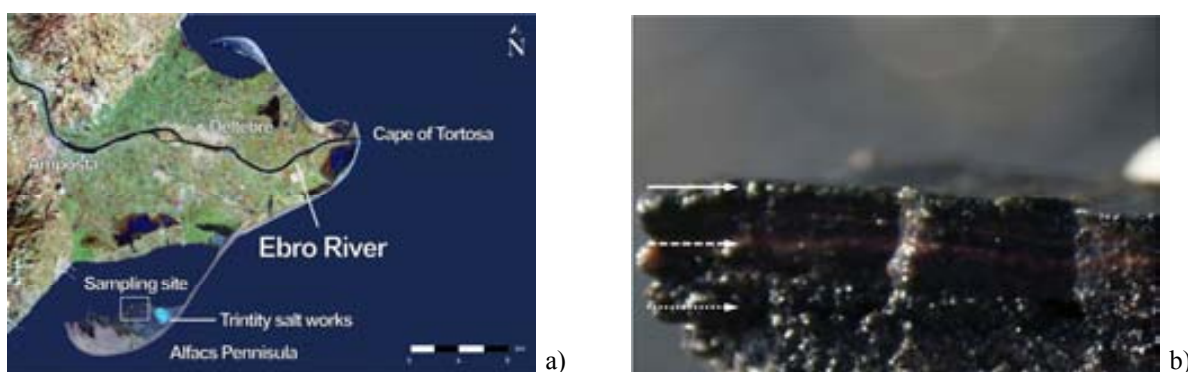


Fig. 1 Ebro Delta microbial mats location a). Microbial mat structure. Phototrophic microorganisms, green layer (—); purple sulfur bacteria, red layer (----) and sulfate reducing bacteria, black layer (·····) b).

Deltas are nowadays subjected to anthropogenic pollution, mainly as a consequence of industrial activities that discharge their waste into the river and the agriculture crops (rice and fruits), which increase the amount of pesticides in deltas. All this circumstances causes serious environmental effects attributable to the accumulation of the contaminants in sediments, water, soil and biota. The predominant pollutants in these habitats are: herbicides, insecticides, hydrocarbons and heavy metals [13].

The Ebro Delta is an ecosystem of major ecological and economic value, for the large expanses of land are used for rice crops. In order to prevent the effect of algae, widespread use is made of pesticides, which contains copper sulfate [14]. Nevertheless, the doses used in pesticides can affect cyanobacteria, which are the greatest primary producers of microbial mats and occupy a large area of the aforesaid Delta. Copper (Cu) is an essential metal for cyanobacteria because forms part of the plastocyanin and a c-type cytochrome oxidase (necessary proteins for the photosynthesis) but at high concentrations cause serious toxic effects [15,16].

Faced with this problem, our group of work have studied how heavy metals affect the cyanobacteria and microalgae by means of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). On the other hand, many studies have been carried out to demonstrate the capacity of these microorganisms to sequester metals using electron microscopic techniques [17-20].

Among these methodologies SEM-EDX was selected to analyze morphological differences among cyanobacteria and microalgae growing in unpolluted and polluted cultures, and to demonstrate the presence of copper in the EPS in the same cultures. The advantages of using this methodology is that it allows a qualitative and semi-quantitative analysis of the sample, through determining the chemical constituents of this sample and their respective ratios by comparing the spectra obtained from the assayed microorganisms.

Bearing in mind the problems that copper contamination present in these ecosystems, the aim of this work is to determine the capacity of different phototrophic microorganisms to sequester Cu by means of SEM-EDX, and the role of these microorganisms in the copper bioremediation of the Ebro Delta microbial mats.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms and culture conditions

For this research, four phototrophic microorganisms were chosen: two cyanobacteria from the Pasteur Culture Collection (PCC) [21], *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313, and two microorganisms isolated from Ebro Delta microbial mats, *Microcoleus* sp. DE2006 and the microalga DE2009 [22, 18]. The collection strains were grown in BG-11 / ASN III (1:1 v/v) medium [23], while the isolated microorganisms were grown in Pfennig mineral medium [24]. All microorganisms were maintained at 27 °C and under light conditions ($15 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Different concentrations of CuSO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were used in the contamination experiments: 3 nM, 5 nM, 7 nM, 10 nM, 3 μM , 5 μM , 7 μM and 2 mM. All the studies were performed for 9 days in the above-mentioned culture conditions.

2.2 Scanning electron microscopy coupled to Energy dispersive X-Ray microanalysis.

For SEM-EDX analysis, samples were uniformly distributed and filtered in Nucleopore™ polycarbonate membrane filters (Whatman, Ltd.). Afterwards, the samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde Millonig's buffer [25] (0.1M and pH4) for 2 h and washed four times in the same buffer. Then, they were dehydrated in increasing gradient concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90 and 100%) and dried by critical point (CPD 030 Critical Point Drier, BAL-TEC GmbH D - 58579 Schalksmühle). Samples were mounted on aluminum metal stubs using an electrically-conductive double-sided adhesive tape and then coated with a 5 μm gold layer (K550 Sputter Coater, Emitech, Ashford, UK). Finally, samples were viewed in a Zeiss EVO® MA 10 (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany) scanning electron microscope. An energy dispersive X-ray spectrophotometer (EDX) Link Isis-200 (Oxford Instruments, Bucks, England) operated at 20 kV coupled to the microscope was used for the elemental analysis of the samples.

3. Results and Discussion

In this section are listed and discussed the results obtained about the capacity to sequester copper of different cyanobacteria: *Chroococcus* sp. PCC 9106 and *Spirulina* sp. PCC 6313 from culture collection and *Microcoleus* sp. DE2006 and the microalga DE2009 isolated from Ebro Delta microbial mats.

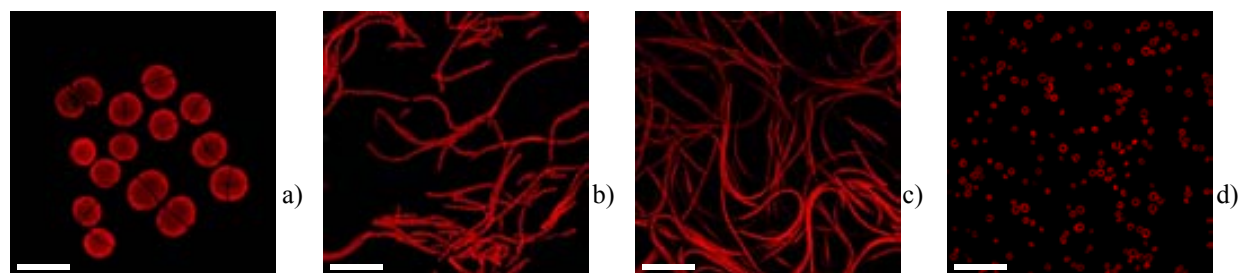


Fig. 2 Confocal images of *Chroococcus* sp. PCC 9106 a), *Spirulina* sp. PCC 6313 b), *Microcoleus* sp. DE2006 c) and microalga DE2009 d). Scale bar represents 50 μm .

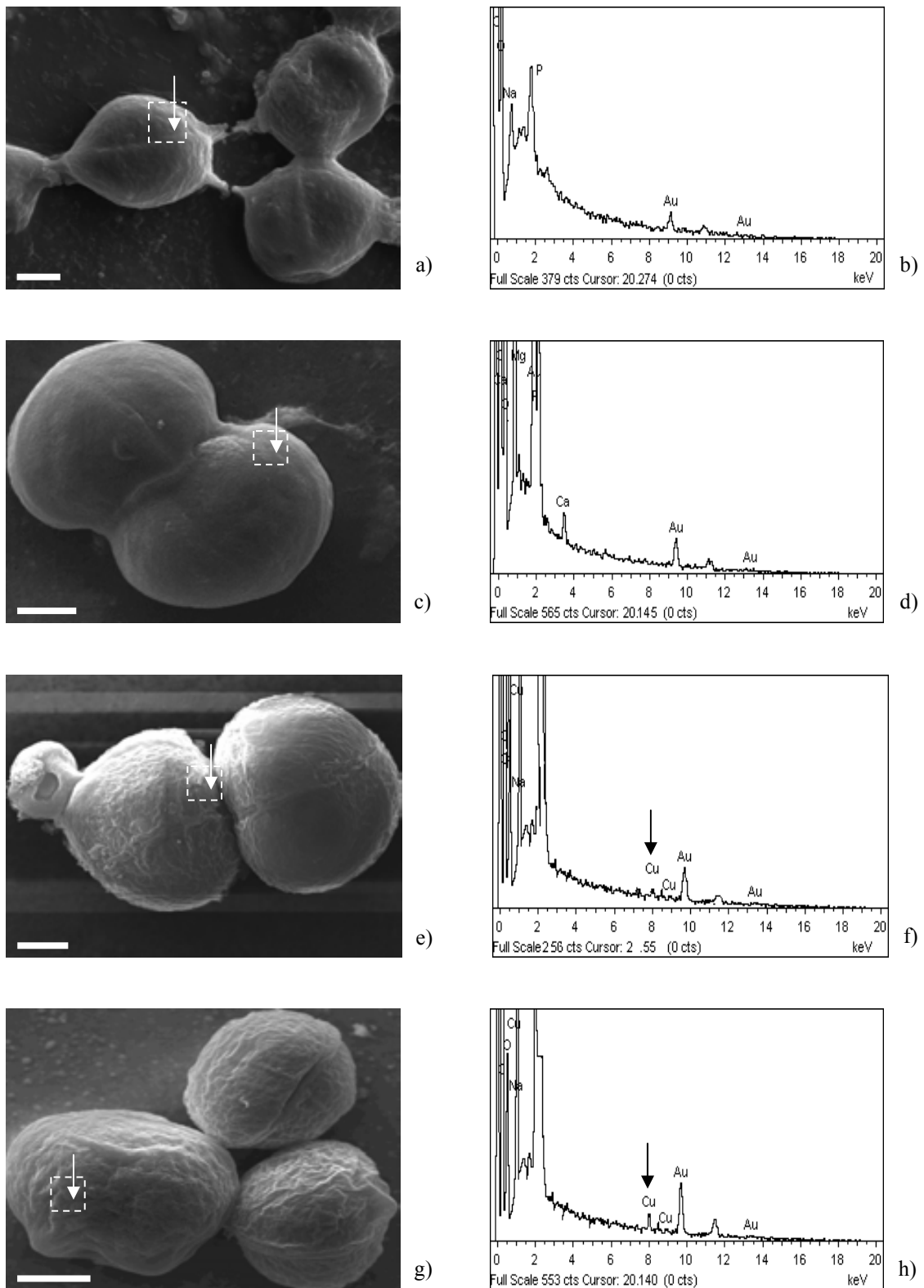


Fig. 3 SEM images of *Chroococcus* sp. PCC 9106. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (3, 5 and 7 nM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peaks are indicated by arrows. Bars represent 5 μ m.

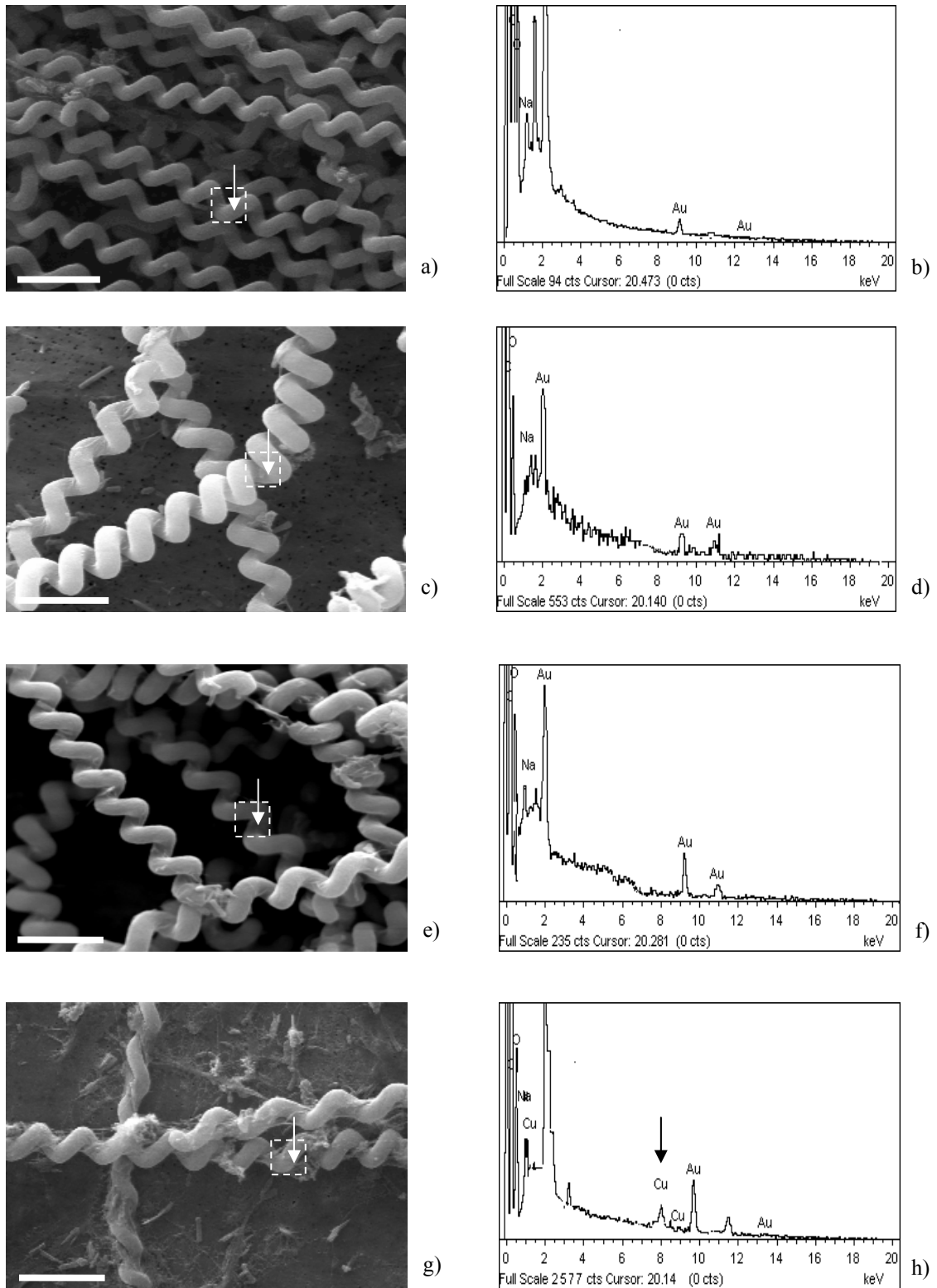


Fig. 4 SEM images of *Spirulina* sp. PCC 6313. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (7 and 10 nM; and 2 mM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peak is indicated by arrow. Bars represent 5 μ m.

