



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Selección de microorganismos con potencial  
para bioreparar ambientes contaminados  
por metales pesados.**

**Optimización y aplicación de técnicas de  
microscopía de alta resolución y  
de métodos químicos.**

**Zully Margoth Puyen Guerra, 2013**



Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Departament de Genètica i Microbiologia**

**Facultat de Biociències**

**Selección de microorganismos con potencial  
para bioreparar ambientes contaminados  
por metales pesados.**

**Optimización y aplicación de técnicas de  
microscopía de alta resolución y  
de métodos químicos.**

Zully Margoth Puyen Guerra

2013





Universitat Autònoma  
de Barcelona

**Departament de Genètica i Microbiologia**

**Facultat de Biociències**

**Selección de microorganismos con potencial  
para bioreparar ambientes contaminados  
por metales pesados.**

**Optimización y aplicación de técnicas de  
microscopía de alta resolución y  
de métodos químicos.**

Memoria de Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Microbiología por la  
Universidad Autónoma de Barcelona, por Zully Margoth Puyen Guerra.

VºBº de los directores de Tesis

Dr. Antonio Solé Cornellà

Dra. Isabel Esteve Martínez

Bellaterra, Enero del 2013



*“¿Que es lo más difícil de todo? Lo que parece más fácil:  
Ver con los ojos lo que ante los ojos tienes...”*

***Xenien Goethe***



## Agradecimientos - Agraïments – Acknowledgments

Siempre me he considerado una mujer muy afortunada, he tenido y tengo personas muy buenas a mi alrededor que me han ayudado a salir adelante y a no volver a tropezar... a veces me pongo a pensar y digo si tengo a tanta gente pendiente de mí es que buena he de ser, un poco vehemente y alborotada pero finalmente una persona en quien confiar y sobre todo presta para ayudar... En mi vida la perseverancia y el optimismo siempre han estado presentes, todo esto lo agradezco a Dios y a mi madre quien siempre ha sido mi motor y ejemplo para salir adelante, eres la mujer que más amo. Ahora pues querida mamita reto cumplido ya tienes a tu doctora de quién siempre podrás estar orgullosa.

Tener un doctorado es un sueño para mí ya que vengo de un país, Perú, en donde las oportunidades para obtener una beca y poder hacerlo son inalcanzables; pero acá estoy a punto de cumplir este objetivo, por esto quiero agradecer a mis dos directores de tesis Isabel y Toni, de ustedes y con ustedes he aprendido demasiado... en primer lugar, Toni quiero agradecerte por toda la confianza que me diste siempre, los consejos, los ánimos de seguir y continuar con esta travesía... muchas gracias por soportarme y sobre todo por apoyarme en mi vida tanto profesional como personal, siempre trataré de “uniformizar” lo prometo. A tí, Isabel, agradecerte por haber confiado sin conocerme y haberme dado la oportunidad de poder pertenecer a tu laboratorio, agradecer toda la ayuda dada en “la consecución de los objetivos propuestos”, y sobre todo por la paciencia de responder cada uno de los 10 mil mails que enviaba.... no ha sido nada fácil llegar hasta acá pero acá estoy y eso se lo debo a ustedes dos....

El laboratorio de Ecología Microbiana ha sido mi vida durante estos 4 años que vivo en Barcelona, por ende la gente que lo conforma: mi familia, esperando no olvidarme de cada uno de ustedes pues los menciono. Elia, te agradezco la confianza puesta en mí, la recomendación a ciegas y el cariño “mi reina”, gracias por estar pendiente y sobre todo por ayudarme a salir adelante tanto en el ámbito profesional como personal. Cuando llegué al laboratorio, eras una persona muy calladita y un poco tímida pero poco a poco te fuí conociendo y encontré a la persona tan agradable y presta a ayudar que eres, te recordaré siempre sentado a mi lado izquierdo con tu Mac, gracias Joan por todo el apoyo que me has dado todo este tiempo que estuviste en el lab, te deseo todo lo mejor por esos nuevos lares americanos donde estás... Mi querido Educitooo como olvidarme de tí, casi todo este tiempo juntos, te debo agradecer mi niño lindo todo lo que me has enseñado, las ganas que siempre le has puesto a las cosas y sobre todo el optimismo con el que siempre llegabas al laboratorio cantando con esos rulos todos alborotados... y como olvidar el “Zullita, un segundito nomás” que me decías... te extraño muchooooo... y como olvidarme de tí mi niña Anama, gracias por escucharme y sobre todo por animarme como tú lo sabes hacer, eres una chica genial y ya verás que llegarás muy lejos porque lo mereces, eres una “crack”... ustedes dos, son mis niños, nunca los olvidaré porque me hicieron sentir muchas veces como en casa.... A pesar que estás ahora en el laboratorio de al lado, te incluyo dentro de mi familia eco-microbiana.. cuántas horas hemos conversado, cuántas cosas hemos compartido, muchassss....!!! gracias Cecita por ser como eres, tan sincera y por tratarme como una más de tu familia, nunca olvidaré los momentos que compartimos juntas,



uno de los mejores vividos aquí, de verdad.... eres una de las personas que me han ayudado y te voy a hechar mucho a faltar querida, como diría en mi país eres mi “yunta”, hasta casi juntas hemos tenido a nuestros pequeñines, te deseo toda la felicidad del mundo junto a Pol y Xavi, “muito obrigado, Cecinha”. Maxi, Marina, Jordi, Sandrita (México), a pesar de que no hemos compartido mucho tiempo quiero agradecerles todo la ayuda y lo que he aprendido de ustedes... de Maxi , a patentar a patentar que el mundo se va a acabar... de Marina una niña muy inteligente y sobre todo rapidísima..!!! de Jordi por tu paciencia y por siempre saber escuchar... de Sandrita puro corazón y esas ganas de aprender. Ahora tengo que hacer una mención especial a mi querido Alvarito, estos tres años me has enseñado mucho pero mucho, casi como un padre, sobre todo a tomar las cosas con calma y ver el lado amable de la vida... que hubiese hecho sin tus consejos, gracias por todo lo que he aprendido de tí sobre todo a ser un buen padre claro en mi caso madre... siempre puedes confiar y contar conmigo, te deseo todo lo mejor para tí y tu familia y porfavor sé “juicioso Alvarito”. Ahora acabo con mi familia eco-microbiana, mencionando a Cris, Pilita y Sandrita E., gracias Cris por todo el apoyo desde el primer día que llegué al lab y por esas buenas charlas y cafes compartidos... Pilita sabes que te tengo un cariño especial, eres una niña muy linda y te agradezco por enseñarme a ver el lado positivo de todo, gracias por toda la ayuda por escucharme, por aconsejarme y sobre todo por el cariño que siempre me has brindado, lo tendré siempre en consideración..... y mi querida Sandrita.. muchas gracias por lo momentos compartidos y por siempre estar presta a ayudar...

Ahora me toca mencionar y agradecer a mis vecinitas...en primer lugar a Marina, por toda la confianza depositada en mi persona , por esas largas conversas y sobre todo por los consejos de relajación y de poner en práctica la parte buena del cerebro y mantener apagada la parte mala.. eres una gran persona y espero siempre tener noticias tuyas... Gracias Esther por la acogida desde mi llegada, siempre me sentí muy en confianza contigo, te agradezco por esos ánimos, ese positivismo para conseguir las cosas y como olvidar toda la ayuda brindada cuando siempre la necesitaba, muchas gracias doctora. Silvia, ahora que ya eres madre y doctora, debes estar como loca con Quin pero al lado de Luisito seguro que felices, les agradezco por los bonitos ratos que hemos pasado juntos, los cafes, las cervecitas compartidas en la Vila...!!! no las olvidaré nunca. A pesar que estuviste un año con nosotros dejame decirte que eres una personita genial, gracias Hasier por ser tan espontáneo, simplemente tan tú, no cambies niño llegarás muy pero muy lejos con esa forma de ser. Llegaste al final querida Estelita pero te agradezco por los días compartidos, tú siempre presta a ayudar y eso sí que lo considero un montón, te deseo todo lo mejor y a seguir luchando con las células y con los ratoncitos, mucha suerteee...!!!

No puedo dejar de lado a las diferentes personas del departamento que de una u otra manera me han hecho sentir bien en esta larga estancia por la UAB, con toda sinceridad les digo, un simple como estás, que tal te ha ido?, para alguien extranjero y alejado de su lugar es suficiente, sobra y basta.... muchas gracias Nuria Gaju, Olga Sanchez, Jordi Mas, las dos Nurias de Jordi, Andreita, Maira, Susana C., Paula, Susana E., Joan, las Lauras, Tamara, Neus, Isidre, Toni V., Esther V., ahhh Yolanda, Teresa y Sandrita gracias por su amistad y ayuda en la preparación de las prácticas. Conchi, Julia, María José, Mayte gracias por todo su ayuda con todas las gestiones a lo largo de estos 4 años... espero no olvidarme

de nadie y si es así siento y pido disculpas pero es que estoy tan emocionada con lo que estoy escribiendo que a veces me nublo....

Mi segunda casa después del lab, el servicio de Microscopía, quiero agradecer el acogimiento durante este tiempo, esos días de confocal de 8 horas ininterrumpidas puffff....!!! pero bueno han servido y mucho para sacar esta tesis, agradecer a Mónica, Nuria y Elena “las confocaleras” que me han ayudado mucho en la realización de mi trabajo... les agradezco mucho chicas por toda la ayuda... además a la gente de la parte electrónica (SEM y TEM) gracias por todos sus aportes y recomendaciones...tengo que agradecer especialmente a mi querido Alex, infinitas gracias por todos los gratos momentos que me has hecho vivir, de verdad que siempre los llevaré en mi mente y en mi corazón, gracias por siempre aconsejarme, oirme y acompañarme... sobre todo en el gym (step...) jijiji si que juntos la hemos pasado bien ehheh... apapuchones para tí mi querido chipiron.

Nunca podría olvidarme de mis queridos amigos de Perú, que me hubiese hecho sinceramente sin ustedes... primero comenzar con mis amigas del cole, de toda la vida de verdad... a ustedes les debo mucho, a mi flaquita Milita, Kathy U, Kathi A, Antuane, Maritza P., Luciana, Claudita, Susan, Maritza A., Rosa Luz, Diana, Liz, Zobeida, Sandrita gracias por siempre estar conmigo a pesar de la distancia.. decirles que las quiero de acá al infinito.... mis queridos amigos de la universidad, doy gracias a Dios por haberlos conocido son tan importantes en mi vida, en primer lugar Karito gracias amiga por siempre estar pendiente de mí y de mi familia sabes que te quiero mucho, hago extensivo mi cariño para el principito Erik y para Nino...de mi querido Geo hay amigo mío decirte que te adoro...!!! siempre has estado ahí cuando te he requerido a pesar de estar tan lejos, eso nunca lo olvido amigo... Gracias queridos Franklin, Liz, Giselle, Paola y José son realmente geniales y sin ustedes realmente mi vida no sería completa gracias a todos ustedes de verdad.... A mis queridos “cholitos” Cesar, Daniel, Juancito decirles que me siento afortunada por su amistad y les agradezco por estar ahí siempre conmigo... A mis amigos y compañeros del INEN, a mi ex-jefe German, lo adoro doctorcito y usted lo sabe, a la Sra. Florcita, como una madre para mí, a Toñita, Sandrita, César, Leito gracias por tantos buenos ratos compartidos. A mis amigos que están también en cada momento por acá conmigo, gracias Romina por ser como una hermana para mí, gracias Santi y Bea por su amistad, la considero mucho. Finalmente, Tengo que agradecerte Giu con una mención honrosa como te lo dije, gracias por ser como un hermano conmigo por quererme tanto y por haberme diseñado la portada de esta tesis, te lo agradezco de todo corazón y decirte que te quiero mogollón....