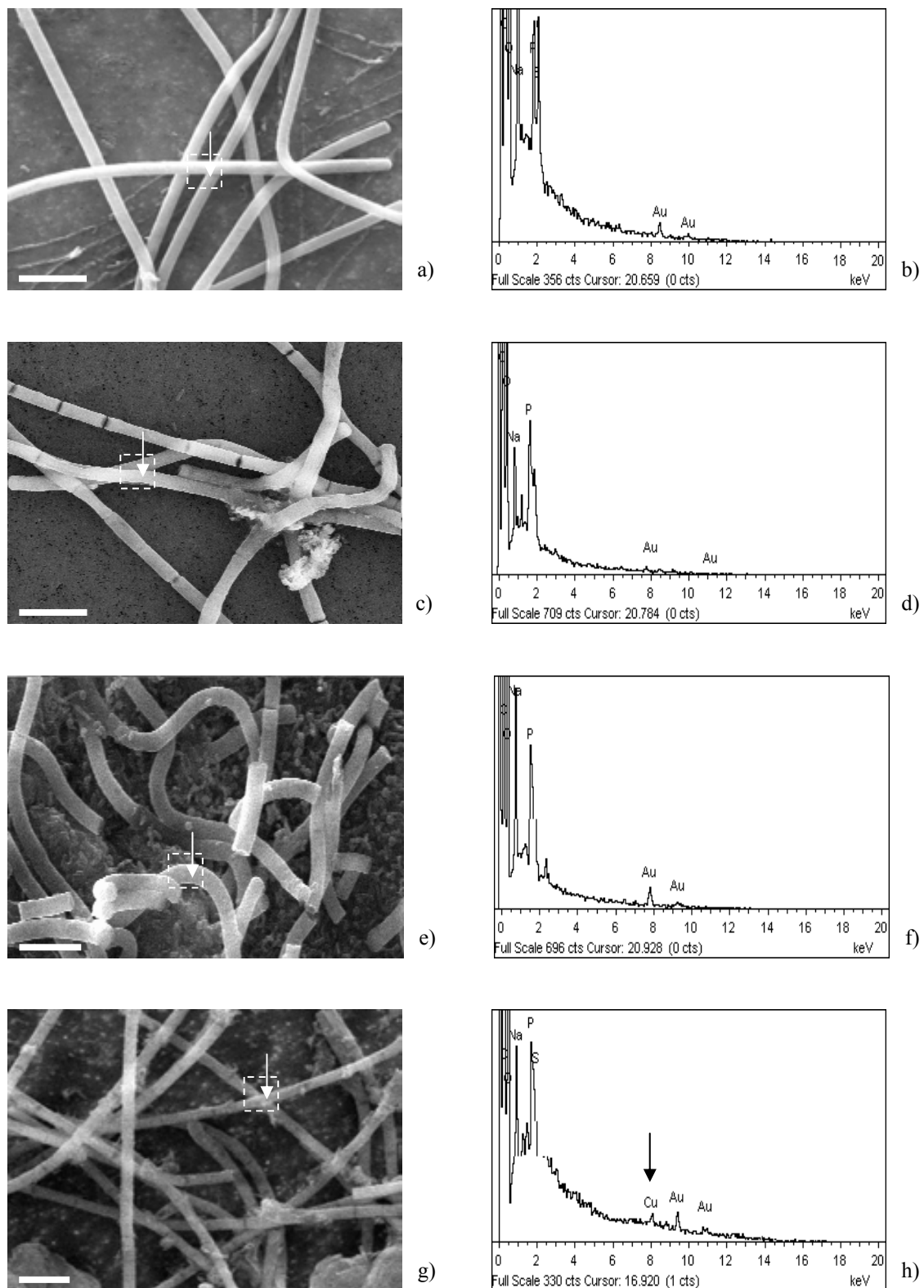


Fig. 5 SEM images of *Microcoleus* sp. DE2006. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (3, 7, and 10 nM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peak is indicated by arrow. Bars represent 10 μ m.

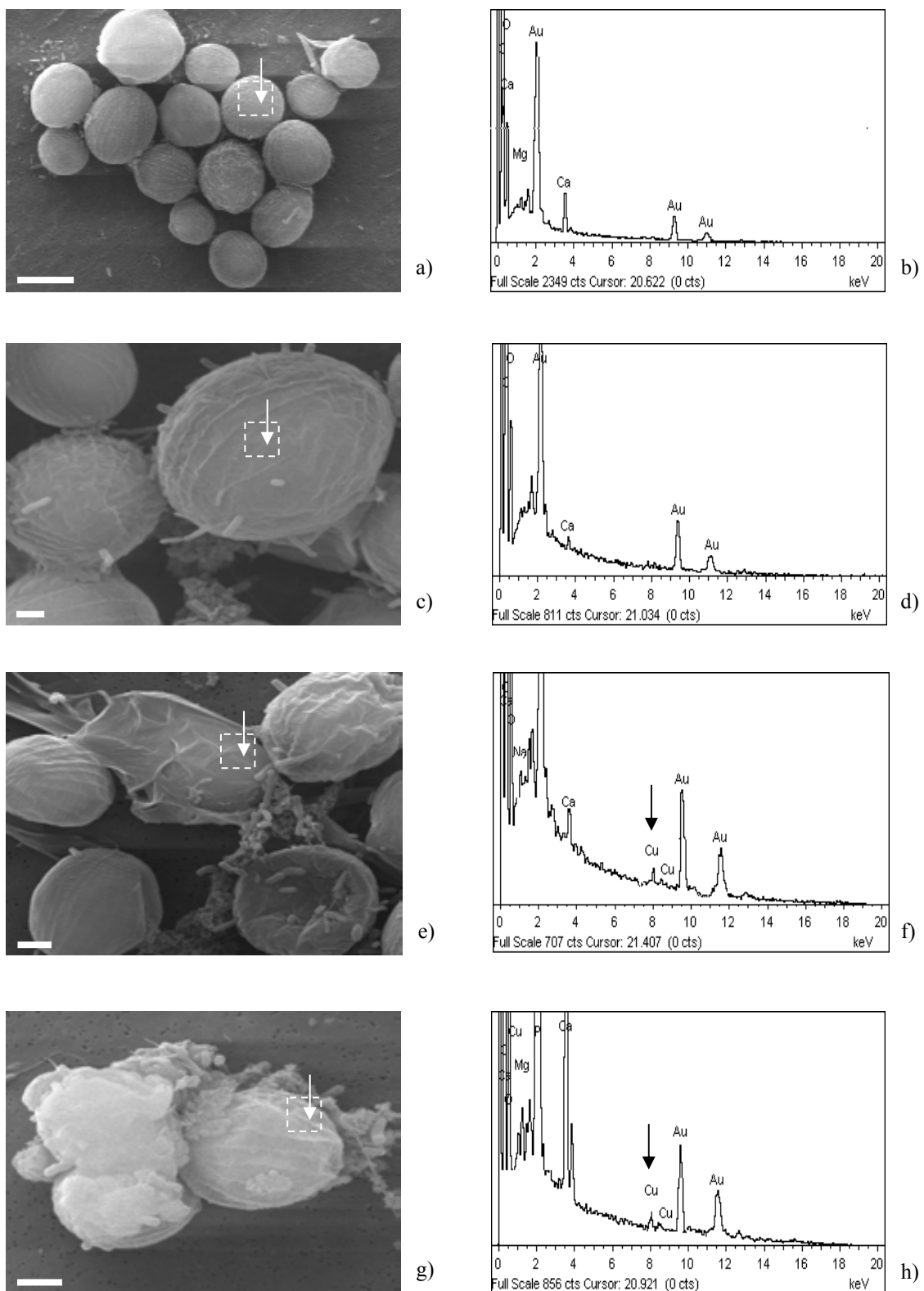


Fig. 6 SEM images of the microalga DE2009. Unpolluted and polluted cultures at different Cu concentrations (3, 5 and 7 μM) are indicated in figures: a), c), e) and g). Its respective EDX spectra are represented in figures: b), d), f) and h). Cu peaks are indicated by arrows. Bar represents 10 μm in figure a) and 2 μm in figures c), e) and g).

Chroococcus sp. PCC 9106 is an unicellular marine cyanobacterium that reproduces by binary fission. Cells are coccoid and vary in size from 28 to 32 μm in diameter. Cells occur singly or in pairs and are surrounded by a thick sheath (Fig. 2a).

Spirulina sp. PCC 6313 is a marine gliding filamentous cyanobacterium that divides exclusively by binary fission and grows in the form of an helix. The cross walls are thin and invisible or nearly so with light microscopy. The width of the trichomes is 2 μm (Fig. 2b).

Microcoleus sp. DE2006 is the dominant filamentous cyanobacterium in Ebro Delta microbial mats [26], and plays a very important role in the stabilisation of the deltaic sediments. This cyanobacterium, which also forms a consortium with other heterotrophic bacteria, was isolated by our study group and maintained in laboratory cultures [22]. Filaments of this cyanobacterium are densely packed and surrounded by an homogeneous sheath that is sometimes coiled together in an irregularly screw-like form. Cells from filaments vary in size from 3.13 to 3.75 μm (Fig. 2c). The identification and characterization of the strain has been carried out according to Bergey's manual [27].

The microalga DE2009 was also isolated by our group from the Ebro Delta samples [18]. This is an eukaryote phototrophic microorganism, that like *Microcoleus* sp. DE2006, forms a consortium with different heterotrophic bacteria. The microalga DE2009 cells are spherical, with a diameter of 7-9 μm and its chloroplasts are distributed laterally in the cell (Fig. 2d).

All microorganisms studied present EPS cellular envelopes. With respect to the functions of the EPS, various authors have suggested protection against dehydration and UV radiation, biomineralization, phagocytosis and adhesion capacity to sequester metals [28, 29]. In the present study, we essayed different metal doses from 3 nM to 2 mM of Cu on all the microorganisms tested.

Figure 3 details the results obtained from the *Chroococcus* sp. PCC 9106 experiments, showing the corresponding images of this microorganism at different tested concentrations and its EDX spectra. The graphs demonstrate the ability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 to extracellularly capture copper in EPS envelopes. In this case, a peak corresponding to this metal (Fig. 3f) is detected from 5 nM of Cu. In contrast, *Spirulina* sp. PCC 6313, though also able to sequester copper, did not yield a positive result until 2 mM of Cu (Fig. 4h).

As regards microorganisms from the natural environment (*Microcoleus* sp. DE2006 and the microalga DE2009), both sequestered copper in the EPS, the first from a concentration of 10 nM (Fig. 5h) and the second from 5 μM (Fig. 6f).

Comparison of the obtained results demonstrates that all tested microorganisms are capable of extracellularly sequestering copper. However, the fact that *Spirulina* sp. PCC 6313 has a much thinner envelope than the other microorganisms might explain why higher doses of the metal are required to obtain a positive result. From these results, we think, that the sensitivity of the technique is very good since it can detect metal uptake at very low doses (5 nM of Cu). Moreover, it is also important to highlight that the doses of metal used in this work could be lower than those used in pesticides to inhibit the growth of algae in rice fields. Additionally, the results obtained by Seder-Colomina et al., (sent to *Ecotoxicology*) demonstrate that the limits between the copper dose having cytotoxic effect and that having an essential effect are very close in cyanobacteria.

4. Conclusion

From the results obtained in this paper, it can be concluded that phototrophic microorganisms play a very important role in the bioreparation of sediments polluted by copper, due to their ability to bioaccumulate this metal in the EPS. We have also been led to conclude that SEM-EDX is an effective tool for this type of study.

Finally, we believe that the use of pesticides containing copper salts in agricultural areas close to microbial mats should be reviewed, due to the toxicity of copper, which mainly affects the cyanobacteria responsible for the stability of these ecosystems.

Acknowledgments This research was supported by the following grant: DGICYT (CGL2008-01891/BOS). We express our thanks to the staff of the *Servei de Microscòpia* and the *Servei de llengües* both at the *Universitat Autònoma de Barcelona*; Marc Alamany from *Ecologia Portuària S. L.* and Cristina Sosa for their help in this work.

References

- [1] Esteve I, Martínez-Alonso M, Mir J. Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain. Preliminary studies. *Limnetica*. 1992;8:185-195.
- [2] Guerrero R, Piqueras M, Berlanga M. Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *International Microbiology*. 2002;5:177-188.
- [3] Wieland A, Kuhl M, McGowan L, Fourçans A, Duran R, Caumette P, Garcia de Oteyza T, Grimalt JO, Solé A, Diestra E, Esteve I, and Herbert RA. Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. *Microbial Ecology*. 2003;46:371-390.
- [4] Fourçans A, Garcia de Oteyza T, Wieland A, Solé A, Diestra E, van Bleijswijk J, Grimalt JO, Kuhl M, Esteve I, Muyzer G, Caumette P and Duran R. Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue, France). *FEMS Microbiology Ecology*. 2004;51:55-70.
- [5] Brunberg AK, Nilsson E, Blomqvist P. Characteristics of oligotrophic hardwater lakes in a postglacial land-rise area in mid Sweden. *Freshwater Biology*. 2002;47:1451-1462.
- [6] Hoehler TM, Bebout BM, Des Marais DJ. *Nature*. 2001;412:324-327.
- [7] Olendzenski LC. Growth, fine structure and cyst formation of a microbial mat ciliate: *Pseudocohnilembus pusillus* (Ciliophora, Scuticociliatida). *The Journal of Eukariotic Microbiology*. 1999;46:132-141.
- [8] Campbell SE. Soil stabilization by a prokaryotic desert crust: implications for Precambrian land biota. *Origins of Life*. 1979;9:335-348.
- [9] Nakagawa T, Fukui, M. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2002;48:211-222.
- [10] Watanabe Y, Martini JEJ, Ohmoto H. Geochemical evidence for terrestrial ecosystems 2.6 billion years ago. *Nature*, 2000;408:574-578.
- [11] Jungblut AD, Neilan BA. NifH-gene diversity and expression in a microbial mat community on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Antarctic Science*, 2010;22:117-122.
- [12] Kato S, Kobayashi C, Kakegawa T, Yamagishi A. Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology*. 2009;11:2094-2111.
- [13] Mañosa S, Mateo R, Guitart R. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2001;71:187-205.
- [14] Salam D, El-Fadel M. Mobility and availability of copper in agricultural soils irrigated from water treated with copper sulfate algacide. *Water, Air & Soil Pollution*. 2008;195:3-13.
- [15] De la Cerda B, Castielli O, Durán RV, Navarro JA, Hervás M, De la Rosa MA. A proteomic approach to iron and copper homeostasis in cyanobacteria. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*. 2008;6:322-329
- [16] Surosz W, Palinska KA. Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2004;48:40-48.
- [17] Burnat M, Diestra E, Esteve I, Solé A. Confocal laser scanning microscopy coupled to a spectrofluorometric detector as a rapid tool for determining the *in vivo* effect of metals on phototrophic bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010;84:55-60.
- [18] Maldonado J, de los Rios A, Esteve I, Ascaso C, Puyen ZM, Brambilla C, Solé A. Sequestration and *in vivo* effect of lead on DE2009 microalga, using high-resolution microscopic techniques. *Journal of Hazardous Materials*. 2010;83:44-50.
- [19] Maldonado J, Solé A, Puyen ZM, Esteve I. Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquatic Toxicology*. 2011;104:135-144.
- [20] Esteve I, Maldonado J, Diestra E, Burnat M, Solé A. Confocal laser scanning and electron microscopic techniques as powerful tools for determining the *in vivo* effect and sequestration capacity of lead in cyanobacteria. In: A. da Silva Ferrão Filho, ed. *Cyanobacteria: Toxicity, Ecology and Management*. 2012 *In press*.
- [21] Herdman M, Iteman I, Rippka R. *Catalogue of Cyanobacterial strains*. 2nd ed. Paris, Institut Pasteur; 2005.
- [22] Diestra E, Solé A, Martí M, García de Oteyza T, Grimalt JO, Esteve I Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Scanning*. 2005;27:176-180.
- [23] Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 1979;111:1-61.
- [24] Pfennig N, Trüper HG. The family of Chromatiaceae. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH eds. *The prokaryotes*, 2nd edn. Berlin: Springer-Verlag; 1992:3200-3221.
- [25] Millonig GJ. Advantages of phosphate buffer OsO₄ solutions in fixation. *Journal of Applied Physics*. 1961;32:1637.
- [26] Solé A., Diestra E. and Esteve I. (2009) Confocal laser scanning microscopy image analysis for cyanobacterial biomass determined at microscale level in different microbial mats. *Microbial Ecology*. 2009;57:649-656.
- [27] Castenholz RW. Phylum BX Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, eds. *Bergey's Manual Systematic Bacteriology, vol. 1, The Archea and deeply branching and phototrophic bacteria*. New York: Springer-Verlag; 2001:473-599.
- [28] Decho AW. Exopolymers in microbial mats: assessing their adaptative roles. In: Stal LJ, Caumette P eds. *Microbial Mats. Structure, development and environment significance*. Berlin: Springer-Verlag, 1994:215-219.
- [29] Pereira S, Micheletti E, Zille A, Santos A, Moradas-Ferreira P, Tamagnini P, De Philippis R. Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: Do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiology*. 2011;157:451-458.

Anexo I: Artículo enviado para su aceptación.**Effect of copper and lead on two consortia of phototrophic microorganisms and their capacity to sequester heavy metals.****A. Burgos^{1,2}, J. Maldonado¹, A. De los Rios,³ A. Solé¹, I. Esteve* .**

1. Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Campus de UAB, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193, Barcelona, Spain.
2. Departamento de Recursos Hidrobiológicos, Universidad de Nariño, Pasto (N), Colombia.
3. Instituto de Recursos Naturales, Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), Serrano 115 dpto, 28006 Madrid, Spain

ABSTRACT

Synergistic associations of phototrophic microorganisms have been investigated in this paper to determine the potential role of the consortia to tolerate or resist heavy metals and to capture them from polluted cultures. With this purpose, two consortia of microorganisms: on one hand, *Geitlerinema* sp. DE2011 (Ge) and *Scenedesmus* sp. DE2009 (Sc) (both identified, in this paper, by molecular biology methods) isolated from Ebro Delta microbial mats, and on the other: *Spirulina* sp. PCC 6313 (Sp) and *Chroococcus* sp. PCC 9106 (Ch), from Pasteur culture collection were polluted with copper and lead. In order to analyze the ability of these consortia to tolerate and capture metals, copper and lead were selected, because both have been detected in Ebro Delta microbial mats.

The tolerance-resistance to copper and lead for both consortia was determined *in vivo* and at cellular level by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM- λ scan function). The results obtained demonstrate that both consortia are highly tolerant-resistant to lead and that the limits between the copper dose having cytotoxic effect and that having an essential effect are very close in these microorganisms.

The capacity of both consortia to capture extra and intracellularly copper and lead was determined by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) respectively, coupled to an Energy Dispersive X-ray detector (EDX). The results showed that all the microorganisms assayed were able to capture copper extracellularly in the extrapolymeric substances and lead extra and intracellularly in polyphosphate inclusions. Moreover, no inhibitory effect between them was observed in their metal affinity capacity.

From the results obtained in this paper, it can be concluded, that consortia of phototrophic microorganisms could play a very important role to biorepair sediments polluted by heavy metals, due to their ability to tolerate or resist high concentrations of metals and to bioaccumulate them, extra and intracellularly.

Introduction

Microbial consortia exist at different levels of communities and metabolic complexity, as shown in microbial mats, biofilms, and planktonic and benthonic autotrophic-heterotrophic assemblages. In aquatic ecosystems, the balance between autotrophy and heterotrophy reflect microbial production and biogeochemical cycling dynamics. These associations may serve a mutualistic function by ensuring optimal growth of partners living in adverse conditions. Synergistic or syntrophic lifestyles (consortia of microorganisms) are more efficiently than on the individual population level (Paerl and Pinckney, 1996).

Cyanobacteria and algae (usually forming consortia with heterotrophic bacteria) are the most important primary producers in marine coastal environments, mainly in microbial mats, stratified laminated ecosystems (Cohen and Rosemberg, 1989; Nakagawa and Fukui, 2002; Wieland et al., 2003; Fourçans et al., 2004).

The Ebro Delta (40° 40' N, 0° 40' E, Tarragona, Spain) is an ecosystem of major ecological and economic value, for the large expanses of land are used for rice crops. It is a protected area, although both the River and the Delta today are subjected to anthropogenic pollution, mainly as a consequence of industrial and agricultural activities, which in turn increases the level of pesticides in the Delta (Guerrero et al., 1993; Esteve et al., 1993 Mañosa et al., 2001).

Phototrophic microorganisms (cyanobacteria and algae) have been frequently found as object of research into metal biosorption because metals are one group of contaminants frequently involved in marine environmental pollution. The majority of the studies have analyzed the toxic effect of heavy

metals in cyanobacteria from culture collections (De Philippis et al., 2003; Heng et al., 2004; Gong et al., 2005; Solisio et al., 2006; Shing et al., 2012).

In the last years, our group of work has isolated two consortia of microorganisms, from Ebro Delta microbial mats. The first one, dominated by a single cyanobacterium, *Microcoleus* sp. DE2006 (Diestra et al., 2005) was able to degrade crude oil and tolerate heavy metals (Garcia et al., 2004; Sánchez et al., 2005). The second one, dominated by an alga DE2009 was also able to tolerate and sequester lead (Maldonado et al., 2010). Different high-resolution microscopic techniques were optimized to determine the tolerance–resistance of different phototrophic microorganisms and its capacity to sequester heavy metals in: cultures, microcosms and natural habitats (Burnat et al., 2009; Burnat et al., 2010; Maldonado et al., 2011; Burgos et al., 2012).

Although it is frequent that both the cyanobacteria and algae form consortia with heterotrophic microorganisms in microbial mats, very little is known about the associations between them, their role in the capture of metals and their potential to biorepair contaminated environments.

Therefore, this paper analyze the possible potential of consortia to tolerate and capture copper and lead. These metals were selected, because both were found in Ebro River. For this purpose, mixed cultures of the cyanobacterium DE2011 and the microalga DE2009, on one hand, and the *Spirulina* sp. PCC 6313 and *Chroococcus* sp. PCC 9106, from Pasteur culture collection, on the other, were contaminated with copper and lead respectively, and analyzed their ability to tolerate and biocapture metals.

CLSM-*Ascan* function was applied to determine the tolerance-resistance of these consortia to copper and lead, both *in vivo* and at cellular level. Moreover, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), both coupled to an Energy Dispersive X-ray detector (EDX), were used to test the capacity of these associations for extra and intracellular caption of both metals.

In this paper, we propose: first to identify the new cyanobacterium and the microalga DE2009, which were not identified in previous studies, by molecular biology methods. Secondly, we will analyze the potential of the consortia to tolerate and sequestrate metals.

Material and methods

Microorganisms and culture conditions

For this work 4 phototrophic microorganisms were selected: two cyanobacteria, from Pasteur Culture Collection: *Spirulina* sp. PCC 6313 and *Chroococcus* sp. PCC 9106 and two microorganisms, isolated from the Ebro Delta microbial mats: cyanobacterium DE2011 and the microalga DE2009. Cyanobacteria from culture collection were grown in BG-11 and ASN III (1:1 v/v) medium (Rippka et al., 1979), while the cyanobacterium DE2011 and microalga DE2009 were grown in Pfennig mineral medium (Pfennig and Trüpper, 1992). All microorganisms were maintained at 27°C and under light conditions (15 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Unpolluted (control experiment) and polluted cultures with different concentrations of copper (CuSO_4): 0.1, 0.3, 1, 5 and 7 μM , in mixed cultures of the cyanobacterium DE2011 and the microalga DE2009; and 1, 3, 5, 7 and 10 nM in mixed cultures of *Spirulina* sp. PCC 6313 and *Chroococcus* sp. PCC 9106 were used.

On the other hand, different concentrations of lead [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$]: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 0.75 mM, in mixed cultures of cyanobacterium DE2011 and the microalga DE2009 and 0.1, 0.5, 0.75, 1 and 2 mM, in mixed cultures of *Spirulina* sp. PCC 6313 and *Chroococcus* sp. PCC 9106 were used in dose response experiments. All experiments were performed for 9 days using the media, light and temperature conditions mentioned above.

Confocal Laser Scanning Microscopy

Samples from different polluted and unpolluted cultures were observed *in vivo* on standard microscopy glass slides. The analysis of pigments was carried out using the function of the CLSM-*Ascan* (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany). The information obtained with this technique shows the emission spectrum of the pigments according to the region of the emitted wavelength and intensity of fluorescence emitted. Each image sequence was obtained by scanning the same *xy* optical section throughout the visible spectrum. Images were acquired at the *z* position at which the fluorescence was maximal, and acquisition settings were constant throughout the experiment (Maldonado et al., 2010).

The sample excitation was carried out with an Argon Laser at 488 nm (λ_{exe} 488) with a 3 nm λ step size and an emission wavelength between 600 and 750 nm. In order to measure the mean fluorescence intensity (MFI) of the *xyλ*, CLSM data sets obtained by means of the Leica Confocal Software (Leica Microsystems CMS GmbH) were used. In these confocal images the pseudo-colour palette 4 was used, where warm colours represent the maximum intensities and cold colours represent the low intensities of fluorescence.

The regions-of-interest (ROIs) function of the software was used to measure the spectral signature. For each sample, 70 ROIs of 1 μm^2 taken from cells were analysed.

Scanning Electron Microscopy

To determine whether, *Chroococcus* sp. PCC 9106; *Spirulina* sp. PCC 6313; cyanobacterium DE2011 and microalga DE2009 were able to capture Cu or Pb extracellularly, cultures were polluted and incubated under the same conditions mentioned above. For SEM analysis, the following procedure was used: cultures were fixed in 2.5 % glutaraldehyde Millonig's buffer phosphate (0.1 M pH 4) for 2 h and washed four times in the same buffer. They were then dehydrated in a graded series (30, 50, 70, 90, 100 %) of ethanol and dried by critical-point drying. The samples were mounted on metal stubs and coated with gold. Samples were viewed in a Jeol JSM-6300 scanning electron microscope (Jeol LTD, Tokyo, Japan). For X-ray analysis, cultures were filtered on polycarbonate membrane filters. These filters were then dehydrated and dried

by the same procedure used for culture samples. An EDX Link Isis-200 (Oxford Instruments, Bucks, England) operated at 20 kV coupled to SEM was used.

Transmission Electron Microscopy

In order to assess whether *Chroococcus* sp. PCC 9106; *Spirulina* sp. PCC 6313; cyanobacterium DE2011 and microalga DE2009 were able to capture Cu and/or Pb intracellularly, cultures polluted with different concentrations (mentioned above) were incubated under the same conditions as previous experiments. For TEM analysis, the following procedure was used: cultures were fixed in 2.5 % glutaraldehyde Millonig buffer phosphate (0.1 M pH 4) for 2 h and washed four times in the same buffer. Samples were post-fixed in 1 % OsO₄ at 4°C for 2 h, and washed four times in the same buffer. They were then dehydrated in a graded series (30, 50, 70, 90, and 100 %) of acetone and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections of 70 nm were mounted on carbon coated copper grids. Samples were viewed in a Hitachi H-7000 electron microscope (Hitachi LTD, Tokyo, Japan). Sections of 200 nm thick were mounted on copper grids for energy dispersive X-ray microanalysis. Samples were analyzed with a Jeol Jem-2011 (Jeol LTD, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

The statistical analyses used were One-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's and Tukey's comparisons post hoc tests. Differences

were considered significant at $p < 0.05$. SPSS Statistics software (version.15 for Windows) was used to perform the analyses.

Molecular biology studies

The cyanobacterium DE2011 and the microalga DE2009 were identified by molecular biology methods.

DNA extraction, PCR amplification of cyanobacterial rRNA genes and sequencing.

Total genomic DNA was extracted according to Cubero et al. (1999), from the cyanobacterium DE2011 culture for subsequent PCR amplification of 16S rRNA and a section of the internal transcribed spacer between the 16S and 23S rRNA genes. These cyanobacterial genes were amplified using the cyanobacterial-specific primer pair CYA359r (Nübel et al., 1997) and 373R (Janse et al., 2003). Each 25 μ l volume of PCR mix [75 mM Tris pH 9.0/50 mM KCl/20 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ contained 1 unit of Taq polymerase, 0.2 mM of each of the four dNTPs, 0.4 μ M of each primer, 100 μ g of bovine serum albumin, 1.5 mM of MgCl_2 , 5 μ l de 5xTaq Master PCR enhancer (Prime) and ca 10-50 ng genomic DNA]. Annealing conditions were 60°C. Products were purified using the UltraClean PCR Clean-Up kit (MoBio Laboratories INC.). Both DNA directions (5'-3'/3'-5') were sequenced, with the same primer pairs used in the amplification step, by Macrogen INC. Laboratories (South Korea). BLAST

search was conducted in order to find the closest relatives to the cyanobacteria consortia culture in the databanks.

DNA extraction, PCR amplification of algal genes, sequencing and phylogenetic analysis

We used three genetic markers in our study: partial sequences of the 18S ribosomal DNA, 23S ribosomal DNA and Rubisco genes. Total genomic DNA was extracted according to Cubero et al. (1999), from the microalga DE2009 culture and different cultures obtained from the Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA), Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Centre of Phycology. The cultures were CCALA 214 (*Apatococcus lobatus*), CCALA 309 (*Coelastrella multistriata*), CCALA 906 (*Stichococcus bacillaris*).

The 18S rRNA, 23S rRNA and Rubisco gene fragments were obtained by PCR amplification using the following primers pairs, SR1 and SR12 (Nakayama et al. 1996) for 18S rRNA gene, RH1 (Manhart, 1994) and rbc590 (Hayden et al., 2002) for Rubisco and p23SrV_f1 and p23SrV_r1 (Presting, 2006) for 23S rRNA, using PureTq™ Ready-to go™ PCR (GE Healthcare). The PCR annealing conditions were successively 56°C, 45°C and 55°C. Products were purified using the UltraClean PCR Clean-Up kit (MoBio Laboratories INC.). Both DNA directions (5'-3'/3'-5') were sequenced, with the same primer pairs used in the amplification step, by Macrogen INC. Laboratories (South Korea).

Sequences obtained in this study as well as related sequences retrieved from GenBank (Table 1), were aligned using Clustal X (Thompson et al., 1997)

and G-blocks (Castresana, 2000). The three single gene data sets were assembled: 18S rRNA (1114 nts), 23S rRNA (376 nts) and Rubisco (527 nts). The obtained DNA sequence alignments were phylogenetically analysed using MrBayes version 3 software (<http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes>). We partitioned the dataset into three parts corresponding to the different markers. Optimal substitution models were inferred for each marker using jModeltest v.2.3 (Posada, 2008). Two hundred thousand generations were run, every 100th tree was sampled, and the first 5000 generations were discarded as burn-in. A consensus phylogram showing mean branch lengths was calculated using the `sumt` command in MrBayes. We used *Chlorella variabilis*, *Apatococcus lobatus* (CCALA 214) and *Stichococcus bacillaris* (CCALA 906) as outgroups for the phylogenetic tree. Sequences were submitted to Genbank.

Results and Discussion

Cyanobacterium DE2011 and microalga DE2009 identification

Cyanobacterial DNA (coding for 16S rRNA and transcribed spacer between the 16S and 23S rRNA genes) from culture was amplified to yield PCR products of approximately 1710 bp. Closest GenBank relative (100% similarity) was uncultured unidentified cyanobacterium clone isolated from a *Microcoleus* consortium found in Ebro Delta (FN794262; Giloteaux et al., 2011). The microorganism identified with highest 16R rRNA sequence similarity was *Geitlerinema* PCC 7105 (99% similarity).

Multigenic analysis shows that the microalga DE2009 isolate sequence is integrate in a well-supported clade with sequences of *Spharopleales* order. This

clade is constituted by two well-supported sister groups. The alga consortia culture sequence forms a supported group with *Coelastrella multistriata* (CCALA 309) and *Scenedesmus* sp. 1 within one of the sister groups constituted by different species of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* genera and *Coelastrella multistriata*.

Due to the microalga DE2009 using a multigenic phylogenetic approach clustered mainly with sequences of *Scenedesmus* genera and morphological and ultrastructural analysis, we tentatively assigned this isolate to *Scenedesmus* genera (Maldonado et al., 2010). The isolate sequence resulted also closely related to *Coelastrella multistriata*. However, due to until we know the systematic of *Coelastrella* genera is still not totally solved and other representative of the genera is integrated in the other *Spharopleales* sister group, we have preferred propose the affiliation to *Scenedesmus* genera (Fig. 1).

Morphological characteristics of the microorganisms studied

The two microorganisms selected from cultures collection were *Spirulina* sp. PCC 6313 and *Chroococcus* sp. PCC 9106. Both were chosen since they were found in abundance in Ebro Delta microbial mats. *Spirulina* sp. PCC 6313 is a marine gliding filamentous cyanobacterium that divides exclusively by binary fission and grows in the form of a helix. The cross walls are thin and invisible or nearly so with light microscopy and no sheath is visible. The width of the trichomes is 2 μm . *Chroococcus* sp. PCC 9106 is a unicellular marine cyanobacterium that reproduces by binary fission. Cells are coccoid and vary in

size from 28 to 32 μm in diameter. Cells occur singly or in pairs and are surrounded by a thick sheath.