A mi familia en general, primero los de acá de Barcelona, gracias Gloria, Lulu, Charo, Kiko, Lore, Jolis, José por hacerme la estancia acá mucho más fácil, por siempre ayudarme y quererme... los quiero mucho...!!! también a mi familia que está en Perú, agradezco todas sus muestras de cariño.. en especial a mis primos Ceci, Grace, Maju, Nonoy, Sisi, Lady, Leddy, Magaly, Brian, Melisa, Renzo, Ray, Pame, Roni... gracias a ustedes por siempre estar en constante comunicación conmigo, lo extraño un montón.. a mis suegros Jorge y Vilma y a mis cuñados gracias por todo el apoyo y cariño... finalmente a mis dos ahijados Enzo y Marxia, los adoro y ya saben que siempre podrán contar conmigo.

Llegando casi al final de mis agradecimientos, tengo que mencionar especialmente a mi madre y padre, les agradezco toda la confianza depositada en mí, gracias papitos por estar siempre pendientes de mí y sobre todo por quererme tanto... gracias a ustedes estoy donde estoy.. decirles que los quiero mucho y que son un ejemplo a seguir para mí... y a tí hermanito querido decirte que te adoro, que eres genial que siempre estas ahí conmigo en las buenas y en las malas así como yo estoy contigo, los amo...

Ahora me toca mencionar a los dos hombres que están en todo momento conmigo, decirles que los amo y que mi vida sin ustedes pues ya no tiene sentido, que cada día me hacen tan feliz y dichosa... ustedes han seguido junto a mí la escritura de esta tesis... primero tú mi pequeño principito cuando redactaba esta tesis estabas dentro de mí y te agradezco pedacito de mi vida por haberme hecho el embarazo tan llevadero y poder haber escrito la tesis de una manera tranquila y satisfactoria, ahora estás conmigo y te tengo en cada momento entre mis brazos, y dejame decirte que eres mi vida que te amo con todas mis fuerzas y que todo lo que hago y haré será para que tú te sientas orgulloso de tu madre, te amo Ikercito... y a tí mi amor Erik te agradezco lo gran hombre y “padrazo” que eres, nosé que hubiese hecho sin tí a mi lado gracias por tantos momentos de amor, comprensión y de paciencia... te amo mi querido esposo y quiero estar toda mi vida a tu lado....

Finalmente, nuevamente tengo que agradecerte Diosito por haberme dado salud y felicidad todo este tiempo y por haberme dado las fuerzas y el reconforto necesario para sacar este objetivo adelante... sabes que en tí siempre confío y dejo en tus manos lo que venga para mí en un futuro. Muchas gracias por todo.

## Summary

This study determines the metal bioreparation capacity of *Micrococcus luteus* DE2008, an heterotrophic microorganism isolated directly from the microbial mats of the Ebro delta, as well of that of *Chroococcus* sp. PCC 9106, a cyanobacterium from the Pasteur Culture Collection, which are abundant in these mats. To do this, high resolution microscopic techniques (optical and electron), as well as biochemical and chemical methods have been used in order to select microorganisms with the ability to biorepair contaminated natural environments.

The above two microorganisms were selected for this work, since from the previous works carried out by our group, it is known that they have a high tolerance-resistance to heavy metals, an ability to capture them, and they also grow easily in laboratory cultures.

In this work, the metals determined for the selection of microorganisms with biorepair potential were: lead (Pb (II)), copper (Cu (II)), and trivalent chromium (Cr (III)), since the three of them have been detected in the Ebro river.

A confocal laser scanning microscope connected to a spectrofluorimetric detector (CLSM-  $\lambda$ Scan) was used to determine the *in vivo* effect of chromium on the photosynthetic pigments of *Chroococcus* sp. PCC 9106. The results showed that *Chroococcus* sp. PCC 9106 is tolerant-resistant up to metal dose of 0.26 mM of Cr (III).

In order to determine the changes in the total biomass and in the viability of *Micrococcus luteus* DE2008 and *Chroococcus* sp. PCC 9106, firstly, a method was optimised that combined the use of fluorochromes, the confocal scanning microscope, and an image analysis program (FLU-CLSM-IA). The

results showed that it was an effective, rapid and reliable method for evaluating the biomass and viability of both the heterotrophic and phototrophic microorganisms. This method was then applied to determine the effect of the metals on these two microorganisms. The results demonstrated that the total biomass of *M. luteus* DE2008 had a higher resistance to lead (1.5 mM) than to copper (0.1 mM), and the viability of this microorganism was seen to be affected from a concentration of 0.5 mM for Pb (II) as well as for Cu (II). On the other hand, the minimum concentration of Cr (III) that had a significant effect on the total biomass and on the viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 was 1.0 and 0.1 mM, respectively.

In order to determine the external and internal sequestration of the metal, a scanning electron microscope (SEM), a transmission electron microscope (TEM), and an energy-dispersive X-ray (EDX) spectrometer coupled to these two microscopes were used. The results showed that *M. luteus* DE2008 is only able to capture Pb (II) and Cu (II) extracellularly, whilst *Chroococcus* sp. PCC 9106 captured Cr (III) extra and intracellularly.

Finally, inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) was used to determine the uptake efficiency of the two microorganisms with the different heavy metals. The calculation of the uptake efficiency was based on the percentage of bioabsorption (%) and on the specific metal bio-uptake capacity ( $q$ ). The results showed that *M. luteus* DE2008 had a higher affinity for Pb (II) than for Cu (II), since the percentage of bioabsorption (%) and the specific uptake capacity ( $q$ ) were higher for lead in both cases. On the other hand, in the case of *Chroococcus* sp. PCC 9106, according to the kinetic study, the time required for the uptake of Cr (III) to reach equilibrium (time in which the

uptake capacity is maximum) was 72 hours, the ( $q$ ) being in this period of time 54 mg/g with a percentage of bioabsorption of 62%.

Taking into account all the results obtained, it can be concluded that *M. luteus* DE2008 and *Chroococcus* sp. PCC 9106 could be considered to bioremediate environments contaminated by metals. This due to the fulfilling of the following characteristics: they are native microorganisms; easy to culture under laboratory conditions, capable of uptaking metals extra and/or intracellularly, and finally, have a high tolerance and a high affinity in the uptake of metals.

## Resumen

En este trabajo se ha determinado la capacidad bioreparadora de metales de *Micrococcus luteus* DE2008, un microorganismo heterótrofo aislado directamente de los tapetes microbianos del delta del Ebro, y de *Chroococcus* sp. PCC 9106, una cianobacteria procedente de la Colección de Cultivos Pasteur, la cual es también abundante en dichos tapetes. Para ello se han utilizado técnicas microscópicas de alta resolución (óptica y electrónica) y métodos de análisis bioquímicos y químicos con el fin de seleccionar microorganismos con capacidad para bioreparar ambientes naturales contaminados.

Para este objetivo, se han seleccionado estos dos microorganismos ya que por trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se conoce que presentan una alta tolerancia-resistencia a los metales pesados; capacidad para captarlos y además crecen fácilmente en cultivos de laboratorio.

En este trabajo, los metales ensayados para la selección de microorganismos con potencial bioreparador, han sido: el plomo (Pb (II)), el cobre (Cu (II)) y el cromo trivalente (Cr (III)), ya que los tres se han detectado en el río Ebro y tienen un alto grado de toxicidad.

Con el objetivo de determinar el efecto *in vivo* del cromo sobre los pigmentos fotosintéticos de *Chroococcus* sp. PCC 9106, se ha utilizado la microscopía láser confocal acoplada a un detector espectrofluorométrico (CLSM-  $\lambda$ Scan). Los resultados indican que *Chroococcus* sp. PCC 9106 es tolerante-resistente hasta una dosis de metal de 0.26 mM de Cr (III).

Para determinar los cambios en la biomasa total y en la viabilidad de *Micrococcus luteus* DE2008 y de *Chroococcus* sp. PCC 9106, en primer lugar se ha optimizado un método que combina el uso de fluorocromos, la microscopía láser confocal y un programa de análisis de imagen (FLU-CLSM-IA). Los resultados muestran que es un método eficaz, rápido y fiable para evaluar la biomasa y la viabilidad de los microorganismos tanto heterótrofos como fotótrofos. En segundo lugar se ha aplicado éste método para determinar el efecto de los metales sobre estos dos microorganismos y los resultados demuestran que *M. luteus* DE2008 presenta a nivel de biomasa total, una mayor resistencia al plomo (1.5 mM) que al cobre (0.1 mM) y que la viabilidad de este microorganismo se ve afectada a partir de una concentración de 0.5 mM tanto para el Pb (II) como para el Cu (II). Por otro lado, la concentración mínima de Cr (III) que tiene un efecto significativo en la biomasa total y en la viabilidad de *Chroococcus* sp. PCC 9106 es de 1.0 y 0.1 mM, respectivamente.

Con el fin de determinar la biocaptación externa e interna del metal, 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 indican que, *M. luteus* DE2008 es únicamente capaz de captar Pb (II) y Cu (II) extracelularmente, mientras que *Chroococcus* sp. PCC 9106 capta el Cr (III) extra e intracelularmente.

Finalmente para determinar la eficiencia de captación de los microorganismos ensayados a los diferentes metales pesados se ha utilizado un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). El cálculo de la eficiencia de biocaptación se basa en el porcentaje de



bioabsorción (%) y en la capacidad específica de biocaptación de metales ( $q$ ). Los resultados demuestran que *M. luteus* DE2008 tiene una mayor afinidad por el Pb (II) que por el Cu (II), ya que el porcentaje de bioabsorción (%) y la capacidad específica de biocaptación ( $q$ ) es mayor en ambos casos para el plomo. Por otra parte, en el caso de *Chroococcus* sp. PCC 9106, según el estudio cinético, el tiempo requerido para que la biocaptación del Cr (III) llegue al equilibrio (tiempo en el que la capacidad de captación es máxima) es de 72h, siendo la  $q$  en este período de tiempo de 54 mg/g con un porcentaje de bioabsorción del 62%.

Considerando todos los resultados obtenidos, se puede concluir que *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 podrían ser considerados como buenos bioreparadores de ambientes contaminados por metales. Ello es debido a que cumplen las siguientes características: son microorganismos autóctonos; fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio; capaces de captar los metales extra y/o intracelularmente y finalmente presentan una alta tolerancia y una alta afinidad en la biocaptación de los metales.

## Indice

---

<b>1. Introducción</b>	25
<b>2. Material y Métodos</b>	35
2.1. Caracterización y lugar de muestreo de los tapetes microbianos del delta del Ebro.	35
2.2. Microorganismos y condiciones de cultivo.	37
2.3. Preparación de las soluciones de metales y condiciones de contaminación de los cultivos.	38
2.4. Métodos utilizados para determinar el efecto de los metales en <i>Micrococcus luteus</i> DE2008 y <i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106.	40
2.4.1. Concentración mínima inhibitoria.	41
2.4.2. Recuento en placa.	42
2.4.3. Técnicas de microscopía de alta resolución.	43
2.4.3.1. Microscopía láser confocal (CLSM).	43
2.4.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).	45
2.4.3.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	45
2.4.3.4. Microanálisis por espectrometría de energía dispersiva de rayos X.	46
2.4.4. Técnicas bioquímicas para valorar la composición y producción de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS).	48
2.4.4.1. Extracción del EPS.	48
2.4.4.2. Caracterización bioquímica del EPS.	49
2.4.4.2.1. Método de Bradford. Determinación de la concentración de proteínas.	49
2.4.4.2.2. Método de Dubois. Determinación de la concentración de carbohidratos.	50
2.4.4.2.3. Método de Blumenkrantz y Asboe-Handsen. Determinación de la concentración de ácidos urónicos.	50

2.4.4.2.4. Método de Burton. Determinación de la concentración de DNA.	51
2.4.5. Eficiencia de captación de los metales pesados por los microorganismos <i>Micrococcus luteus</i> DE2008 y <i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106 utilizando el espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente ( ICP-OES).	51
2.5. Análisis estadístico	51
<b>3. Resultados</b>	<b>53</b>
3.1 Optimización metodológica.	54
3.1.1 Método que combina el uso de fluorocromos, la microscopía láser confocal y un programa de análisis de imagen <i>Image J</i> (FLU-CLSM-IA): Estimación de la biomasa y de la viabilidad.	54
3.1.2. Método para determinar la eficiencia de biocaptación de metales pesados: Utilización del espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).	60
3.2. Resultados presentados como artículos	65
3.2.1. Viability and biomass of <i>Micrococcus luteus</i> DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochromes and CLSM-Image Analysis.	66
3.2.2. Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant <i>Micrococcus luteus</i> DE2008.	89
3.3. Resultados complementarios: Toxicidad y captación de cromo (III) en la cianobacteria <i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106.	115
<b>4. Discusión</b>	<b>117</b>
<b>5. Conclusiones finales</b>	<b>127</b>
<b>6. Artículos publicados</b>	<b>133</b>

<b>Anexo I:</b> Toxicity and sequestration of chromium (III) on the cyanobacterium <i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106. Microscopical and kinetics studies (Artículo enviado para su aceptación).	147
<b>Anexo II:</b> Medios de cultivo	179
<b>Referencias</b>	183



## **Estructura de la Tesis**

**Introducción:** En este capítulo se remarca la importancia de la contaminación por metales pesados en ambientes naturales, las estrategias para bioremediarlos y la capacidad de algunos microorganismos de captar metales. También se describe el ambiente natural estudiado: los tapetes microbianos del delta del Ebro y la importancia de mantener este ecosistema, valorado como Parque Natural, preservado de la contaminación agrícola e industrial. Finalmente se describen los objetivos de la tesis centrados de manera global en la búsqueda de microorganismos bioreparadores de metales pesados, procedentes de cultivos de colección y directamente del ambiente natural.

**Material y métodos:** En este capítulo se describen los microorganismos estudiados, las diferentes metodologías empleadas para la consecución de los objetivos propuestos y los protocolos de preparación de los distintos medios de cultivo y de las soluciones metálicas utilizadas.

**Resultados:** El capítulo de Resultados comprende una primera sección dedicada a la optimización del método FLU-CLSM-IA, para su aplicación a *M. luteus* DE2008, un microorganismo heterótrofo y por tanto sin autofluorescencia, y a *Chroococcus* sp. PCC 9106, un microorganismo fotótrofo que presenta autofluorescencia. Del mismo modo se describe la optimización del protocolo basado en la utilización del ICP-OES, en ambos microorganismos para determinar la eficiencia de captación de los metales. En una segunda sección, se presentan los resultados obtenidos en dos apartados (3.2.1; 3.2.2) de acuerdo con los objetivos expuestos en este trabajo experimental. Estos

apartados se corresponden con los dos artículos presentados en esta tesis y que ya han sido publicados. Finalmente, en una tercera sección se presenta un resumen de los resultados correspondientes a un tercer artículo, que está pendiente de aceptación, cuyo texto se incluye en el Anexo I de esta tesis doctoral.

**Artículo 1: Viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochromes and CLSM - Image Analysis.**

En el presente apartado se describe la optimización y modificación del método basado en la microscopía láser confocal y en el análisis de imagen (CLSM-IA) introduciendo el uso de los fluorocromos: Hoechst 33342 y SYTOX Green (FLU-CLSM-IA) para determinar la biomasa y la viabilidad de *Micrococcus luteus* DE2008, un microorganismo heterótrofo aislado de los tapetes microbianos del delta del Ebro. Además este método se aplicó, por primera vez, para evaluar el efecto de la salinidad (0, 10, 35, 75, y 100 ‰) sobre estos parámetros biológicos en *M. luteus* DE2008. Este trabajo se ha publicado en la revista *Current Microbiology*.

**Artículo 2: Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008**

En este apartado se ha aplicado la metodología FLU-CLSM-IA para determinar la biomasa y la viabilidad de *Micrococcus luteus* DE2008 cuando está expuesto a diferentes concentraciones y tipos de metal. Además, se han optimizado y aplicado métodos bioquímicos y químicos para determinar su potencial

bioreparador. Este trabajo se ha publicado en la revista *Bioresource Technology*.

**Discusión General:** En este capítulo se comparan mediante tablas las características que se han evaluado tanto de *M. luteus* DE2008 como de *Chroococcus* sp. PCC 9106, y al mismo tiempo, se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo con los obtenidos por otros autores. Cada una de las tablas que se presentan en éste capítulo, se corresponden con cada uno de los objetivos señalados.

**Conclusiones:** Finalmente, se citan las conclusiones finales del presente trabajo.





## 1. Introducción

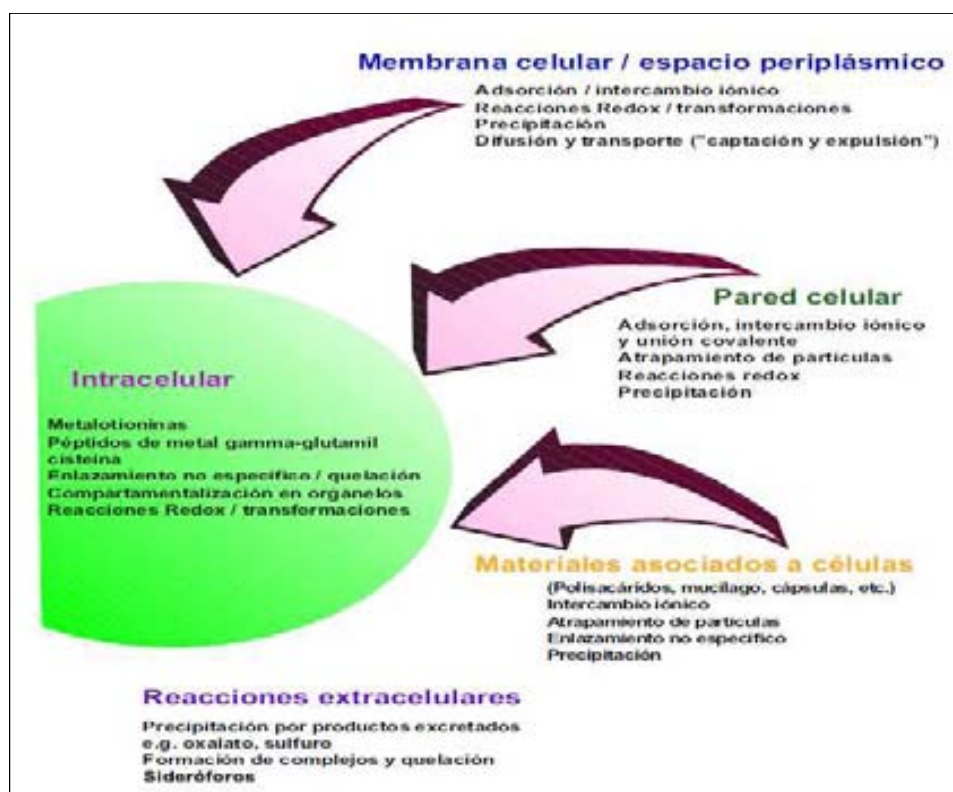
En la actualidad, la contaminación por metales pesados es un grave problema ambiental, que se genera principalmente por la actividad agrícola e industrial. Los metales pesados constituyen un grupo de aproximadamente 40 elementos de la tabla periódica, algunos de ellos son esenciales para la vida, otros son altamente tóxicos y un tercer grupo que son esenciales a pequeñas dosis y tóxicos a elevadas dosis. Los metales no esenciales, a diferencia de algunas sustancias orgánicas, presentan una elevada toxicidad, difícil biodegradabilidad y su acumulación en los tejidos de animales y plantas y en los ecosistemas (principalmente en los sedimentos) puede causar, por un lado lesiones graves en los seres vivos y por otro lado importantes problemas ambientales (Bahadir et al., 2007; Pérez-Marín et al., 2008; Naja & Volesky, 2009).

En las últimas décadas, la búsqueda de estrategias que puedan remediar estos ambientes contaminados ha sido incesable. Las estrategias que vienen aplicándose convencionalmente implican procesos físico-químicos y son: la filtración, la precipitación química, el tratamiento electroquímico, la oxidación/reducción, el intercambio iónico y la ósmosis inversa, entre otras (Bai et al., 2008; Xiao et al., 2010). Sin embargo éstas técnicas son poco eficientes, sobre todo cuando la concentración de iones metálicos en soluciones acuosas se encuentra entre 1-100 mg/L (Lim et al., 2003). Además son excesivamente costosas, operacionalmente muy laboriosas, y en ocasiones introducen nuevas contaminaciones en el medio ambiente (Chen et al., 2008; Tang et al., 2008). Por este motivo, antes de aplicar una estrategia determinada de las citadas anteriormente en un ambiente contaminado y para que ésta sea altamente

eficaz se deben considerar diferentes aspectos como: el conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del lugar, la solubilidad y la especiación de los metales pesados y los procesos de inmovilización y de dispersión de los metales en la zona a procesar.