The microorganisms, isolated from Ebro Delta microbial mats, were now identified as *Geitlerinema* sp. DE2011 and *Scenedesmus* sp. DE2009. Filaments of *Geitlerinema* sp. DE2011 are densely packed and surrounded by a homogeneous sheath that sometimes coil together in an irregularly screw-like form. Cells from filaments vary in size from 3.13 to 3.75 μm . On the other hand, *Scenedesmus* sp. DE2009 is a eukaryote phototrophic microorganism. Individual cells are spherical, with a diameter of 7–9 μm and its chloroplasts are distributed laterally in the cell. Each microorganism was identified according to morphological criteria outline to Castenholz et al. (2001).

Tolerance-resistance of different phototrophic microorganisms to copper and lead determined by means CLSM- λ scan function

Different concentrations of copper and lead, indicated in Material and methods, were assayed on *Geitlerinema* sp. DE2011 (Ge) and *Scenedesmus* sp. DE2009 (Sc) mixed-cultures (Ge+Sc) consortia and *Spirulina* sp. PCC 6313 (Sp) and *Chroococcus* sp. PCC 9106 (Ch) mixed-cultures (Sp+Ch) consortia. The aim was to study the tolerance-resistance of these consortia to copper and lead by CLSM- λ scan function.

Effect of copper on Ge+Sc

The CLSM- λ scan function allows us to evaluate the physiological state of the Ge and Sc in the consortia at single-cell level, considering changes in chl a

(maximum absorption at 660 and 689 nm respectively). Figs. 2a and 2c show an xyz optical section corresponding to the autofluorescence detected in control cultures.

The copper effect on Ge and Sc varied significantly according to the metal concentration used. The differences were statistically significant ($F = 406.413$ for the first one and $F = 54.287$ for the second) ($p < 0.05$) between the control experiment and the other metal concentrations tested. Further statistically significant differences were observed between control and $0.1 \mu\text{M}$ not only in Ge but also in Sc cultures. On the other hand at higher concentrations, $7 \mu\text{M}$, the chl a peak was more altered in Ge cells, (showing a decrease on the MFI), than in Sc cells (Figs. 2b and 2d).

These results demonstrated that the tolerance-resistance of this consortia was $0.1 \mu\text{M}$ for both phototrophic microorganisms evaluated *in vivo* and at cellular level.

Effect of copper on Sp+Ch

Similar experiments were made testing different concentrations of copper on the consortia formed by Sp+Ch. The copper effect on Sp and Ch, also varied significantly according to the metal concentration used, but the differences were statistically significant ($F = 914.459$ and $F = 479.005$ respectively) ($p < 0.05$) between the control experiment and 1 nM for both microorganisms (Figs. 3a, 3b, 3c, and 3d). These results agree with those obtained by Seder-Colomina et al. (2013) and demonstrated that, the limits between the copper dose that has

cytotoxic effect and the one that has an essential effect were very closed in cyanobacteria.

At higher concentrations: 5, 7, and 10 nM, the chl *a* peak was drastically reduced (maximum absorption at 652 and 661 nm in both microorganisms).

Moreover, it is important to highlight that the fluorescence peak decrease while the Cu concentration increases from control to 7 μ M on Ge and Sc, and from control to 10 nM on Sp and Ch respectively.

These results indicated that the consortia Ge+Sc is more tolerant-resistant to copper than the consortia Sp+Ch.

Effect of lead on Ge+Sc.

Different concentrations of lead on Ge+Sc consortia were used to study the tolerance-resistance of both phototrophic microorganisms to this metal by CLSM- λ scan function. Figs. 4a and 4c show a xyz optical section corresponding to the autofluorescence detected in control cultures (maximum absorption at 659 and 686 nm respectively).

The lead effect on Ge+Sc varied significantly according to the metal concentration used as in copper experiments. Statistically significant differences ($F = 396.3879$ to first one) ($p < 0.05$) were observed between control and 0.75 mM for Ge (Fig. 4b) and 0.1 mM for Sc cells (Fig. 4d). In this case, the fluorescence emission was increased from 0.1 mM Pb in Sc cells. $F = 382.6910$ ($p < 0.05$).

Effect of lead on Sp+Ch.

Analogous experiments were made testing different concentrations of lead on the consortia formed by Sp+Ch. The lead effect on Sp and Ch also varied significantly according to the metal concentration used. The differences were statistically significant ($F = 592.2731$ to first one and $F = 409.001$ for the second) ($p < 0.05$) between the control experiment and 0.1 mM for both microorganisms (Figs. 5a, 5b, 5c, and 5d). The autofluorescence detected in control cultures (maximum absorption at 659 and 666 nm respectively).

At highest concentration of lead (2 mM), the chl *a* peak of Sp was decreased showing a pigment degradation. On the other hand, an increase in the fluorescence emission was observed from 0.1 mM in Ch cells.

These results showed that both consortia are highly tolerant-resistant to lead.

Heavy metal accumulation in Ge+Sc and Sp+Ch consortia

With the aim of proving whether the Ge+Sc and Sp+Ch consortia could capture metals, cells from cultures with and without metals (copper and lead respectively) were analysed to determine their capacity to sequester metals external (SEM-EDX) and internally (TEM-EDX). No results were obtained by TEM-EDX for copper, since there were interferences with the copper material of the microscope itself and we therefore considered the results to be inconclusive.

Unpolluted and copper-polluted cultures of Ge+Sc consortia and Sp+Ch consortia at different concentrations, were analysed by SEM-EDX. Moreover, in polluted cultures analyzed we also tested different parts of the filters to be sure that copper and lead were retained only in cells. Images of Ge, Sc, Sp and Ch are showing in Figs. 6a, 6c, 7a and 7c respectively.

In unpolluted cultures, copper was not detected externally in the EPS (Figs. 6b and 7b), whilst peaks of copper were detected in polluted cultures in all the of microorganisms assayed (Figs. 6d and 7d). A higher excretion of EPS was found surrounding the cells of Sc and Ch.

Similar results were obtained in unpolluted and lead-polluted cultures of Ge+Sc consortia and Sp+Ch consortia.

Images of Ge, Sc, Sp and Ch are shown in Figs. 8a, 8c, 9a and 9c. Lead was not detected in unpolluted cultures (Figs. 8b and 9b) by SEM-EDX, whilst a peak of lead was found in polluted cultures of Ge, Sc, Sp and Ch respectively (Figs. 8d and 9d).

Intracellular accumulation of lead determined by TEM-EDX

Finally, the ultrathin sections of both consortia are shown in Figs. 10a, 10c, 11a and 11c. In unpolluted cultures, lead was not detected intracellularly (Figs. 10b and 11b).

On the other hand, the four phototrophic microorganisms have the capacity to accumulate lead in intracytoplasmic inclusions (Figs. 10d and 11d). The intracytoplasmic inclusions were identified as polyphosphate granules (see

peaks of P and Ca). These inclusions were also found by Burnat et al. (2010) and Maldonado et al. (2010) in different phototrophic microorganisms, when they were exposed to lead. Jensen and Sicko (1974) and Goldberg et al. (2001) suggested that this kind of inclusions have a detoxifying effect.

Conclusions

CLSM-*Ascan* function is a rapid technique for evaluated *in vivo* the tolerance-resistance of phototrophic microorganism to heavy metals. Taken together, the results described in this work, it can be conclude that: (i) the consortia Ge+Sc are more tolerant-resistant to copper than the consortia Sp+Ch; (ii) both consortia are highly tolerant-resistant to lead and finally (iii) the tolerance-resistance of these consortia was higher for lead than for cooper.

On the other hand, it is important to highlight that, both consortia were able to capture copper externally in the extrapolymeric substances and lead extra and intracellularly in polyphosphate inclusions. Moreover, no inhibitory effect between them was observed in their metal affinity capacity.

As a future work, associations among phototrophic microorganisms could be considered to biorepair metal polluted ecosystems in natural habitats and in industrial processes.

Acknowledgments

This research was supported by the following grants: DGICYT CGL2008-01891/BOS and CTM2009-12838-C04-03. We express our thanks to the staff of the “Servei de Microscòpia” and the “Servei de Llengües” both at the Universitat Autònoma de Barcelona; Marc Alamy from Ecología Portuaria S. L; Cristina Sosa, (UAB) and M^a José Malo (CSIC) for their help in this work.

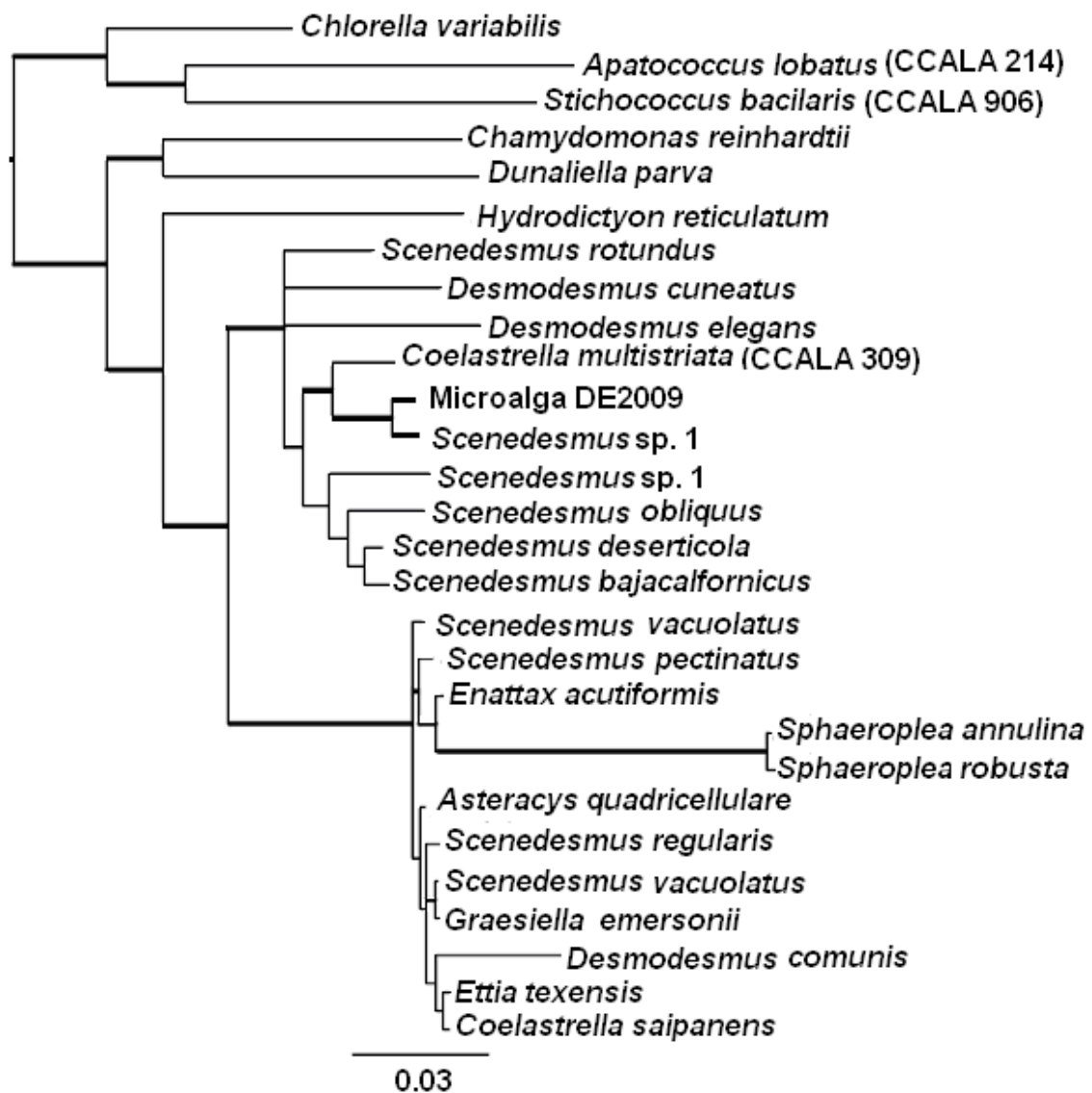


Fig. 1. Consensus Bayesian phylogram based on the multigenic analysis of 2017 nucleotides (assemblage of the partial sequences of 18S rRNA, 23S rRNA and Rubisco genes), showing the relationships between the algal consortia culture, CCALA cultures and other known alga retrieved from GenBank. Branches with strong support (probabilities >0.95) are in bold.

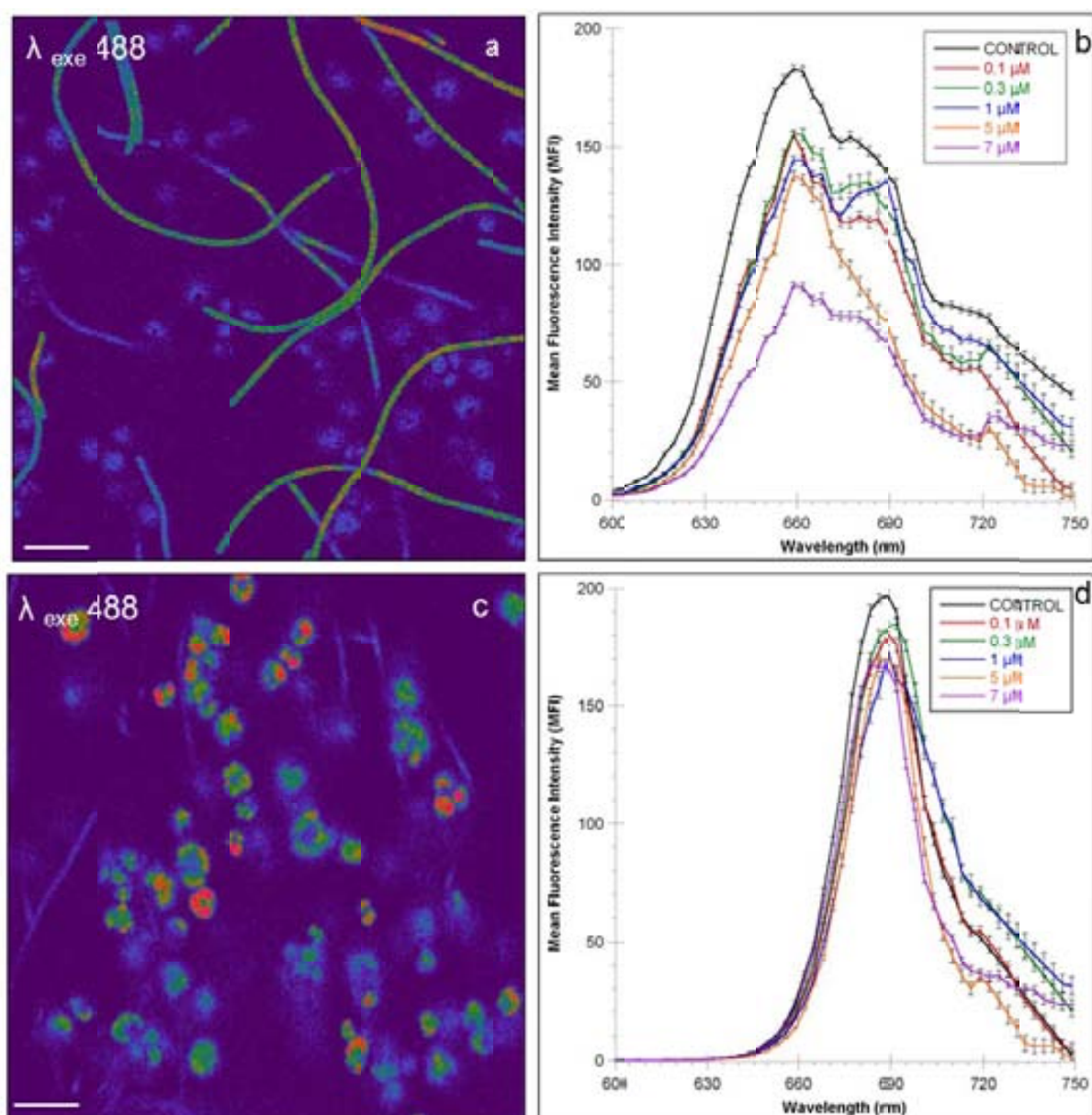


Fig. 2. CLSM images and λ scans plots of unpolluted and copper polluted cultures of phototrophic microorganisms forming a consortia (Ge+Sc). Unpolluted cultures of Ge and Sc are represented in CLSM images (a) and (c). Scale bars represent 10 μ m. λ scans plots of Ge (b) and Sc (d) polluted with different Cu concentrations. 2D plots represent the MFI spectra: emission wavelength (650-750 nm), x axis; MFI, y axis.