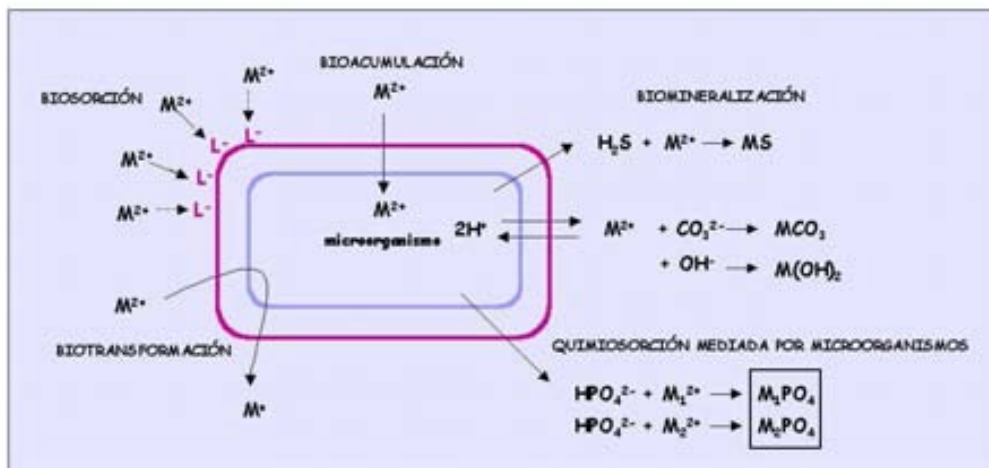
Recientemente, la aplicación de diferentes métodos para el control y la reparación de ambientes contaminados por metales pesados ha recibido un gran interés especialmente la bioremediación la cual implica el uso de organismos vivos o productos derivados, para reducir, eliminar o inmovilizar contaminantes ambientales producidos como resultado de la acumulación de residuos químicos muy tóxicos (Gadd, 2000; Malik, 2004; Radhika et al., 2006; Farhadian et al., 2008). La bioremediación mediante el uso de microorganismos es una alternativa a las estrategias convencionales usadas (Bai et al., 2008), además tiene la ventaja de poderse aplicar tanto *in situ* como *ex situ* (Vijayaraghavan & Yun, 2008). Sin embargo sigue todavía en estudio la mejora de las eficiencias de captación de metales por parte de los microorganismos y su aplicación práctica en el medio ambiente.

La capacidad de algunos microorganismos de unir metales y convertirlos en algunos casos en especies menos tóxicas (Congeevaram et al., 2007; Guo et al., 2010) está ampliamente estudiada, siendo muy diversos los procesos por los cuales dichos microorganismos interactúan con los metales tóxicos, como se puede observar en la Fig. 1.1.



**Fig. 1.1.** Procesos realizados por los microorganismos que contribuyen a la captación de metales, según Gadd & White, 1993.

Además, algunos microorganismos son resistentes y otros tolerantes a los metales. Los microorganismos resistentes presentan mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos muchas veces por la presencia del metal (Silver & Misra, 1988), y en cambio los microorganismos tolerantes son aquellos, a los que la presencia del metal no afecta a su crecimiento. La resistencia o tolerancia experimentada por dichos microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos, tales como: la bioadsorción, la bioacumulación, la biomineralización, la biotransformación y la quimioadsorción (Fig. 1.2).



**Fig. 1.2.** Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos, según Lovley, 2000.

El delta del Ebro (Tarragona, España), un ecosistema de gran riqueza ecológica y agrícola, está situado en la desembocadura del río Ebro, el cuál aporta una gran cantidad de sedimentos que crean una superficie de más de 320 km<sup>2</sup>, y en la que se forman distintos tipos de ecosistemas como los tapetes microbianos, las marismas, las dunas y las playas de arena.

Una amplia zona del delta del Ebro está cubierta por tapetes microbianos, los cuáles son ecosistemas litorales bentónicos estratificados que se desarrollan en las interfases agua-sedimento. Los tapetes microbianos están formados por poblaciones de distintos microorganismos que se distribuyen verticalmente y a nivel de microescala en capas de distintos colores. Estas poblaciones se disponen en función de los parámetros ambientales, principalmente la luz, la temperatura, y la presencia del oxígeno y del sulfhídrico. Las cianobacterias principalmente y también las microalgas constituyen la capa verde superficial, mientras que las bacterias rojas del azufre forman la capa roja. Estas coloraciones son debidas a los distintos

pigmentos fotosintéticos que poseen todos estos microorganismos. No obstante las bacterias heterótrofas principalmente las quimiolitótrofas y las bacterias reductoras de sulfato juegan también un papel muy importante en estos ecosistemas. Estas últimas son las responsables del color negrozco del sedimento, debido a los sulfuros metálicos, principalmente de hierro formados a partir de la combinación del  $H_2S$  producido por las bacterias reductoras del sulfato con los metales presentes en el sedimento (Esteve et al., 1992; Guerrero et al., 1999).

Los tapetes microbianos en general son además ambientes muy limitantes para el crecimiento de los microorganismos, debido a que están sujetos a grandes fluctuaciones principalmente de la: intensidad de la luz, temperatura y disponibilidad de agua.

Entre los microorganismos que habitan estos ecosistemas, las cianobacterias son las más abundantes y como se ha dicho anteriormente se encuentran principalmente en las capas superiores (capa verde) formando una compleja red y por lo tanto ayudando a la estabilización de los sedimentos deltaicos. Las cianobacterias son bacterias fotótrofas oxigénicas, su principal pigmento fotosintético es la clorofila *a* (*cl a*), al igual que en las algas y en las plantas, y son capaces de fijar el  $CO_2$  por lo que desempeñan un importante papel como productores primarios en estos ecosistemas. Las cianobacterias son un grupo de microorganismos muy diverso, ampliamente distribuido y con una gran capacidad para adaptarse a condiciones ambientales extremas para la vida.

Una amplia zona de dicho delta se ha visto afectada por la contaminación por metales pesados entre ellos el plomo, el cobre y el cromo,

como consecuencia de la cacería de aves, en el caso del plomo (Mateo et al., 1997), y de los contaminantes que introduce la agricultura y la industria de la zona, en el caso del cobre y del cromo (Sánchez-Chardi et al., 2007; Bouza-Deaño et al., 2008). Del mismo modo, los tapetes microbianos de esta región se han visto afectados también por la contaminación por metales, por este motivo los microorganismos que viven en ellos (fotótrofos y heterótrofos) han sido estudiados como importantes detoxificadores o bioindicadores de la contaminación por hidrocarburos y más recientemente por metales pesados (Fourçans et al., 2004; Solé et al., 2009; Burnat et al., 2009; Maldonado et al., 2011).

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha aislado de los tapetes microbianos del delta del Ebro dos consorcios de microorganismos, el primero principalmente formado por una cianobacteria, *Microcoleus* sp. DE2005 y diferentes bacterias heterótrofas (Diestra et al., 2005). Entre éstas se han aislado e identificado *Micrococcus luteus* DE2008 (Maldonado et al., 2010a) y *Paracoccus* sp. DE2007 (Baratelli et al., 2011). El segundo consorcio, está formado por una microalga y diferentes bacterias heterótrofas (Maldonado et al., 2010b). En la tabla 1.1 se indican los microorganismos utilizados por nuestro grupo de trabajo y su procedencia para determinar el efecto de los metales pesados en ellos.

Para los estudios que se indican en dicha tabla, se optimizaron diferentes técnicas de microscopía, tanto óptica como electrónica. Por un lado, se desarrolló una metodología, la cual con el uso del microscopio láser confocal (CLSM) y un programa de análisis de imagen (IA) permitió analizar la diversidad de las cianobacterias presentes en diferentes tapetes microbianos

así como determinar la biomasa que ocupan tales microorganismos en dichos ecosistemas (Solé et al., 2009). Posteriormente en el presente trabajo esta metodología fue modificada para poder determinar la biomasa y la viabilidad tanto de microorganismos heterótrofos como fotótrofos (Puyen et al., 2012a; 2012b; Puyen et al., enviado para aceptación). De la misma manera, con la utilización de una función específica del CLSM, el  $\lambda$ Scan; se determinó el efecto *in vivo* de diferentes metales en microorganismos fotótrofos (para establecer su capacidad de tolerancia-resistencia frente a cada metal) (Burnat et al., 2010; Maldonado et al., 2011).

Al mismo tiempo y mediante la utilización de la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), ambas acopladas a un detector de energía dispersiva de rayos X (EDX) se pudo determinar la capacidad de los microorganismos (heterótrofos y fotótrofos) de captar los metales extra y/o intracelularmente.

**Tabla 1.1.** Microorganismos y su procedencia utilizados para determinar el efecto de los metales pesados en ellos y su capacidad para captarlos.

Microorganismos	Ambiente natural	Cultivos de laboratorio	Referencia
<i>Paracoccus</i> sp. DE2007	✓	-	Baratelli et al., 2011 (Pb)/*
<i>Micrococcus luteus</i> DE2008	✓	-	Maldonado et al., 2010a
<i>Microcoleus</i> sp. DE2005	✓	-	Burnat et al., 2010/ Seder-Colomina et al., 2013 (Cu).
Microalga DE2009	✓	-	Maldonado et al., 2010b (Pb)/ Seder-Colomina et al., 2013 (Cu).
<i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106	-	✓	Maldonado et al., 2011 (Pb)/ Seder-Colomina et al., 2013 (Cu)
<i>Spirulina</i> sp. PCC 6313	-	✓	Maldonado et al., 2011 (Pb)/ Seder-Colomina et al., 2013 (Cu)
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 7515	-	✓	Maldonado et al., 2011 (Pb)/*

\* Los resultados correspondientes al cobre no han sido concluyentes.



Además, en el presente trabajo, se ha analizado el efecto del cromo sobre *Chroococcus* sp. PCC 9106 y la eficiencia de esta cianobacteria para captarlo. Este metal que también se encuentra como contaminante en el delta del Ebro es altamente tóxico para los seres vivos. Los estados de oxidación del cromo comúnmente encontrados en los ambientes contaminados son el cromo trivalente (III) y el cromo hexavalente (VI) (Evangelou, 1998, Vignati et al., 2010). Por un lado, el Cr (VI) es la forma del metal más tóxica (Shanket et al., 2005) debido principalmente a su asociación con el oxígeno para formar cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ). Sin embargo en presencia de materia orgánica, éste es reducido a Cr (III), y de manera aún más rápida si el ambiente es ácido. Por otro lado, el Cr (III) es el estado más estable de este metal que se encuentra en la naturaleza y es considerado un elemento traza esencial (con funciones biológicas conocidas) para todos los seres vivos incluidos los microorganismos. Sin embargo a elevadas dosis, puede ser un importante contaminante con efectos tóxicos en los hábitats terrestres y acuáticos (Pereira et al., 2005). Los niveles de este metal en el medio natural han incrementado también como resultado de las diferentes actividades humanas (la producción textil, la minería, la ganadería, la conservación de la madera, etc) que depositan, sus productos de degradación y subproductos generados, en los ambientes acuáticos naturales conduciendo a graves problemas ambientales y de salud pública (Someda et al., 2005; Anjana et al., 2007; Cheung & Gu, 2007; Srivastata et al., 2007).

Aunque existe una amplia información sobre la contaminación por metales pesados en ambientes naturales, así como de las estrategias que se utilizan para mitigar este problema, sigue siendo de gran interés seleccionar

microorganismos de ambientes naturales con capacidad para captar metales y poder bioreparar posteriormente dichos ambientes. Puesto que en el ambiente natural coexisten microorganismos fotótrofos con heterótrofos incluso formando consorcios estables, ha sido necesario, en el caso de la microscopía láser confocal optimizar métodos capaces de diferenciarlos entre ellos.