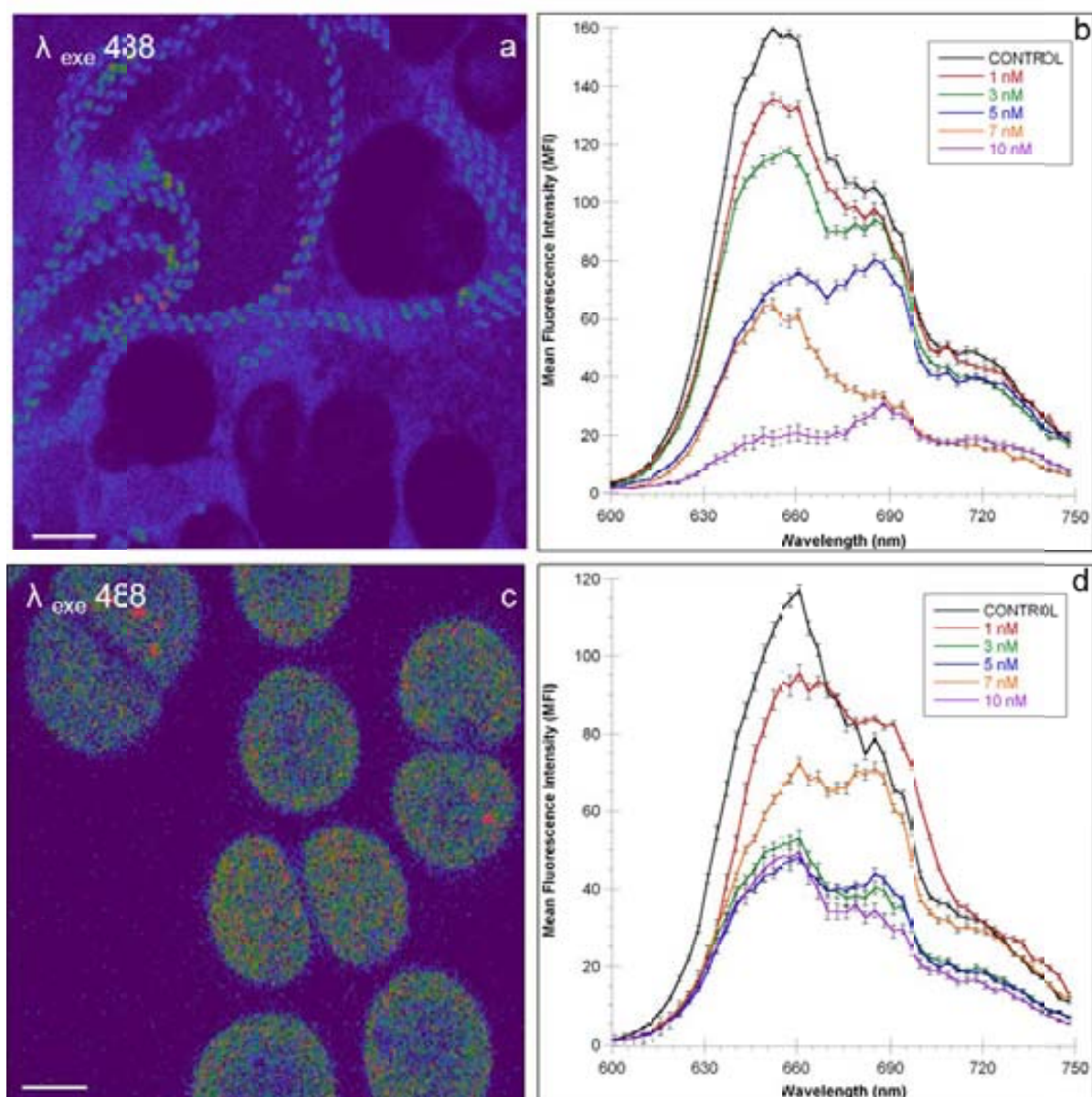


Fig. 3. CLSM images and λ scans plots of unpolluted and copper polluted cultures of cyanobacteria forming a consortia (Sp+Ch). Unpolluted cultures of Sp and Ch are represented in CLSM images (a) and (c). Scale bars represent 10 μm . λ scans plots of Sp (b) and Ch (d) polluted with different Cu concentrations. 2D plots represent the MFI spectra: emission wavelength (650-750 nm), x axis; MFI, y axis.

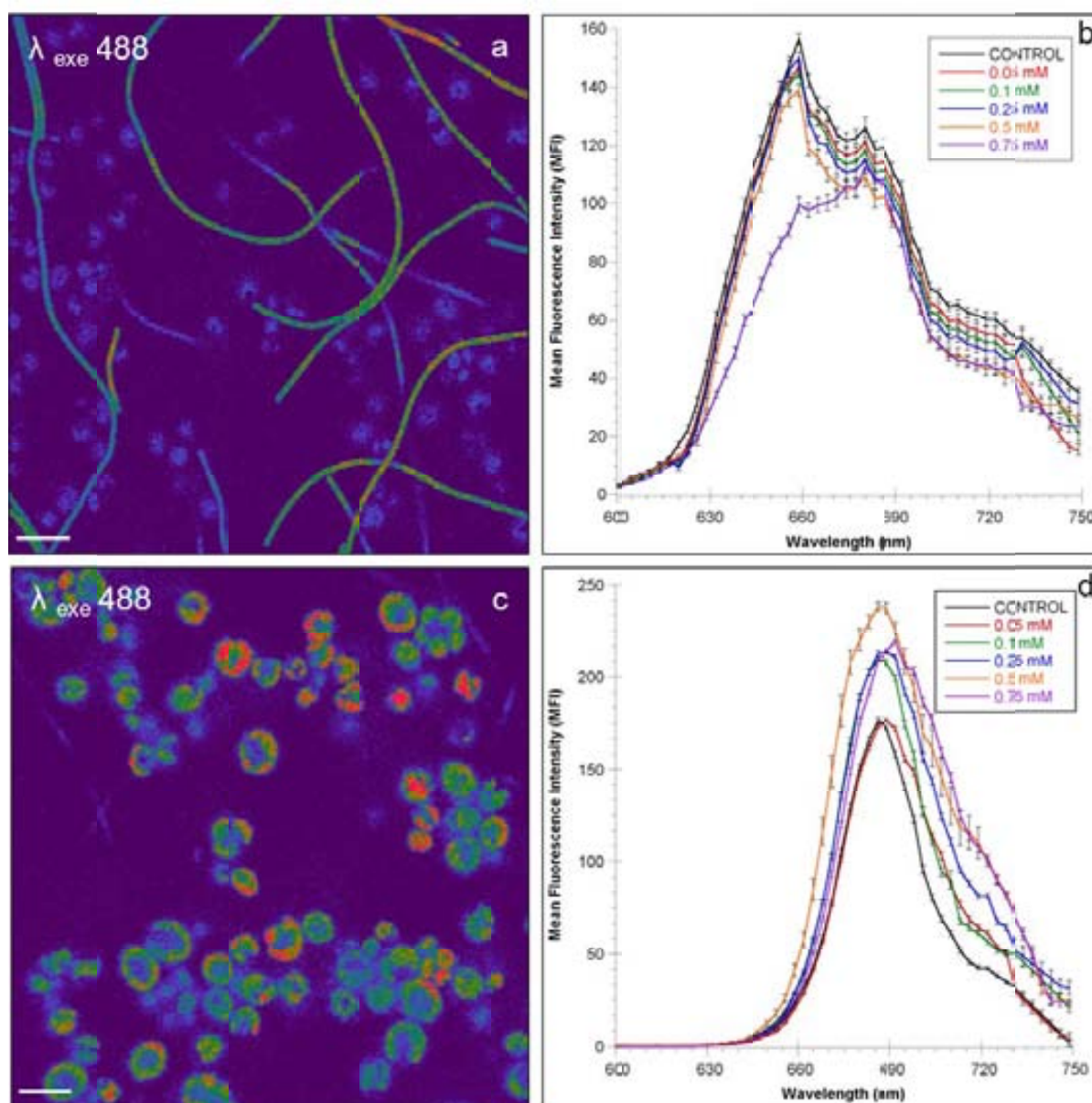


Fig. 4. CLSM images and λ scans plots of unpolluted and lead polluted cultures of phototrophic microorganisms forming a consortia (Ge+Sc). Unpolluted cultures of Ge and Sc are represented in CLSM images (a) and (c). Scale bars represent 10 μm . λ scans plots of Ge (b) and *Scenedesmus* sp. DE2009 (d) polluted with different Pb concentrations. 2D plots represent the MFI spectra: emission wavelength (650-750 nm), x axis; MFI, y axis.

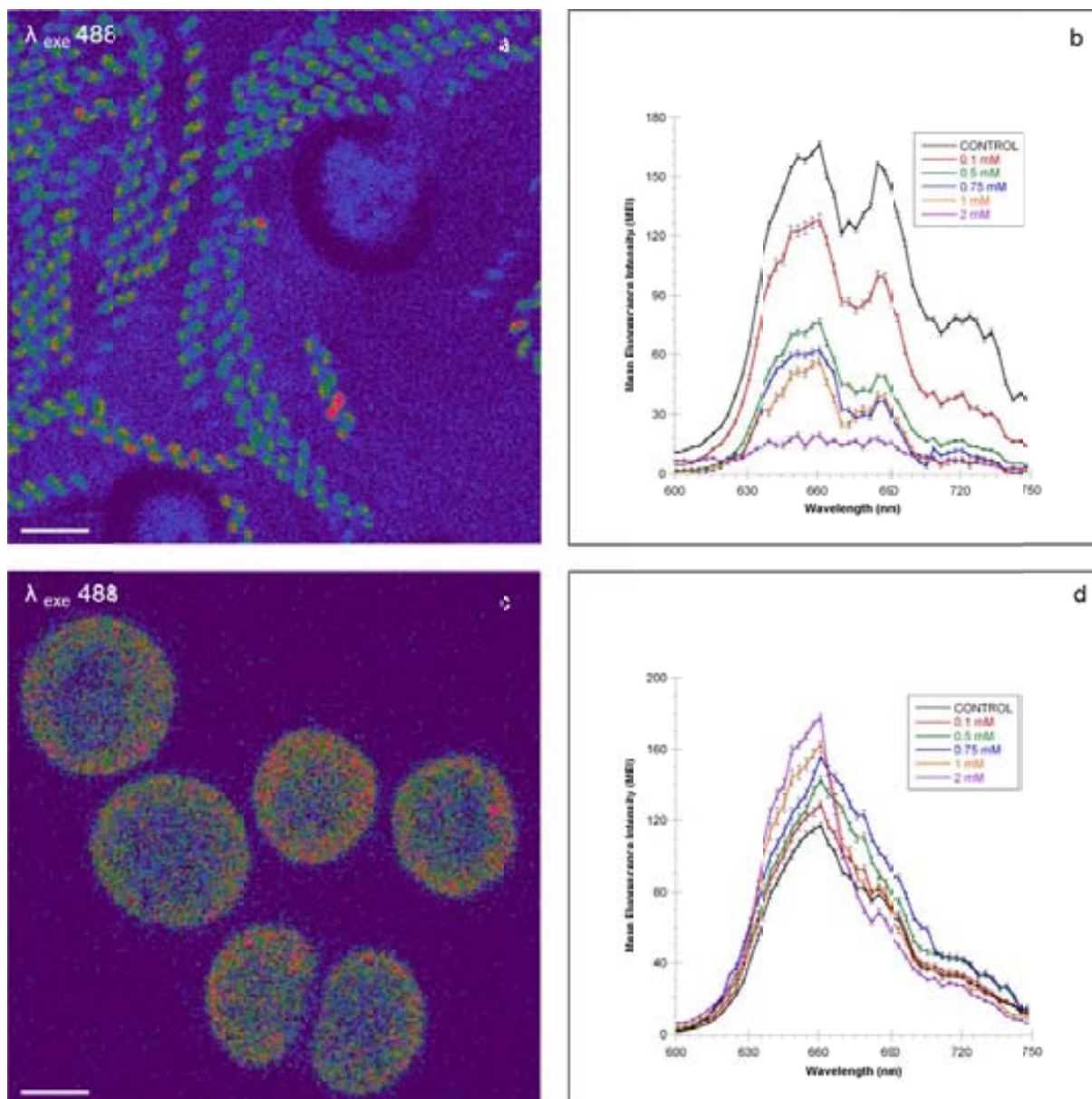


Fig. 5. CLSM images and λ scans plots of unpolluted and lead polluted cultures of cyanobacteria forming a consortia (Sp+Ch). Unpolluted cultures of Sp and Ch are represented in CLSM images (a) and (c). Scale bars represent 10 μ m. λ scans plots of Sp (b) and Ch (d) polluted with different Pb concentrations. 2D plots represent the MFI spectra: emission wavelength (650-750 nm), x axis; MFI, y axis.

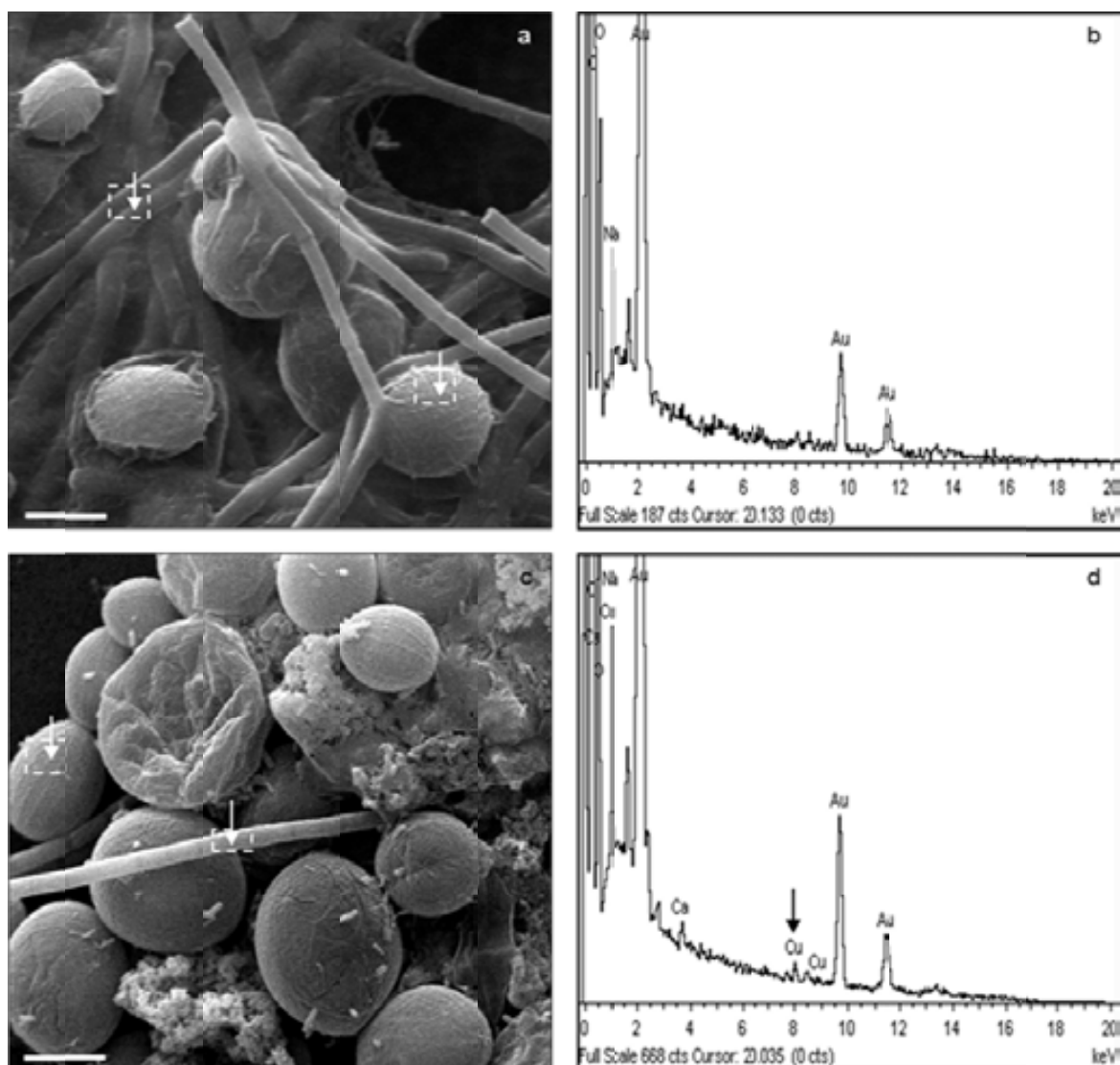


Fig. 6. SEM images of phototrophic microorganisms forming a consortia (Ge+Sc). Unpolluted and polluted cultures at 5 μM concentration of copper are showed in figures: (a) and (c). Their respective EDX spectra are represented in figures: (b) and (d). Cu peak is indicated by arrow, for both microorganisms. Bars represent 10 μm .

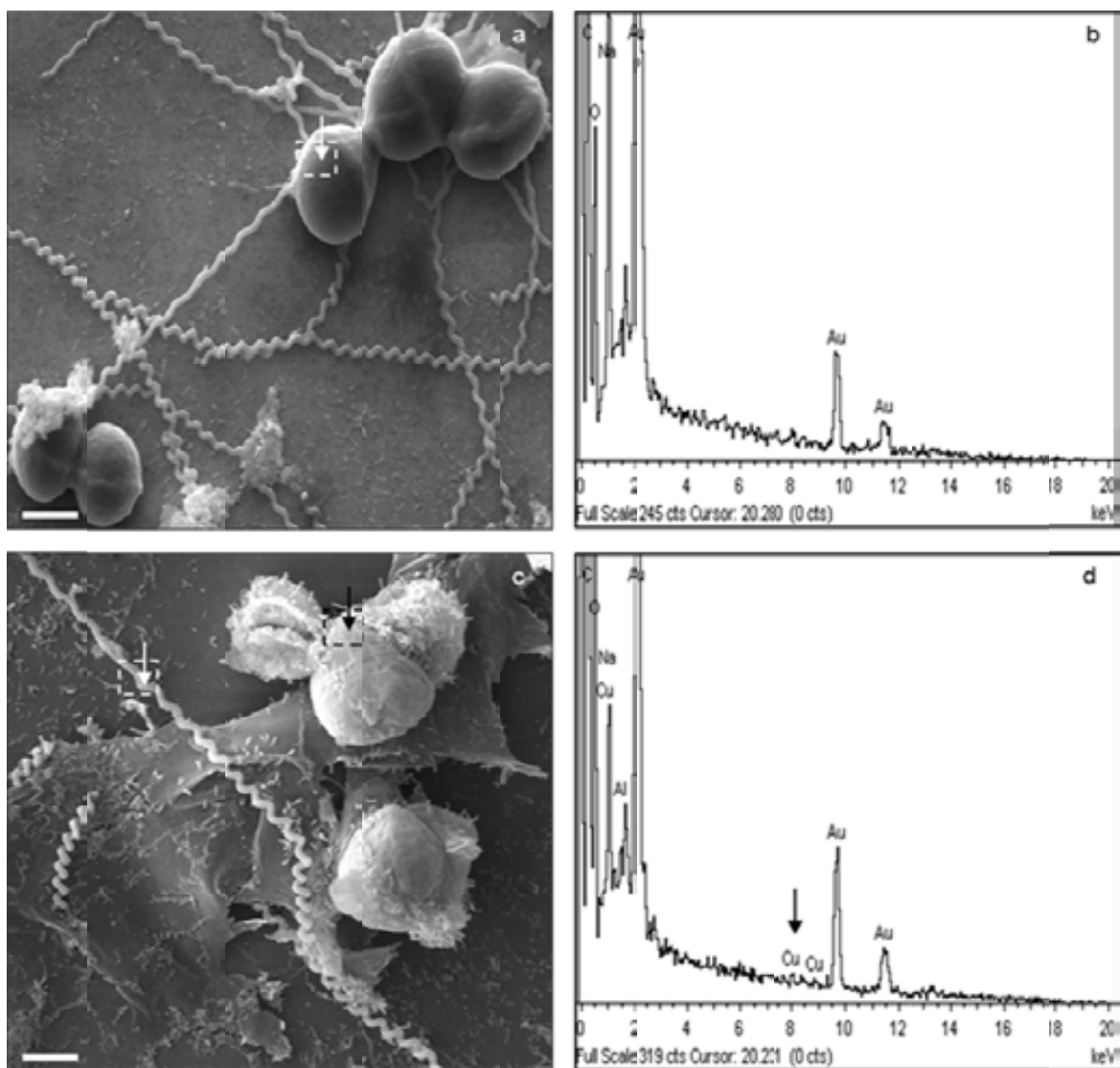


Fig. 7. SEM images of consortia cyanobacteria (Sp+Ch). Unpolluted and polluted cultures at 10 nM concentration of cooper are showed in figures: (a) and (c). Their respectives EDX spectra are represented in figures: (b) and (d). Cu peak is indicated by arrow. Bars represent 10 µm.

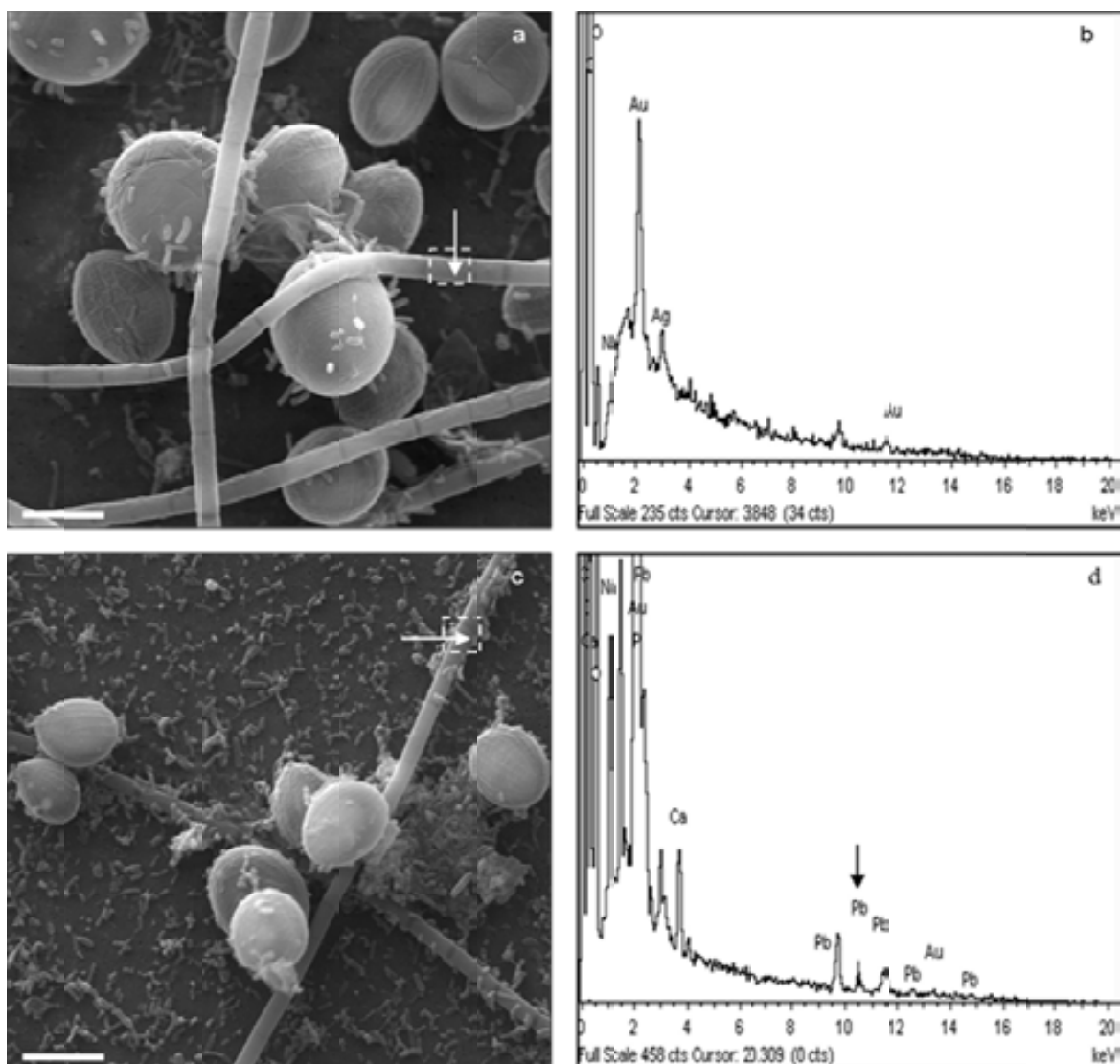


Fig. 8. SEM images of phototrophic microorganisms forming a consortia (Ge+Sc). Unpolluted and polluted cultures at 0.75 mM concentration of lead are showed in figures: (a) and (c). Their respective EDX spectra are represented in figures: (b) and (d). Pb peak is indicated by arrow. Bars represent 10 μm .

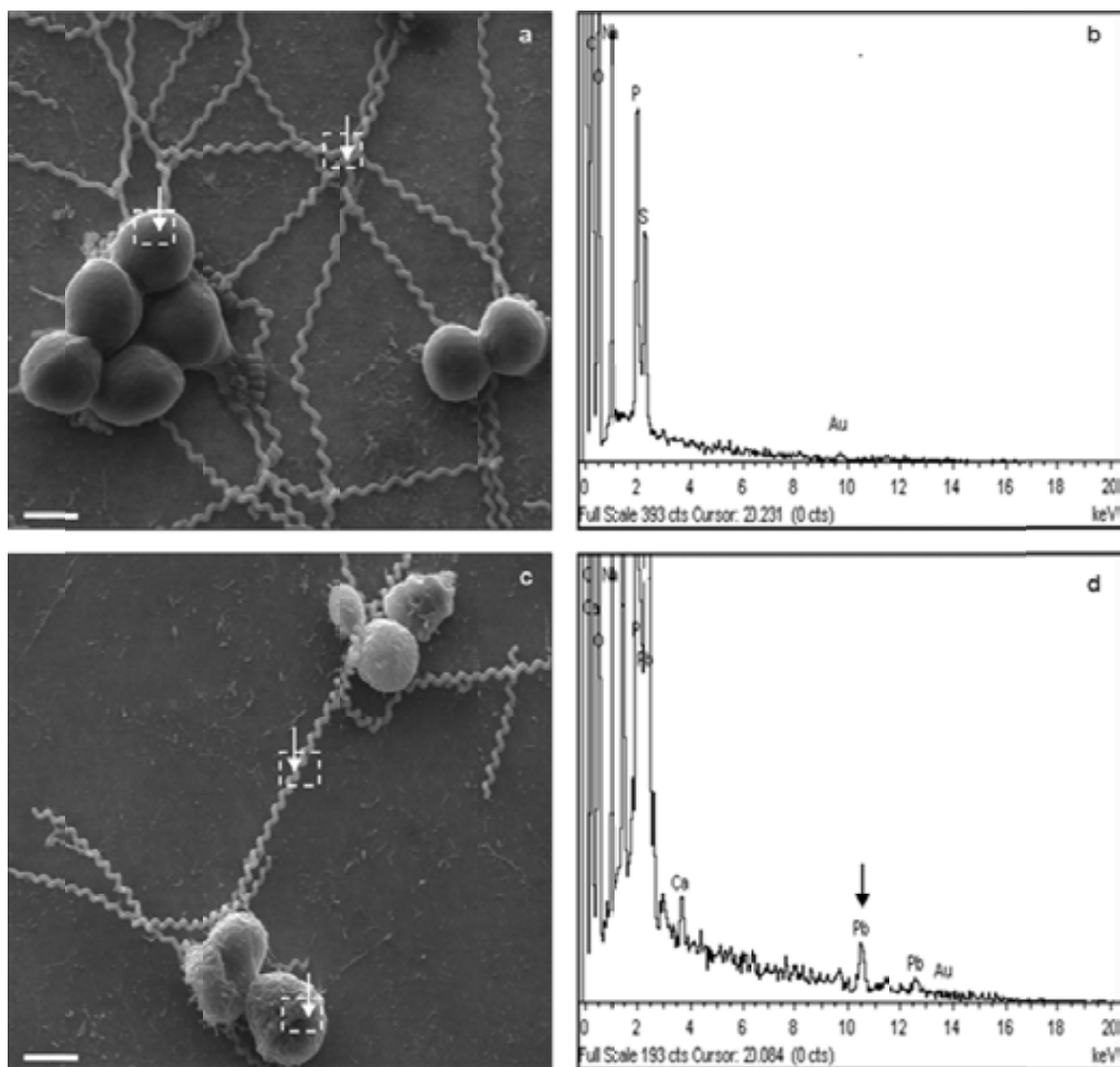


Fig. 9. SEM images of consortia cyanobacteria (Sp+Ch). Unpolluted and polluted cultures at 1 mM concentration of lead are showed in figures: (a) and (c). Their respective EDX spectra are represented in figures: (b) and (d). Pb peak is indicated by arrow, for both microorganisms. Bars represent 10 μm .

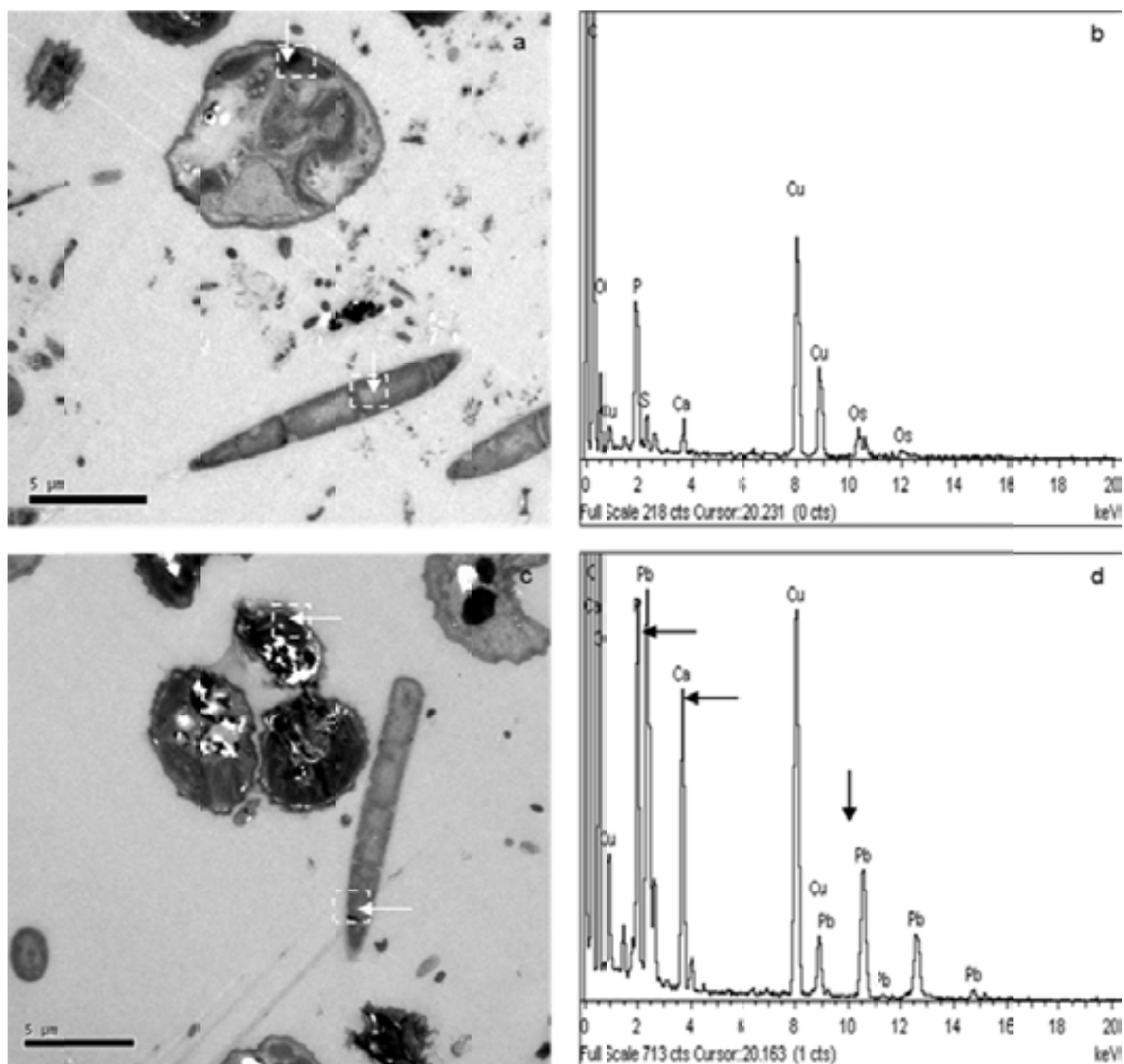


Fig. 10. TEM images of phototrophic microorganisms forming a consortia (Ge+Sc). Unpolluted and polluted cultures at 0.75 mM concentration of lead are showed in figures: (a) and (c). Their respective EDX spectra are represented in figures: (b) and (d). Peaks of Pb, Ca, and P are indicated by arrows, for both microorganisms. Bars represent 5 μm.