Por este motivo, **el objetivo general de este trabajo ha sido determinar la capacidad bioreparadora de *Micrococcus luteus* DE2008 (un microorganismo heterótrofo aislado directamente de los tapetes microbianos del delta del Ebro) y de *Chroococcus* sp. PCC 9106 (una cianobacteria procedente de un cultivo de la colección de cultivos Pasteur) la cual es abundante en dichos tapetes.**

Además, se conoce por los trabajos previos realizados que se trata de dos microorganismos, que presentan: i) una alta tolerancia-resistencia a los metales pesados; ii) capacidad para captarlos y iii) un fácil crecimiento en cultivos de laboratorio.

Por otra parte, los metales ensayados han sido: el plomo, el cobre y el cromo trivalente, ya que los tres se han detectado en el río Ebro y tienen un alto grado de toxicidad.

Las características que se han tomado como determinantes para considerar que un microorganismo pueda tener un potencial bioreparador en los ambientes naturales contaminados y que ha dado lugar a los objetivos del presente trabajo han sido las siguientes: **1.** presencia en los ambientes contaminados; **2.** tolerancia-resistencia a los metales; **3.** efecto de estos en la biomasa total y en la viabilidad de los microorganismos ensayados; **4.** capacidad para captarlos y **5.** eficiencia en su captación.

Para ello en primer lugar se ha determinado el efecto de los metales sobre la biomasa total y sobre la viabilidad de cada uno de los microorganismos ensayados mediante el FLU-CLSM-IA (fluorocromos-microscopía láser confocal-análisis de imagen), y el efecto *in vivo* de estos sobre los pigmentos fotosintéticos de *Chroococcus* sp. PCC 9106 utilizando el CLSM-  $\lambda$ Scan. En segundo lugar, se ha analizado la capacidad de estos microorganismos para captar metales extra e intracelularmente mediante el SEM-EDX (energía dispersiva de rayos X acoplado al microscopio electrónico de barrido) y el TEM-EDX (energía dispersiva de rayos X acoplado al microscopio electrónico de transmisión). Finalmente se ha determinado la eficiencia de biocaptación utilizando el ICP-OES (espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente).

Además, de manera complementaria se han analizado los cambios bioquímicos a nivel de EPS (sustancias poliméricas extracelulares) de *M. luteus* DE2008 después de haber sido expuesto a diferentes concentraciones de plomo y cobre, y se ha obtenido también el recuento de células durmientes cuando este microorganismo se encuentra en presencia de metales.

El trabajo experimental se ha planteado como un estudio multidisciplinario, utilizando para ello: técnicas microscópicas de alta resolución (óptica y electrónica) y métodos de análisis bioquímicos y químicos.

## 2. Material y métodos

En este capítulo se describen los microorganismos, las metodologías y la preparación de las soluciones de los metales utilizados en este trabajo.

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

El delta del Ebro está situado en la costa noreste de la Península Ibérica (0°35'E - 0°56'E; 40°33'N - 40°47'N) al sur de Tarragona y en la desembocadura del río Ebro (Guerrero et al., 2002) (Fig. 2.1a).

En el delta del Ebro, los tapetes microbianos están localizados cerca de las Salinas de la Trinidad, en la Península de *Els Alfacs* y sometidos a periodos de inundación y desecación. La temperatura del agua que cubre estos tapetes suele oscilar entre 12 y 30°C, la conductividad entre 59 y 105 mS.cm<sup>-1</sup>, 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<sup>-2</sup> (Esteve et al., 1994; Wieland et al., 2003; Diestra et al., 2004; Fourçans et al., 2004) (Fig. 2.1b). En la Fig. 2.1c se observa su estructuración vertical en capas de distintos colores según las poblaciones microbianas predominantes.

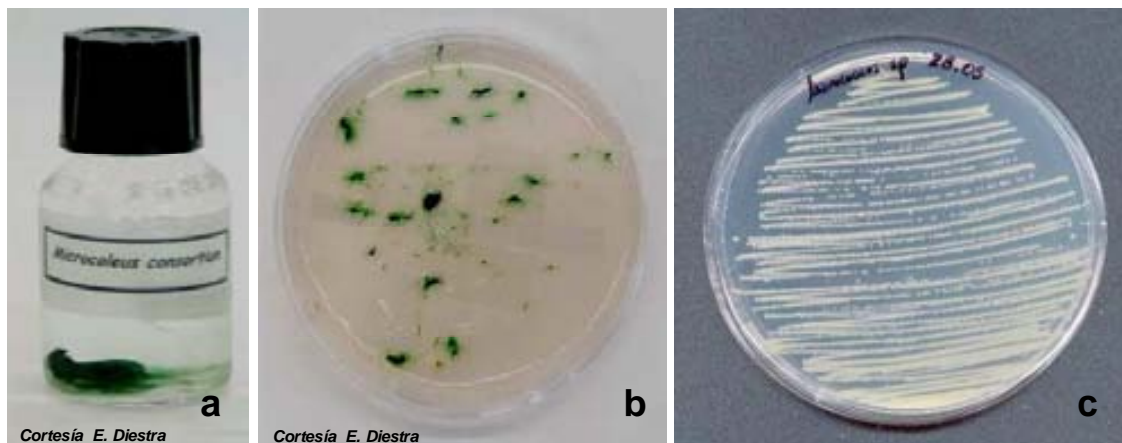


**Fig. 2.1.** Delta del Ebro (Tarragona – España). Localización (a); lugar de muestreo de los tapetes microbianos (b) y corte vertical de un tapete microbiano (c).

## 2.2. Microorganismos y condiciones de cultivo.

A continuación se describen los microorganismos utilizados en este trabajo así como sus condiciones de cultivo.

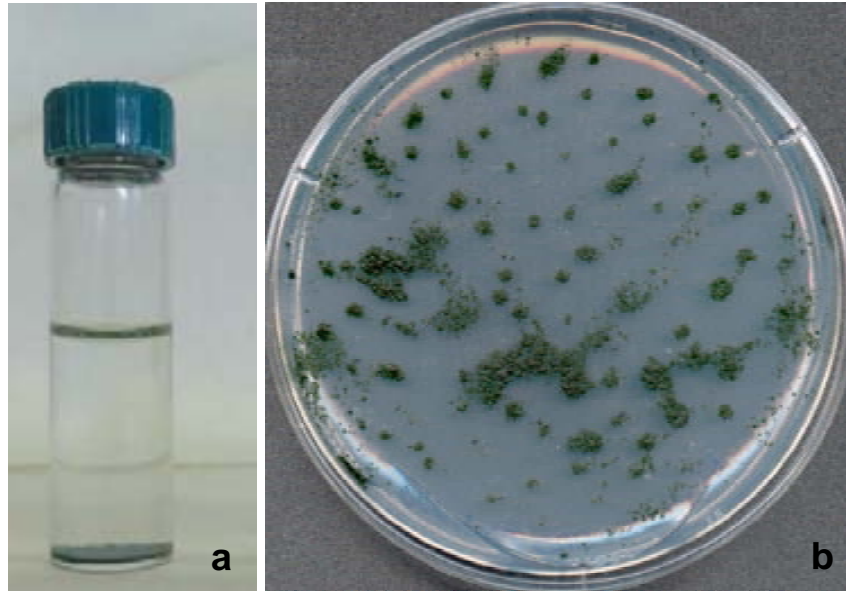
*M. luteus* DE2008, es un microorganismo heterótrofo aislado de un consorcio de microorganismos (*Microcoleus* sp. DE2005) (Fig. 2.2a y b) que a su vez procede de los tapetes microbianos del delta del Ebro (Maldonado et al., 2010a). Este microorganismo se cultivó en medio rico Luria-Bertani (LB) (sólido o líquido) a 27°C (Fig. 2.2c). La composición del medio LB se describe en el Anexo 1.



**Fig. 2.2.** Consorcio de *Microcoleus* sp. DE2005 crecido en medio Pfenning líquido (a) y en medio Pfenning sólido (b). *M. luteus* DE2008 crecido en medio LB sólido (c).

*Chroococcus* sp. PCC 9106, es un microorganismo fotótrofo obtenido de la Colección de Cultivos Pasteur de Cianobacterias (PCC). Esta cianobacteria de morfología cocoidal se seleccionó para este trabajo, debido a que es muy abundante en los tapetes microbianos del delta del Ebro.

*Chroococcus* sp. PCC 9106 se cultivó en el medio BG11 - ASNIII (1:1 v/v) (Rippka et al., 1979) (Fig. 2.3) y se incubó a 27°C y 15  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La composición del medio BG11 - ASNIII se describe en el Anexo I.



**Fig. 2.3.** *Chroococcus* sp. PCC 9106 crecido en medio BG11 - ASNIII líquido (a) y en medio BG11 - ASNIII sólido (b).

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

El cobre, el plomo y el cromo trivalente se seleccionaron para este estudio ya que se trata de tres metales contaminantes con un efecto ecotóxico importante sobre el medio ambiente descrito. El cobre y el cromo trivalente a pesar de ser metales esenciales con funciones biológicas conocidas (micronutrientes), en altas concentraciones tienen efectos tóxicos tanto en los animales como en las plantas, a diferencia del plomo que es un metal tóxico sin función biológica conocida.

Para este trabajo las soluciones iniciales de plomo, cobre y cromo se prepararon disolviendo cantidades exactas de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$

(Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) respectivamente en agua Mili-Q y se esterilizaron utilizando filtros de membrana de policarbonato de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (MILLEX). Las concentraciones de cada una de las soluciones iniciales de metal fueron: 50 mM Pb, 50 mM Cu y 5 mM Cr. A partir de estas 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.

#### **Micrococcus luteus DE2008:**

Para determinar el efecto del Pb (II) y del Cu (II) en la biomasa y en la viabilidad, en la eficiencia de biocaptación así como en los cambios en el EPS de *M. luteus* DE2008, cultivos de 12 h de crecimiento de este microorganismo en medio LB líquido (1 ml) se inocularon en 19 ml de medio LB líquido suplementado con diferentes concentraciones de plomo y cobre, respectivamente. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital (Aquatron) a 220 rpm durante 12 h a 27°C. Los cultivos sin metal se utilizaron como controles. El pH del medio se ajustó a 6.5 - 7, adicionando según cada caso 1 M NaOH o 1 M HCl. Las concentraciones de plomo y cobre utilizadas para estos experimentos fueron: 0, 0.1, 0.5, 1 y 1.5 mM de Pb (II) y Cu (II), respectivamente.



**Chroococcus sp. PCC 9106:**

Para determinar el efecto del Cr (III) sobre los pigmentos fotosintéticos, la biomasa y la viabilidad y la eficiencia de captación de *Chroococcus sp.* PCC 9106, 2.2 mg de precipitado obtenido de centrifugar un cultivo de esta cianobacteria a 8000 x g se agregaron a 5 ml de medio BG11 - ASNIII líquido suplementado con diferentes concentraciones de Cr (III). Los cultivos se incubaron a 27°C y 15  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante un período de 9 días. Los cultivos sin metal se utilizaron como controles. El pH del medio se ajustó a 6.5 – 7, adicionando según cada caso 1 M NaOH o 1 M HCl. Las concentraciones de cromo trivalente utilizadas para estos experimentos fueron: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30, 0.5, 0.75, 1 y 1.5 mM de Cr (III).