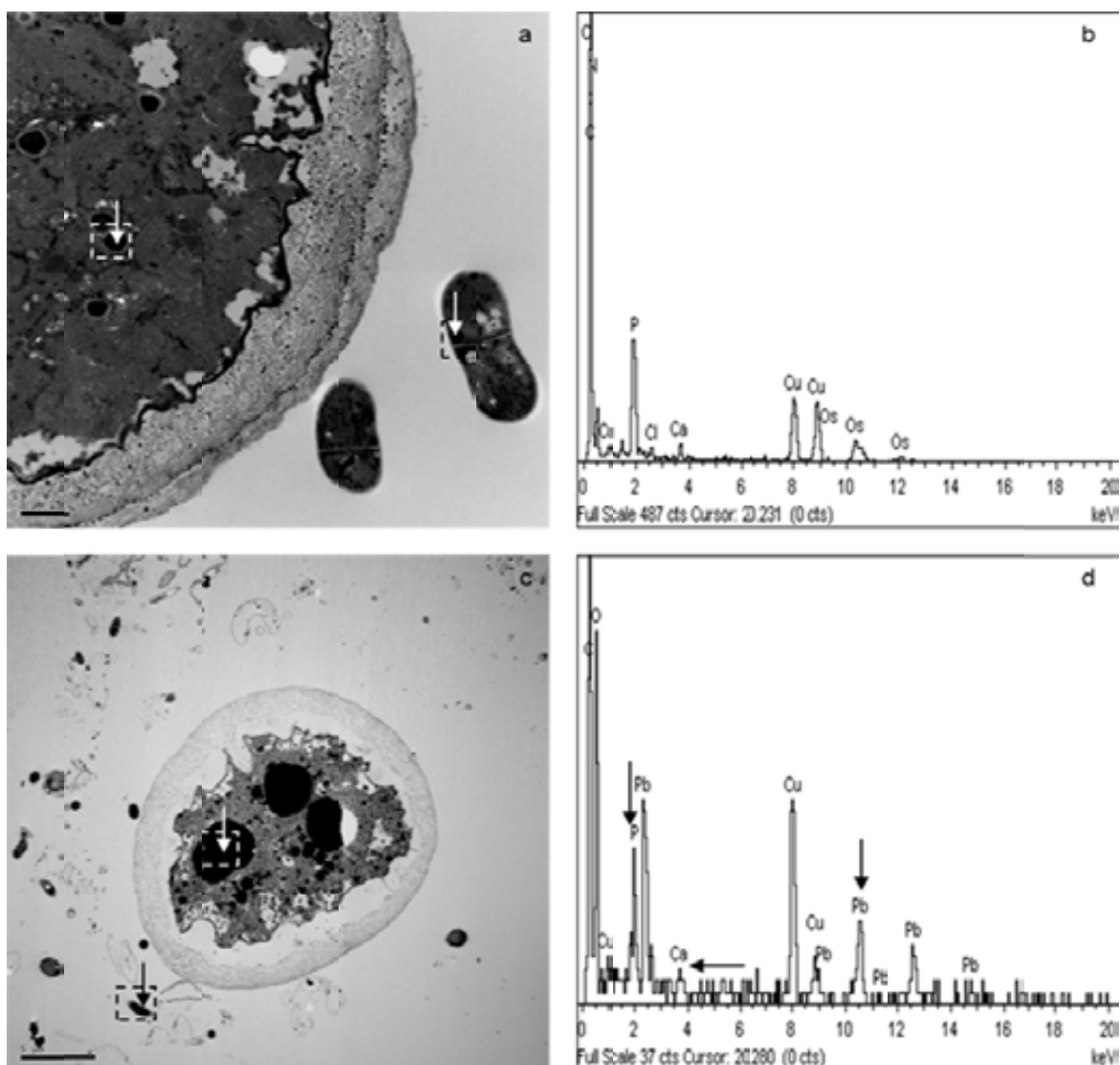


Fig. 11. TEM images of cyanobacteria consortia (Sp+Ch). Unpolluted and polluted cultures at 1 mM concentration of lead are showed in figures: (a) (bar 1 μm) and (c) (bar 5 μm). Their respective EDX spectra are represented in figures: (b) and (d). Peaks of Pb, Ca, and P are indicated by arrows.

References

- Burgos, A., Seder-Colomina, M., Maldonado, J., Solé, A., Esteve, I., 2012. Scanning Electron Microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray detector to study copper removal on different phototrophic microorganisms. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Microscopy Book Series. Vol. 1.* Méndez-Vilas, A. (Ed.) FORMATEX, pp. 222–229.
- Burnat, M., Diestra, E., Esteve, I., Solé, A., 2009. *In situ* determination of the effects of lead and copper on cyanobacterial populations in microcosms. *PLoS ONE*. 4, e6204.
- Burnat, M., Diestra, E., Esteve, I., Solé, A., 2010. Confocal Laser Scanning Microscopy Coupled to a Spectrofluorometric Detector as a Rapid Tool for Determining the *In Vivo* Effect of Metals on Phototrophic Bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84, 55–60.
- Castenholz, R.W., 2001. Phylum Bx Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In *Bergey's Manual Systematic Bacteriology. Vol 1. The Archea and deeply branching and phototrophic bacteria.* Boone, DR., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (Eds). Springer-Verlag. New York, pp. 473–599.
- Castresana, J., 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552
- Cohen, Y., Rosenberg, E., (Eds)1989. "Microbial Mats". ASM Publications, 494. pages.

- Cubero, O.F, Crespo, A., Fatehi, J., Bridge, P.D., 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized and other fungi. *Pl. Syst. Evol.* 216, 243–249.
- De Philippis, R., Paperi, R., Sili, C., Vincenzini, M., 2003. Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, *Cyanospira capsulata* and *Nostoc* PCC7936. *J. Appl. Phycol.* 15, 155–161.
- Diestra, E., Solé, A., Martí, M., Garcia de Oteyza, T., Grimalt, J.O., Esteve, I., 2005. Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Scanning.* 27, 176–180.
- Esteve, I., Ceballos, D., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Guerrero, R., 1993. Microbial mats: structure, development and environmental significance. In: L.J. Stal, P. Caumette (Eds.), *NATO ASI Series G: Ecological Sciences*, Springer, Heidelberg, pp. 4165–4420.
- Fourçans, A., de Oteyza, T.G., Wieland, A., Solé, A., Diestra, E., van Bleijswijk, J., Grimalt, J.O., Kühl, M., Esteve, I., Muyzer, G., Caumette, P., Duran, R., 2004. Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 55–70.
- Garcia de Oteyza, T., Grimalt, J.O., Diestra, E., Solé, A., Esteve, I., 2004. Changes in the composition of polar and apolar crude oil fractions under the action of *Microcoleus* consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 226–232.

-
- Giloteaux, L., Solé, A., Esteve, I., Duran, R., 2011. Bacterial community composition characterization of a lead-contaminated *Microcoleus* sp. consortium. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 18, 1147–1159.
- Goldberg, J., González, H., Jensen, T.E., Corpe, W. A., 2001. Quantitative analysis of the elemental composition and the mass of bacterial polyphosphate bodies using STEMEDX. *Microbios.* 106, 177–188.
- Gong, R., Ding, Y., Liu, H., Chen, Q., Liu, Z., 2005. Lead biosorption and desorption by intact and pre-treated *Spirulina maxima* biomass. *Chemosphere.* 58, 125–130.
- Guerrero, R., Urmeneta, J., Rampone, G., 1993. Distribution of types of microbial mats at the Ebro Delta. Spain. *BioSystems.* 31, 135–144.
- Hayden, H.S., Waaland, J.R., 2002. Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear sequences. *J. Phycol.* 38, 1200–1212.
- Heng, L.Y., Jusoh, K., Ling, C.H., Idris, M., 2004. Toxicity of single and combinations of lead and cadmium to the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 373–379.
- Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W.E.A., Zwart, G., 2003. High-Resolution Differentiation of Cyanobacteria by Using rRNA-Internal Transcribed Spacer Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6634–6643.
- Jensen, T.E., Sicko, L.M., 1974. Phosphate metabolism in blue-green algae. I.

- Fine structure of the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*. *Can. J. Microbiol.* 20, 1235–1239.
- Maldonado, J., De los Rios, A., Esteve, I., Ascaso, C., Puyen, Z.M., Brambilla, C., Solé, A., 2010. Sequestration and *in vivo* effect of lead on DE2009 microalga, using high-resolution microscopic techniques. *J. Hazard. Mater.* 183, 44–50.
- Maldonado, J., Solé, A., Puyen., Z.M., Esteve, I., 2011. Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro Delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquat. Toxicol.* 104, 135–144.
- Manhart, J.R., 1994. Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences. *Mol. Phy. Evol.* 3, 114–27.
- Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro Delta biota and wildlife. *Environ. Monit. Assess.* 71, 187–205.
- Nakagawa, T., Fukui, M., 2002. Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48, 211–222.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H., Inouye, I., 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.* 44, 47–55.
- Nübel, U., García-Pichel, F., Muyzer, G., 1997. PCR primers to amplify rRNA

-
- genes from cyanobacteria. *Appl. Env. Microb.* 63, 3327–3332.
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., 1996. Microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* 31, 225–247.
- Pfennig, N., Trüper, H.G., 1992. The family of Chromatiaceae. In: Balows A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Eds.), *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3200–3221.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Pradhan, S., Srinivas, T.N., Pindi, P.K., Kishore, K.H., Begum, Z., Singh, P.K., Singh, A.K., Pratibha, M.S., Yasala, A.K., Reddy, G.S., Shivaji, S., 2010. Bacterial biodiversity from Roopkund Glacier, Himalayan mountain ranges, India. *Extremophiles.* 14, 377–95.
- Presting, G., 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Can. J. Bot.* 84, 1434–1443.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R.Y., 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1–61.
- Sánchez, O., Diestra, E., Esteve, I., Mas, J., 2005. Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. *Microb. Ecol.* 50, 580–588.

-
- Shing, W. L., Heng, L.Y., Surif, S., 2012. The fluorometric response of cyanobacteria to short exposure of heavy metal. *Adv. Environ. Biol.* 6, 103–108.
- Seder-Colomina, M., Burgos, A., Maldonado, J., Solé, A., Esteve, I., 2013. The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined *in vivo* and at cellular level by confocal laser microscopy. *Ecotoxicol.* 22, 199–205.
- Solisio, C., Lodi, A., Torre, P., Converti, A., Del Borghi, M., 2006. Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* 97, 1756–1760.
- Thompson, J.D., Higgings, D.G., Gibson, T.J., 1997. ClustalX: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Wieland, A., Kühl, M., McGowan, L., Fourçans, A., Duran, R., Caumette, P., Garcia de Oteyza, T., Grimalt, J.O., Solé, A., Diestra, E., Esteve, I., Herbert R.A., 2003. Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. *Microb. Ecol.* 46, 371–390.

Anexo II: Medios de cultivo.**Medio BG11**

Ingredientes	Composición (g.L⁻¹)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.04
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036
Acido cítrico	0.006
Citrato de amonio férrico	0.006
EDTA	0.001
Na ₂ CO ₃	0.04
Mix de metales traza A5+Co*	1 mL
Agua desionizada	hasta 1L

pH después de autoclavar 7.4 , dejar enfriar.

Medio ASNIII

Ingredientes	Composición (g.L⁻¹)
NaCl	25
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2
KCl	0.5
NaNO ₃	0.75

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.02
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.5
Acido cítrico	0.03
Citrato de amonio férrico	0.003
EDTA	0.0005
Na_2CO_3	0.04
Mix de metales traza A5+Co*	1 mL
Agua destilada	hasta 1 L

pH después de autoclavar 7.5 , dejar enfriar.

*** Mix de metales traza A5+Co**

Ingredientes	Composición (g.L⁻¹)
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.222
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.390
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.079
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.0494
Agua desionizada	hasta 1 L

Pfennig Mineral medio

Para 1 L

Agua desionizada	850 mL
Solución A	10 mL
Solución B	10 mL
Solución C	10 mL

Autoclavar 15 ', 121°C, dejar enfriar y adicionar:

Solución D	1 mL
Solución E	100 mL
Solución F	10 mL
Solución H	25 mL

. Solución A

Ingrediente	Composición g L ⁻¹
NH ₄ Cl	30
K ₂ HPO ₄	30
Agua desionizada	a 1 L

. Solución B

Ingrediente	Composición g L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	20
MgCl ₂ .6H ₂ O/ MgSO ₄ .7H ₂ O	20/25
KCl	20
Agua desionizada	a 1 L

Ajustar el pH a 3 adicionando HCl

. Solución C

Ingrediente	Composición g L ⁻¹
[1]	
Na ₂ -EDTA	500
FeSO ₄ .7H ₂ O	200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10

. Solución E

Ingrediente	Composición g L ⁻¹
Na ₂ CO ₃ anh.	20
Agua desionizada	a 1 L

MnCl₂·4H₂O 3

. Solución F

Ingrediente Composición g L⁻¹

[2]

Na₂S 7 - 9H₂O 24

H₃BO₃

30

Na₂CO₃ anh 21

COCL₂·6H₂O

20

Agua desionizada a 1 L

CuCl₂·2H₂O

1

. Solución H

[3]

HCl 35 % 88.3 mL

NiCl₂·6H₂O g

2

Agua desionizada a 1 L

[4]

Na₂MoO₄·2H₂O

3

Adicionar 1 ml de [1],[2],[3] y [4] hasta 1 L

de agua desionizada.

. Solución D

Ingrediente Composición g L⁻¹

Cyancobalamin 0.02

Agua desionizada a 1 L

Esterilizar por filtración

Referencias

- Alloway, B., Thornton, I., Smart, G.A., Sherlock, J.C., Quinn, M.J. (1988) Metal availability. *Sci. Total Environ.* 75:41-69.
- Aksua Z., Ertugrulb S., Donmez Gonul. (2009) Single and binary chromium (VI) and Remazol Black B biopartition properties of *Phormidium* sp. *J. Hazard. Mater.* 168, 130-318.
- Bai H.J., Zhang Z.M., Yang G.E., Li B.Z. (2008) Bioremediation of cadmium by growing *Rhodobacter sphaeroides*: kinetic characteristic and mechanism studies. *Bioresour. Technol.* 99, 7716–7722.
- Banfield J. F., Cervini-Silva J., Nealson, K. H. (2005) *Molecular Geomicrobiology, Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, vol. 59. Washington, DC: Mineralogical Society of America.
- Boluda R., Roca-Pérez L., Marimón L. (2011) Soil plate bioassay: An effective method to determine ecotoxicological risks. *Chemosphere.* 84: 1-8.
- Sunda W., Hustman S.A. (1995) Regulation of copper concentration in the oceanic nutrient line by phytoplankton uptake and regeneration cycles. *Limnol. Oceanogr.* 40: 135-137.
- Burgos A., Seder-Colomina M., Maldonado J., Solé A., Esteve I. (2012) Scanning Electron Microscopy coupled to an Energy Dispersive X-ray detector to study copper removal on different phototrophic microorganisms. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. Microscopy Book Series. Vol. 1.* Méndez-Vilas, A. (Ed.) FORMATEX. pp. 222-229.

-
- Bouza-Deaño R., Ternero-Rodríguez M., Fernandez-Espinosa A.J. (2008) Trend study and assessment of surface water quality in the Ebro River (Spain). *J. Hydrol.* 361: 227-239.
- Burnat M., Diestra E., Esteve I., Solé A. (2009) *In situ* determination of the effects of lead and copper on cyanobacterial populations in microcosms. *PLoS ONE.* 4:e6204.
- Burnat M., Diestra E., Esteve I., Solé A. (2010) Confocal Laser Scanning Microscopy Coupled to a Spectrofluorometric Detector as a Rapid Tool for Determining the *In Vivo* Effect of Metals on Phototrophic Bacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84: 55-60.
- Brunberg AK., Nilsson E., Blomqvist P. (2002) Characteristics of oligotrophic hardwater lakes in a postglacial land-rise area in mid Sweden. *Freshw. Biol.* 47:1451-1462.
- Campbell S.E. (1979) Soil stabilization by a prokaryotic desert crust: implications for Precambrian land biota. *Orig. of Life.* 9:335-348.
- Castenholz R.W. (2001) Phylum BX Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In: Boone DR. Castenholz R.W., Garrity G.M., editors. *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, vol. 1, The Archea and deeply branching and phototrophic bacteria. Springer-Verlag, New York. p. 473-599.
- Castresana J. (2000) Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17: 540-552.
- Choi A., Wang S., Lee M. (2009) Biosorption of cadmium, copper, and lead ions from aqueous solutions by *Ralstonia* sp. and *Bacillus* sp. isolated from

- diesel and heavy metal contaminated soil. *Geosciences Journal* 13(4), 331–341.
- Cohen Y., Rosenberg E. (Eds) 1989. "Microbial Mats". ASM Publications, 494. pages.
- Congeevaram S., Dhanarani S., Park J., Dexilin M., Thamaraiselvi K. (2007) Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *J. Hazard. Mater.* 146(1-2), 270-277.
- Cubero O.F., Crespo A., Fatehi J., Bridge P.D. (1999) DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized and other fungi. *Pl. Syst. Evol.* 216: 243-249.
- Decho A.W. (1994) Exopolymers in microbial mats: assessing their adaptive roles. In: Stal, L.J., Caumette, P. (Eds.), *Microbial Mats. Structure, development and environment significance*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 215-219.
- De la Cerda B., Castielli O., Durán R.V., Navarro J.A., Hervás M., De la Rosa M.A. (2008) A proteomic approach to iron and copper homeostasis in cyanobacteria. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 6:322-9.
- De Philippis R., Paperi R., Sili C., Vincenzini M. (2003) Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria, *Cyanospira capsulata* and *Nostoc* PCC7936. *J. Appl. Phycol.* 15: 155-161.
- Diestra E., Solé A., Martí M., García de Oteyza T., Grimalt JO., Esteve I. (2005) Characterization of an oil-degrading *Microcoleus* consortium by means of

confocal scanning microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. *Scanning*. 27:176-180.

Deniz F., Saygideger S.D., Karaman S. (2011) Response to Copper and Sodium Chloride Excess in *Spirulina* sp. (Cyanobacteria). *Bull Environ Contam Toxicol*. 87: 11-15.

Esteve I., Ceballos D., Martínez-Alonso M., Gaju N., Guerrero R. (1993) Microbial mats: structure, development and environmental significance. In: L.J. Stal, P. Caumette (Eds.), NATO ASI Series G: Ecological Sciences, Springer, Heidelberg. pp. 4165-4420.

Esteve I., Martínez-Alonso M., Mir J. (1992) Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain. Preliminary studies. *Limnetica*. 8:185-195.

Esteve I., Gaju N. (1999) Bacterial symbioses. Predation and mutually beneficial associations. *Int Microbiol*. 2:81-6.

Fourçans A., de Oteyza T.G., Wieland A., Solé A., Diestra E., Van Bleijswijk J., Grimalt J.O., Kühn M., Esteve I., Muyzer G., Caumette P., Duran R. (2004) Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue France). *FEMS Microbiol Ecol*. 51: 55-70.

Gadd G.M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol.*, 156, 609-643.

- García de Oteyza T., Grimalt J.O., Diestra E., Solé A., Esteve I. (2004) Changes in the composition of polar and apolar crude oil fractions under the action of *Microcoleus* consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 226-232.
- Generalidad de Cataluña.(2008) Departamento de Medio ambiente y vivienda. Oficina catalana cambio climático. Documento síntesis. España. Versión on line: <http://www.20.gencat.cat/docs/canviclimatic/Home> (Diciembre 10 de 2012).
- Giloteaux L., Solé A., Esteve I., Duran R. (2011) Bacterial community composition characterization of a lead-contaminated *Microcoleus* sp. consortium. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 18: 1147-1159.
- Gimeno-García, E., Andreu, V., Boluda, R. (1996) Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ Pollut.* 92:19-25.
- Goldberg J., González H., Jensen T.E., Corpe W. A. (2001) Quantitative analysis of the elemental composition and the mass of bacterial polyphosphate bodies using STEMEDX. *Microbios.* 106: 177-188.
- Gong R., Ding Y., Liu H., Chen Q., Liu Z. (2005) Lead biosorption and desorption by intact and pre-treated *Spirulina maxima* biomass. *Chemosphere.* 58: 125-130.
- Guerrero R., Urmeneta J., Rampone G. (1993) Distribution of types of microbial mats at the Ebro Delta. Spain. *BioSystems.* 31: 135-144.
- Guo H., Luo S., Chen L., Xiao X., Xi Q., Wei W., Zeng G., Liu Ch., Wan Y., Chen J., He Y. (2010) Bioremediation of heavy metals by growing

-
- hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Technology*. 1001: 8599-8605.
- Hana X., Wong Y.S., Tam N.F.Y. (2006) Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *Journal of Colloid and Interface Science* 303, 365–371.
- Hayden H.S., Waaland J.R. (2002) Phylogenetic systematics of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear sequences. *J. Phycol.* 38: 1200-1212.
- Heng L.Y., Jusoh K., Ling C.H., Idris M. (2004) Toxicity of single and combinations of lead and cadmium to the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72: 373-379.
- Herdman M., Iteman I., Rippka R. (2005) Catalogue of Cyanobacterial strains. 2nd ed. Institut Pasteur, Paris.
- Hoehler T.M., Bebout B.M., Des Marais D.J. (2001) *Nature*. 412:324-327.
- Janse I., Meima M., Kardinaal W.E.A., Zwart G. (2003) High-Resolution Differentiation of Cyanobacteria by Using rRNA-Internal Transcribed Spacer Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6634-6643.
- Jensen T.E., Sicko L.M. (1974) Phosphate metabolism in blue-green algae. I. Fine structure of the "polyphosphate overplus" phenomenon in *Plectonema boryanum*. *Can. J. Microbiol.* 20: 1235-1239.

-
- Jungblut A.D., Neilan B.A. (2010) NifH-gene diversity and expression in a microbial mat community on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Antarctic Science*. 22:117-122.
- Kalinowska R., Pawlik-Skowronska B. (2010) Response of two terrestrial green microalgae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress. *Environ.Pollut.*158: 2778-2785.
- Katoh S., Kobayashi C., Kakegawa T., Yamagishi A. (2009) Microbial communities in iron-silica-rich microbial mats at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology*. 11:2094-2111.
- Kimimura, M., Katoh, S. (1972). Studies onelectron transport associated with photosystem II functional site of plastocyanin: Inhibitory effectsof HgCl₂ on electron transport and plastocyaninin chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 283: 279-292.
- Lee Y.Ch., Chan S.P. (2011) The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *cladophora* filamentous macroalgae. *Biores. Technol.* 102: 5297-5304.
- Li L., Hu Q., Zeng J., Qi H., Zhuang G. (2011) Resistance and biosorption mechanism of silver ions by *Bacillus cereus* biomass. *J. Environ. Sci.* 23 (1), 108–111.
- Lovley D.R. (ed.) (2000) *Environmental Microbe-Metal Interactions*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

- Mañosa S., Mateo R., Guitart R. (2001) A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro Delta biota and wildlife. *Environ. Monit. Assess.* 71: 187-205
- Mateo R., Martínez-Vilalta A., Guitart R. (1997) Lead Shot Pellets in the Ebro Delta, Spain: Densities in Sediments and Prevalence of Exposure in waterfowl. *Environ. Pollut.* 3: 335-341.
- Maldonado J., Diestra E., Huang L., Domènech A.M., Villagrasa E., Puyen Z.M., Duran R., Esteve I. and Solé A. (2010a) Isolation and identification of a bacterium with high tolerance to lead and copper from a marine microbial mat in Spain. *Ann. Microbiol.* 60:113-120
- Maldonado J., De los Rios A., Esteve I., Ascaso C., Puyen Z.M., Brambilla C., Solé A. (2010b) Sequestration and *in vivo* effect of lead on DE2009 microalga, using high-resolution microscopic techniques. *J. Hazard. Mater.* 183: 44-50.
- Maldonado J., Solé A., Puyen Z.M., Esteve I. (2011) Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquatic Toxicology.* 104:135-144.
- Manhart J.R. (1994) Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences. *Mol. Phy. Evol.* 3: 114-27.
- Mar Areco M., Dos Santos Afonso M. (2010) Copper, zinc, cadmium and lead biosorption by *Gymnogongrus torulosus*. Thermodynamics and kinetics studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81, 620–628.

-
- Mehta S.K., Gaur J.P. (2005) Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. *Critical Rev. Biotechnol.* 25: 113-152.
- Millonig G.J. (1961) Advantages of phosphate buffer OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Phys.* 32:1637.
- Montuori P., Lama P., Aurino S., Naviglio D., Triassi M. (2013) Metal loads into the Mediterranean Sea: estimate of Sarno River input and ecological risk. *Ecotoxicol.* 22: 295-307
- Moreno-Garrido I. (2008) Microalgae immobilization: Concurrent techniques and uses. *Biores. Technol.* 99: 3949-3964.
- Nakagawa T., Fukui M. (2002) Phylogenetic characterization of microbial mats and streamers from a Japanese alkaline hot spring with a thermal gradient. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48: 211-222.
- Nakajima A. and Tsuruta T. (2004) Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 260, 13-18.
- Nakayama T., Watanabe S., Mitsui K., Uchida H., Inouye I. (1996) The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.* 44: 47-55.
- Nogales B., Lanfranconi M.P., Piña-Villalonga J.M., Bosch R. (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev.* 35:275-298.

- Nübel U., García-Pichel F., Muyzer G. (1997) PCR primers to amplify rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Env. Microb.* 63: 3327-3332.
- Nziguheba, G., Smolders, E. (2008) Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *J.scitoven.* 390: 53-57.
- Paerl H.W., Pinckney J.L. (1996) Microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* 31: 225-247.
- Pandia M., Shashirekha V., Swamy M. (2009). Bioabsorption of chromium from retan chrome liquor by cyanobacteria. *Microbiol. Res.* 164, 420-428.
- Pradhan S., Srinivas T.N., Pindi P.K., Kishore K.H., Begum Z., Singh P.K., Singh A.K., Pratibha M.S., Yasala A.K., Reddy G.S., Shivaji S. (2010) Bacterial biodiversity from Roopkund Glacier, Himalayan mountain ranges, India. *Extremophiles.* 14: 377-95.
- Pfennig N., Trüper H.G. (1992) The family of Chromatiaceae. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. Schleifer K.H. (Eds.), *The prokaryotes*, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin. pp. 3200-3221.
- Perales-Vela H.V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Cañizales-Villanueva R.O. (2007) Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere.* 67: 2274-2281
- Pereira S., Zile A., Micheletti E., Moradas-Ferreira P., De Philippis R., Tamagnini P. (2009) Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides:

composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol Rev.* 33: 917-941.

Pereira S., Micheletti E., Zille A., Santos A., Moradas-Ferreira P., Tamagnini P., De Philippis R. (2011) Using extracellular polymeric substances (EPS)-producing cyanobacteria for the bioremediation of heavy metals: Do cations compete for the EPS functional groups and also accumulate inside the cell? *Microbiol.* 157:451-458.

Presting G. (2006) Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Can. J. Bot.* 84: 1434-1443.

Posada D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.

Potts M., Ocampo-Friedmann R., Bowman M.A., Tözün. (1983) *Chroococcus* S24 and *Chroococcus* N41 (cyanobacteria): morphological, biochemical and genetic characterization and effects of water stress on ultrastructure. *Arch. Microbiol.* 135: 81-90.

Prego R., Cobelo-García A. (2003) Twentieth century overview of heavy metals in the Galician Rias (NW Iberian Peninsula). *Environ Pollut.* 121: 425-52.

Puyen Z.M., Villagrasa E., Maldonado J., Esteve I., Sole A. (2012a) Viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochromes and CLSM-image analysis. *Curr. Microbiol.* 64, 75-80.

-
- Puyen Z.M., Villagrasa E., Maldonado J., Diestra E., Esteve I., Sole A. (2012b) Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. *Bioresour. Technol.* 126: 233-237.
- Reynolds E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-212.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61.
- Sánchez-Chardi A., Lopez-Fuster M.J., Nadal J. (2007) Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): sex- and age-dependent variation. *Environ. Pollut.* 145, 7-14.
- Sánchez O., Diestra E., Esteve I., Mas J. (2005) Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. *Microb. Ecol.* 50: 580-588.
- Sari A., Tuzen M. (2009) Kinetic and equilibrium studies of biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution by macrofungus (*Amanita rubescens*) biomass. *J. Hazard. Mater.* 164, 1004–1011.
- Seder-Colomina M., Burgos A., Maldonado J., Solé A., Esteve I. (2013). The effect of copper on different phototrophic microorganisms determined *in vivo* and at cellular level by confocal laser microscopy. *Ecotoxicol.* 22: 199-205.

- Sharma M., Kaushik A., Bala K., Kamra A. (2008) Sequestration of chromium by exopolysaccharides of *Nostoc* and *Gloeocapsa* from dilute aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* 157: 315-318.
- Shing W. L., Heng L.Y., Surif S. (2012) The fluorometric response of cyanobacteria to short exposure of heavy metal. *Adv. Environ. Biol.* 6: 103-108.
- Solisio C., Lodi A., Torre P., Converti A., Del Borghi M. (2006) Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* 97: 1756-1760.
- Surosz W., Palinska K.A. (2004) Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 40-48.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1997) ClustalX: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Valls M., De Lorenzo V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 327-338.
- Volesky B. (2004). *Biosorption of heavy metals*. ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. 408 p
- Wang J., Chen C. (2006) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnol. Adv.* 24: 427-451.

Webber, D., Kloke, A., Tjell., J.C. (1984) A review of current sludge use guidelines for the control of heavy metal contamination in soils, in: P. L'Hermite (Ed.), Processing and Use of Sewage Sludge, CEC-Symposium, Brighton, UK, 27–30 September 1983, Reidel Publishers, London, UK, pp. 371-386.

Wieland A., Kühl M., McGowan L., Fourçans A., Duran R., Caumette P., Garcia de Oteyza T., Grimalt J.O., Solé A., Diestra E., Esteve I., Herbert R.A. (2003) Microbial mats on the Orkney Islands revisited: microenvironment and microbial community composition. *Microb. Ecol.* 46: 371-390.

Zhiyong L. (2009) Advances in marine microbial symbionts in the china sea and related pharmaceutical metabolites *Marine drugs.* 7.113-129