**2.4. Métodos utilizados para determinar el efecto de los metales en *Micrococcus luteus* DE2008 y *Chroococcus sp.* PCC 9106.**

La concentración mínima inhibitoria, las curvas de crecimiento así como la estimación de la biomasa y la viabilidad se utilizaron para determinar el efecto del Pb (II) y del Cu (II) en *M. luteus* DE2008 mientras que el CLSM-*λscan*, la concentración mínima inhibitoria y la estimación de la biomasa y la viabilidad se utilizaron para determinar el efecto del Cr (III) en *Chroococcus sp.* PCC 9106.

A continuación se describen cada uno de los métodos utilizados a excepción de los relacionados con la estimación de la biomasa y viabilidad que se tratan en el apartado Resultados, ya que forman parte del trabajo experimental realizado en esta tesis.

#### 2.4.1. Concentración mínima inhibitoria.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del plomo y del cobre en *M. luteus* DE2008, se utilizaron dos técnicas: el método de difusión en agar para el plomo y la técnica de dilución en tubo para el cobre.

Para el método de difusión en agar, el microorganismo fue inoculado mediante siembra en superficie en placas de Petri con medio agar LB sólido. Posteriormente, 20  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de plomo se depositaron equidistantemente en la superficie del agar. El agua Milli-Q sin metal se utilizó como control. Las placas se incubaron a 27°C durante 48 h para analizar posteriormente las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para la técnica de dilución en tubo, se preparó una serie de tubos conteniendo medio LB líquido con concentraciones diferentes de cobre. Todos los tubos de la serie se inocularon con la misma cantidad del microorganismo de ensayo. Los tubos que contenían sólo el medio sin el metal se utilizaron como controles. Los cultivos se incubaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, para después analizar la turbidez (crecimiento) en los tubos procesados.

Por otro lado, para determinar la concentración mínima inhibitoria del cromo (III) en la cianobacteria *Chroococcus* sp. PCC 9106, se prepararon placas de Petri con medio agar BG11 - ASNIII suplementadas con las diferentes concentraciones del metal. Se sembró el microorganismo en superficie y se dejó incubando a 27°C y  $15 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante un período de 7 a 9 días, para después determinar la presencia o ausencia de crecimiento en cada una de las placas.

#### 2.4.2. Recuento en placa.

Con el fin de evaluar el número de células tolerantes y durmientes (células metabólicamente activas, pero que no son capaces de crecer en placa a determinadas condiciones) de *M. luteus* DE2008 tanto para el plomo como para el cobre, 1 ml de un cultivo de 12 h de crecimiento en medio LB líquido se inoculó en 19 ml de medio LB líquido suplementado con las diferentes concentraciones de los metales. Seguidamente los cultivos fueron incubados en un agitador orbital a 220 rpm durante 12 h a 27°C. Transcurrido este tiempo se realizó la siembra en superficie (0.1 ml), por un lado en placas con agar LB suplementado con las mismas concentraciones de metal y por otro lado en placas con agar LB sin metal. A continuación, se sembraron diez réplicas de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , y  $10^{-6}$  de cada una de las concentraciones. Todas las placas sembradas se incubaron a 27°C durante un período de 48 h. Los recuentos de viables se hicieron en las placas que contenían entre 15 y 300 colonias, para que el cálculo fuera estadísticamente significativo y los resultados se expresaron en ufc/ml.

Finalmente, el número de células durmientes de *M. luteus* DE2008 para el Pb (II) y Cu (II), se obtuvo mediante la diferencia entre el número total de células y el número de células tolerantes para cada concentración y tipo de metal.

Por otro lado, el protocolo descrito fue el mismo que se utilizó para determinar el número de células durmientes de este mismo microorganismo a diferentes concentraciones de NaCl.

### **2.4.3. 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 biomasa, la viabilidad, la tolerancia-resistencia a los metales pesados, los cambios tanto en la estructura externa como ultraestructura y la capacidad de captar metales externa y/o internamente de los microorganismos estudiados.

#### **2.4.3.1. Microscopía láser confocal (CLSM).**

El microscopio láser confocal TCS SP5 AOBS (Leica Heidelberg, Alemania) se utilizó con el objetivo de determinar: i) la biomasa y la viabilidad de *M. luteus* DE2008 a diferentes concentraciones de Pb (II) y Cu (II) y la biomasa y la viabilidad de *Chroococcus* sp. PCC 9106 a diferentes concentraciones de Cr (III) mediante la optimización del método descrito por Puyen et al. (2012a), que combina la utilización de fluorocromos, el propio microscopio confocal y el posterior análisis de imágenes mediante el programa *ImageJ v1.41* (FLU-CLSM-IA) y ii) la tolerancia-resistencia de la cianobacteria *Chroococcus* sp. PCC 9106 a diferentes concentraciones de Cr (III) mediante la utilización del mismo microscopio acoplado a un detector espectrofluorimétrico (función  $\lambda$ Scan).

#### **FLU-CLSM-IA:**

Esta metodología se describe en el capítulo de Resultados, ya que se ha optimizado y aplicado durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

**CLSM-  $\lambda$ Scan:**

La función  $\lambda$ Scan del CLSM permite el análisis *in vivo* del estado de los pigmentos fotosintéticos en células individuales de microorganismos fotótrofos tomando en cuenta la región de longitud de onda de emisión y la intensidad de la fluorescencia emitida (autofluorescencia). Esta técnica se optimizó para determinar la sensibilidad de los microorganismos fotótrofos a diferentes metales (Burnat et al., 2010). En este trabajo, se utilizó para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de Cr (III) en la emisión de la fluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (principalmente clorofila *a*) de *Chroococcus* sp. PCC 9106.

Las muestras se observaron utilizando un objetivo de inmersión de aceite 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 visible de luz. 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 ( $\lambda_{\text{step}}$ ) 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 *lambda* de excitación utilizada. Con el fin de medir la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las imágenes *xy $\lambda$* , se utilizó la función *regions-of-interest* (ROIs) del programa informático Leica Confocal (Leica Microsystems CMS GmbH). 70 regiones de interés de 1  $\mu\text{m}^2$  de las células de *Chroococcus* sp. PCC 9106 fueron analizadas para cada una de las muestras analizadas. Finalmente, se

determinó la dosis mínima de metal capaz de alterar significativamente la intensidad de fluorescencia de la clorofila *a* (utilizada como biomarcador) de *Chroococcus* sp. PCC 9106.

#### **2.4.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

El microscopio SEM (*Scanning Electron Microscopy*) se utilizó para determinar los cambios en la estructura externa de las células de *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106. Las muestras de los cultivos (5 ml), tanto las contaminadas con metales como las controles, se filtraron utilizando filtros Nucleopore de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro que luego se fijaron con glutaraldehído diluído al 2.5 % en tampón fosfato Millonig (Anexo 2) durante 2 h a 4°C. 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 unos soportes metálicos y se sombrearon con oro para adquirir un mejor contraste entre las diferentes estructuras presentes en la muestra. Finalmente, todas las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6300 (Jeol, Tokio, Japón).

#### **2.4.3.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).**

El microscopio TEM (*Transmission Electron Microscopy*) se utilizó para determinar la ultraestructura de *Chroococcus* sp. PCC 9106. Las muestras de los cultivos (5 ml), tanto las contaminadas con metales como las controles, una vez centrifugadas a 8000 x g durante 5 min y eliminando el sobrenadante, se fijaron con glutaraldehído diluído 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<sub>4</sub>) 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). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón).

#### **2.4.3.4. 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 de cada uno de ellos concretamente. 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 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. La gran ventaja de esta técnica es que el área a analizar puede estar seleccionada por el usuario.

#### **Sistema EDX acoplado al SEM:**

El EDX acoplado al SEM (SEM-EDX) se utilizó para determinar la capacidad de la cianobacteria *Chroococcus* sp. PCC 9106 para captar extracelularmente el Cr (III). 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 *Chroococcus* sp. PCC 9106 para bioacumular intracelularmente el Cr (III). 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 de espesor. Estos cortes finos 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 del cromo en cada espectro EDX obtenido en las muestras analizadas se determinó por la presencia de un pico principal a 5.4 KeV de energía.

#### **2.4.4. Técnicas bioquímicas para valorar la composición y producción de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS).**

La valoración de la composición y producción del EPS se realizó sólo en la bacteria heterótrofa, *M. luteus* DE2008.

##### **2.4.4.1. Extracción del EPS.**

El protocolo de extracción del EPS llevado a cabo en este trabajo experimental se realizó de acuerdo al protocolo químico-físico descrito por Adav et al. (2008) con algunas modificaciones. Para obtener el EPS de cada cultivo de *M. luteus* DE2008, 30 ml de estos cultivos se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min a 4°C. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se volvió a resuspender en 10 ml de agua estéril Milli-Q. Después, se realizó un pre-tratamiento con 0.60 ml de formamida pura durante 1 h en hielo y posteriormente se añadió 4 ml de NaOH 1N durante 40 min. Una vez terminada la extracción química, se realizó una extracción física en un

ultrasonicador (Sonorex, Bandelin) a 120 W durante 5 min en un baño con hielo. Finalmente, todas las muestras se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min a 4°C y se filtraron a través de filtros de 0.2 µm de diámetro de poro (MILLEX) para recoger las fracciones solubles de EPS. Los extractos de EPS se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su posterior análisis bioquímico. El método de control utilizado para verificar si el proceso de extracción de EPS no dañaba las células fue la cuantificación del ADN presente en dichos extractos.

El peso seco (DW) de los precipitados enteros y de los precipitados libres de EPS se obtuvieron mediante un liofilizador (Telstar, Cryodos-80) durante 48 - 72 h. El DW del EPS utilizado se determinó por la diferencia del peso seco de los precipitados enteros y de los precipitados libres de EPS.

#### **2.4.4.2. Caracterización bioquímica del EPS.**

La caracterización bioquímica del EPS se determinó usando diferentes métodos colorimétricos. Los componentes analizados en este trabajo fueron las proteínas, los carbohidratos, los ácidos urónicos y los ácidos nucleicos. Las valoraciones bioquímicas se analizaron en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 730, a partir de los extractos de EPS obtenidos previamente.

##### **2.4.4.2.1. Método de Bradford. Determinación de la concentración de proteínas.**

El contenido de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976), el cuál determina la composición proteica en 100 µl de muestra. La sensibilidad del método oscila entre 5 y 200 µg de proteína. El análisis se basa en el acoplamiento del colorante azul de Coomassie con la

proteína y el resultado se determina colorimétricamente, en donde se observa una relación directa entre el color azul y la concentración de proteínas en el extracto. Para establecer dicha concentración se utilizó una curva patrón estándar de Albúmina Sérica Bovina (2 mg/ml en 0.9 % de solución acuosa de NaCl).

#### **2.4.4.2.2. Método de Dubois. Determinación de la concentración de carbohidratos.**

El contenido total de carbohidratos en los extractos del EPS se cuantificó por el método del fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). Este método permite valorar tanto azúcares simples, oligosacáridos, como polisacáridos y sus derivados, dando un color anaranjado muy estable cuando reaccionan con el fenol en presencia de ácido sulfúrico. La intensidad del color anaranjado es proporcional a la concentración total de carbohidratos presentes en la muestra. Para establecer dicha concentración se utilizó una curva patrón estándar de glucosa (4 mg/ml en agua Milli-Q).

#### **2.4.4.2.3. Método de Blumenkrantz i Asboe-Handsen. Determinación de la concentración de ácidos urónicos.**

El contenido total de ácidos urónicos (carbohidratos ácidos) en los extractos de EPS se determinó por el método *meta*-hidroxidifenil (Kintner & Van Buren, 1982). Dichos carbohidratos interaccionan con una solución de tetraborato de sodio en ácido sulfúrico concentrado mantenida a 100°C y otra solución de *m*-hidroxidifenil dando como resultado una coloración rosa intensa

con un máximo de absorbancia a 520 nm. En este caso, se utilizó una curva patrón estándar de ácido galacturónico (0.4 mg/ml en agua MilliQ).

#### **2.4.4.2.4. Método de Burton. Determinación de la concentración de DNA.**

El contenido de DNA en los extractos de EPS se determinó por el método colorimétrico de la difenilamina (Burton, 1956). Este colorante reacciona selectivamente con las *2-deoxipentosas* del DNA. En disolución ácida la deoxipentosa se convierte en el aldehído  $\beta$ -hidroxilevulina que reacciona con la difenilamina para dar un compuesto azulado con una absorción máxima a 595 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad total de DNA presente en la muestra. En este caso se utilizó una curva patrón estándar de DNA de semen de salmón (1 mg/ml en solución buffer Tris-EDTA).

#### **2.4.5. Eficiencia de captación de los metales pesados por los microorganismos *Micrococcus luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 utilizando el espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).**

Esta metodología se describe en el capítulo Resultados, ya que se ha optimizado y aplicado durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

### **2.5. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de cultivos en crecimiento como: porcentajes, biomasa, viabilidad, datos de las MFI y eficiencias de biocaptación se determinaron mediante la prueba de análisis de

la varianza (ANOVA). Además, se aplicaron las pruebas de Tukey y Bonferroni para el análisis intragrupal en cada uno de los experimentos. Las diferencias significativas fueron aceptadas para un valor de  $p < 0.05$ . Los análisis se realizaron utilizando el programa SPSS (versión 19.0 para Windows).

### 3. Resultados

Como se ha indicado con anterioridad, se han seleccionado *Micrococcus luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 para determinar su capacidad bioreparadora cuando están expuestos a diferentes metales, ya que presentan: i) una alta tolerancia-resistencia a los metales pesados; ii) capacidad para captarlos y iii) un fácil crecimiento en cultivos de laboratorio.

Por otra parte, los metales ensayados han sido: el plomo, el cobre y el cromo, ya que los tres se han detectado en el río Ebro y tienen un alto grado de toxicidad.

Los métodos utilizados para los objetivos indicados con anterioridad se describen en el capítulo 2 a excepción del FLU-CLSM-IA y del ICP-OES, por ser la optimización de ambos métodos, uno de los objetivos principales de este trabajo.

El capítulo de Resultados comprende una primera sección dedicada a la optimización del método FLU-CLSM-IA, para su aplicación a *M. luteus* DE2008, un microorganismo heterótrofo y por tanto sin autofluorescencia, y a *Chroococcus* sp. PCC 9106, un microorganismo fotótrofo que presenta autofluorescencia. Del mismo modo se describe la optimización del protocolo basado en la utilización del ICP-OES, en ambos microorganismos para determinar la eficiencia de captación de los metales. En una segunda sección, se presentan los resultados obtenidos en dos apartados (3.2.1; 3.2.2) de acuerdo con los objetivos expuestos en este trabajo experimental. Estos apartados se corresponden con los dos artículos presentados en esta tesis y que ya han sido publicados. Finalmente, en una tercera sección se presenta un resumen de los resultados correspondientes a un tercer artículo, que está

pendiente de aceptación, cuyo texto se incluye en el Anexo I de esta tesis doctoral.

### **3.1 Optimización metodológica.**

En esta sección se describen únicamente los protocolos optimizados correspondientes a la utilización del FLU-CLSM-IA y del ICP-OES.

#### **3.1.1 Método que combina el uso de fluorocromos, la microscopía láser confocal y un programa de análisis de imagen *Image J* (FLU-CLSM-IA): Estimación de la biomasa y viabilidad.**

En los últimos años, se han utilizado diversos métodos para la determinación de la biomasa y de la viabilidad celular de los microorganismos en muestras naturales. La capacidad de las células para multiplicarse se considera una de las mejores opciones para determinar la viabilidad de un microorganismo, y el método más comúnmente utilizado es la técnica del recuento en placa (Kell et al., 1998). Sin embargo, este método no valora los microorganismos no viables, ni los viables pero no cultivables o inactivos (Kell et al., 1998; Breeuwer y Abee, 2000). De la misma manera, diferentes metodologías se han utilizado para estimar la biomasa total en los hábitats naturales, incluida la medición de la densidad óptica, el análisis de las propiedades térmicas y la determinación y la cuantificación de los pigmentos fotosintéticos (Harris & Kell, 1985; Sonnleitner et al., 1992; Barranguet et al., 2004; Neu et al., 2004;). Sin embargo, ninguno de los métodos antes mencionados, puede ser utilizado ni para determinar simultáneamente la

---

biomasa total y la individual de los microorganismos, ni para estudiar simultáneamente los microorganismos *in vivo* y sin manipular las muestras.

Nuestro grupo de investigación aplicó por primera vez el método CLSM-IA para analizar la diversidad y determinar la biomasa de diferentes cianobacterias en muestras naturales (Solé et al., 2007; Solé et al., 2009). Este método que analiza las imágenes obtenidas con el CLSM utilizando el plugin *Voxel Counter* del programa *ImageJ v1.41*, permitió determinar la biomasa total y la biomasa individual de cada población de cianobacterias *in vivo* y a un nivel de microescala. Sin embargo, este método no se pudo utilizar para los microorganismos heterótrofos, ya que éstos no presentan autofluorescencia natural. Por lo tanto en el presente apartado, se ha incorporado el uso de fluorocromos y diferentes modificaciones del método CLSM-IA con el fin de determinar tanto la biomasa y la viabilidad de estos microorganismos así como la viabilidad de aquellos que sí presentan autofluorescencia natural (las cianobacterias).

Esta metodología, FLU-CLSM-IA, se optimizó utilizando un microorganismo heterótrofo, *M. luteus* DE2008, y se ha aplicado por primera vez para evaluar el efecto de la salinidad sobre esta bacteria, ya que proviene de un ambiente salino extremo. Además también se ha aplicado para determinar los cambios en la biomasa y en la viabilidad de *M. luteus* DE2008 y de *Chroococcus* sp. PCC 9106 al ser expuestos a diferentes concentraciones y tipos de metal.



---

### **Optimización del protocolo.**

En este caso, el análisis de las muestras para determinar la biomasa y la viabilidad se realizó con el microscopio láser confocal (Leica SP5 AOBS; Heidelberg, Germany), obteniéndose imágenes bidimensionales de cada una de las muestras examinadas. Para llevar acabo este objetivo, la optimización de la metodología se realizó a tres niveles: a) en la selección de los fluorocromos y en la preparación de las muestras teñidas, b) en la selección de las condiciones de captación de imágenes con el CLSM y c) en el análisis de las imágenes obtenidas mediante el uso del programa *ImageJ v1.41*.

La selección de los fluorocromos en este trabajo se hizo de acuerdo a sus características espectrales con el fin de contar células vivas y muertas y en base al no solapamiento con la fluorescencia emitida por los pigmentos fotosintéticos de las cianobacterias (590-800 nm). Los fluorocromos escogidos fueron el Hoechst 33342 y el SYTOX Green (S-7020). El Hoechst es permeable a la membrana y tiñe el ácido nucleico, es decir todas las células, y tiene un espectro de excitación de 350-370 nm y un espectro de emisión de 400-470 nm. El SYTOX Green, sólo tiñe el ácido nucleico de las células con la membrana dañada ya que no atraviesa la membrana intacta, es decir tiñe sólo células muertas, y presenta un espectro de excitación de 490-500 nm y un espectro de emisión de 510-580 nm. En el CLSM a la fluorescencia emitida por el Hoechst se le asignó un pseudocolor azul (células vivas) y a la del SYTOX Green un pseudocolor verde (células muertas), para distinguir ambas de la autofluorescencia de la cianobacteria a la cuál se le asignó un pseudocolor rojo en pantalla. Las concentraciones, los volúmenes y los tiempos de exposición de dichos fluorocromos con respecto a cada una de las muestras de los

---

microorganismos, se realizaron según las recomendaciones del fabricante (Molecular Probes, Invitrogen detection technology, Eugene, Oregon. USA), con algunas modificaciones.

Las diferentes imágenes generadas en el CLSM tuvieron una resolución de 1024 x 1024 píxeles, y se obtuvieron utilizando un objetivo de inmersión de aceite de 63 aumentos, un diafragma *pinhole* de 1 y un *zoom* de 2.0 además de otras condiciones que se utilizaron en cada caso, las cuáles se detallan posteriormente. Se generaron 20 imágenes para cada una de las muestras analizadas.

Una vez se obtuvieron las imágenes mediante el CLSM, se utilizó el programa *ImageJ v1.41* para contar por separado los píxeles de las células vivas (azules o rojos) y de las muertas (verdes) en cada imagen. Cada par de imágenes *xy* (azul/roja y verde) se importó y abrió en su formato original (8-bits, 1024 x 1024 píxeles) como archivos TIFF.

A continuación se describe la aplicación del método en cada uno de los microorganismos ensayados.

#### **Micrococcus luteus DE2008:**

En el caso de este microorganismo, 1 ml de cultivo bacteriano en suspensión se centrifugó a 12000 × g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se le añadió 100 µl de la mezcla de los fluorocromos Hoechst 33342 y SYTOX Green. Las concentraciones finales en la mezcla de fluorocromos fueron: 64.9 µM de Hoechst 33342 y 5 µM de SYTOX Green. Las muestras se tiñeron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. En el caso de los cultivos crecidos a diferentes concentraciones de sal y

---

también de los cultivos contaminados con metales se utilizaron las mismas condiciones.

En el CLSM, se hizo una captación secuencial en dos canales para distinguir la fluorescencia emitida por el Hoechst 33342 (414-464 nm) de la emitida por el SYTOX Green (520-580 nm). Para el Hoechst se utilizó un láser de 405 nm, con una potencia de 25 %, una sensibilidad de 790,2 y un contraste de -4.5; y para el SYTOX Green se utilizó un láser de 488 nm, con una potencia de 6 %, una sensibilidad de 728,2 y un contraste de -1.5.

Una vez obtenidas las imágenes, estas se importaron en el programa *ImageJ v1.41* y se transformaron en imágenes binarias (blanco/negro) utilizando un *threshold* automático seleccionado para cada una de ellas mediante la opción *make binary*. A continuación a cada imagen se le aplicó un filtro de suavizado (mediana) de 2.0 píxeles, de esta manera se discriminaron todos los puntos que tenían menos de 2.0 píxeles con la finalidad de no perder información y obtener una estimación lo más real posible. Seguidamente, se utilizó la función *image calculator* para obtener una imagen suma y a partir de esta imagen obtener las imágenes finales con sólo píxeles binarios azules (células vivas) o verdes (células muertas) por separado mediante restas entre imágenes (“*image calculator*”) para finalmente aplicar en ellas el *plugin voxel counter* (Rasband, 2012). Esta aplicación específica calcula la fracción (*Volume Fraction*) de *thresholded voxels* o vóxeles azules o verdes (*threshold voxel count*) frente al total de vóxeles (*total voxel count*) en cada imagen binaria obtenida.

**Chroococcus sp. PCC 9106:**

En el caso de la cianobacteria, se agregaron 2.2 mg de cultivo a 5 ml de medio BG11 - ASNIII. Los cultivos se incubaron durante 9 días. Transcurrido este tiempo, se descartó la totalidad del medio y el precipitado microbiano se tiñó directamente con 200 µl de SYTOX Green a una concentración final de 5 µM durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad.

Luego mediante el CLSM se hizo una captación secuencial en dos canales para distinguir la fluorescencia emitida por el SYTOX Green (verde, 525-580 nm) de la autofluorescencia de la cianobacteria (rojo, 616-695 nm). En el caso del SYTOX Green se utilizó un láser de 488 nm, con una potencia de 6 %, una sensibilidad de 728.2 y un contraste de -1.5; y para el caso de la autofluorescencia se utilizó un láser de 568 nm, con una potencia de 10 %, una sensibilidad de 543.2 y un contraste de - 0.9.

El protocolo utilizado para el tratamiento de las imágenes con el programa *ImageJ v1.41* fue el mismo que se aplicó para *M. luteus* DE2008, pero en este caso el filtro de suavizado (mediana) aplicado fue de 3.0 píxeles. Además a partir de la imagen suma se obtuvieron imágenes en rojo (células vivas-autofluorescencia) y en verde (células muertas-Sytox Green), por separado mediante restas entre imágenes (*Image calculator*) para aplicar en ellas el *plugin Voxel Counter* (Rasband, 2012).

Finalmente, en los dos casos (*M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106) se determinó la biomasa y la viabilidad en las imágenes finales obtenidas.

La viabilidad (vivas/muertas) expresada como el porcentaje de células vivas y muertas, se obtuvo dividiendo el *threshold voxel count* de cada una de las imágenes, ya sean de células vivas o muertas, entre el *threshold voxel count* de la imagen total y multiplicándolo el valor resultante por cien.

El valor de biovolumen obtenido (*Volume Fraction*) se multiplicó por un factor de conversión de biovolumen a biomasa de  $310 \text{ fg C}/\mu\text{m}^3$  para expresarla en unidades de Carbono (Fry, 1990; Bloem et al., 1995; Solé et al., 2007). La biomasa total expresada en  $\text{mgC}/\text{cm}^3$  se obtuvo teniendo en cuenta la suma del biovolumen de todas las células individuales presentes en cada imagen y dicho factor de conversión. En el caso de la biomasa individual, se obtuvo a partir del biovolumen de una sola célula.

### **3.1.2. Método para determinar la eficiencia de biocaptación de metales pesados: Utilización del espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).**

El proceso de biocaptación puede ser definido como la captación o la eliminación de especies de metales o metaloides, compuestos y partículas de la solución mediante el uso de material biológico (Gadd, 1993). Este proceso involucra una fase sólida (sorbente - microorganismos) y una fase líquida (solvente - el medio de cultivo) que contiene los compuestos disueltos que serán sorbidos (sorbato - iones metálicos). Debido a la gran afinidad de los microorganismos por los metales, estos últimos son atraídos hacia el microorganismo y enlazados por diferentes mecanismos hasta que se establece un equilibrio.

### **Optimización del protocolo.**

Para determinar la eficiencia de captación de *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106, en primer lugar se siguieron determinados protocolos de preparación de las muestras para cada uno de ellos. Seguidamente se determinó la cantidad de metal captado por cada microorganismo en cultivos de laboratorio. De este modo se obtuvieron los datos sobre la capacidad específica de biocaptación y el porcentaje de bioabsorción, parámetros esenciales para evaluar la eficiencia de captación de un microorganismo. Finalmente, las concentraciones de los metales se determinaron en un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Perkin-Elmer OPTIMA-3200RL).

El ICP-OES se fundamenta en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma. A su vez, los espectrómetros de emisión óptica determinan la concentración de estos elementos mediante la medición cuantitativa de la emisión óptica de estos átomos excitados. Cuando se calienta suficientemente una muestra emite luz visible en un espectro discreto, característico de los elementos existentes en la muestra. Cada elemento tiene un espectro de emisión atómica exclusivo (tanto de luz visible como de rayos X), los cuáles se separan en función de su longitud de onda. La selección de esta longitud de onda nos permite determinar el metal cualitativamente, mientras que la intensidad de la radiación emitida nos proporciona la información para poder cuantificarlo. Esta técnica fue aplicada en este trabajo, para la cuantificación de los metales ensayados en cada una de las muestras analizadas. Para ello, las muestras tienen que tener unos requisitos mínimos como: estar en solución,

---

tener ausencia de precipitados y estar la concentración esperada del metal a analizar dentro del rango de concentraciones de la curva estándar. Para realizar la cuantificación de los elementos de una muestra, primero se tiene que calibrar el equipo con los estándares del elemento a analizar, luego se trabajan las muestras en el equipo y finalmente se genera un informe con todos los resultados obtenidos expresados en mg de metal por ml de muestra (mg/ml). Se trata de un proceso automatizado y cuantitativo.

Los protocolos seguidos para cada microorganismo se describen a continuación:

**Micrococcus luteus DE2008:**

Para obtener los cultivos contaminados de *M. luteus* DE2008, una suspensión de células de este microorganismo (4 ml) después de 12 h de incubación se inoculó en 76 ml de medio LB líquido (sin NaCl) conteniendo en cada caso diferentes cantidades de los metales ensayados. Además, se prepararon cultivos controles sin metal. El pH del medio se ajustó a 6.5 - 7 adicionando HCl 1M o NaOH 1M según cada caso, y a continuación los cultivos se incubaron en un agitador a 220 rpm durante 12 h a 27°C. Se comprobó que no se produjera precipitación del metal con el medio utilizado para constatar que la absorción del metal sólo se debía al microorganismo. En todos los experimentos realizados se hicieron controles sin cultivo celular. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. Transcurrido el tiempo de incubación, 80 ml de cultivo se centrifugaron a 8000 x g durante 15 min. Se realizaron dos lavados de las células separándose el sobrenadante, el cuál se filtró para asegurar la ausencia de células. Con el fin de determinar el contenido del metal

final en el sobrenadante, se hicieron diluciones con agua Milli-Q al 20 % (v/v), para que las concentraciones finales encontradas estuvieran dentro del rango de concentraciones de la curva estándar. El peso seco utilizado para determinar la eficiencia de biocaptación se obtuvo por centrifugación de 4 ml de la suspensión inicial y la posterior liofilización (Telstar, Cryodos-80) durante 48 h. Puesto que en este caso se determinó la capacidad de biocaptar Pb (II) y Cu (II), las longitudes de onda analíticas fijadas para estos metales fueron de 220.35 y 324.75 nm, respectivamente.

### **Chroococcus sp. PCC 9106:**

Para obtener los cultivos contaminados de *Chroococcus* sp. PCC 9106, se agregó una cantidad fija de este microorganismo (2.2 mg) a 5 ml de medio líquido BG11 - ASNIII suplementado con las diferentes cantidades de metal. Los cultivos se incubaron a 27°C, a  $15 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$  a pH 6.5 y durante 9 días. Las muestras se tomaron a intervalos de tiempo predefinidos (0, 3, 6, 9, 12, 24, 72, 144 y 216 h), y se filtraron a través de un filtro de diámetro de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  (MILLEX). Finalmente el líquido filtrado se almacenó a 4°C hasta el momento de su cuantificación. Con el fin de determinar el contenido del metal final en el sobrenadante, se hicieron diluciones con agua Milli-Q al 20 % (v/v), para que las concentraciones finales encontradas estuvieran dentro del rango de trabajo de la curva estándar. Se comprobó que no se produjera precipitación del metal en el medio utilizado, para constatar que la absorción del metal sólo se debía al microorganismo. En todos los experimentos realizados se hicieron controles sin cultivo celular. Todos los ensayos se hicieron por cuadruplicado. El peso seco utilizado (2.2 mg) para determinar la eficiencia de biocaptac se obtuvo por



centrifugación de 10 ml de la suspensión celular utilizada y con la posterior liofilización (Telstar, Cryodos-80) durante 48 h. En este caso se determinó la capacidad de biocaptar Cr (III), por este motivo, la longitud de onda analítica fijada para la detección del Cr fue de 267.716 nm.

En los dos microorganismos seleccionados se obtuvo la eficiencia de captación de los metales por el cálculo de: i) el porcentaje de bioabsorción (%) y ii) la capacidad específica de biocaptación ( $q$ ). Además en el caso de *Chroococcus* sp. PCC 9106 se realizó un estudio cinético.

El porcentaje de bioabsorción (%) se obtuvo mediante la diferencia porcentual entre la concentración inicial y final de metal en el medio y se calculó aplicando la siguiente fórmula: % bioabsorción =  $(C_i - C_f) \times 100$ ; donde  $C_i$  y  $C_f$  son las concentraciones inicial y final del metal (mg/L), respectivamente (Radhika et al., 2006).

La capacidad específica de biocaptación ( $q$ ), expresada como (mg de metal captado) x (g de peso seco)<sup>-1</sup>, se calculó aplicando la siguiente fórmula:  $q_{(mg/g)} = V (C_i - C_f) m^{-1}$ ; donde  $V$  es el volumen de la muestra (L),  $C_i$  y  $C_f$  son las concentraciones inicial y final del metal (mg/L), respectivamente, y  $m$  es la cantidad (g) de la biomasa seca (Volesky & May-Phillips, 1995).

Finalmente como anteriormente se ha mencionado, se realizó un estudio cinético solo para el caso de *Chroococcus* sp. 9106 con respecto al Cr (III). Para ello, en primer lugar se realizó una curva cinética de absorción en función de la concentración inicial del metal y el tiempo de contacto, y se estableció el tiempo de equilibrio ( $t_e$ ) de máxima absorción del microorganismo con respecto al metal evaluado. Luego, se realizó la isoterma de absorción la cuál indica la interacción de una molécula del sorbato con las del sorbente y es considerada

un parámetro crítico para el diseño de sistemas de sorción. Para llevar a cabo este procedimiento, las muestras líquidas en donde se encontraba el microorganismo con el metal se adecuaron al tiempo de equilibrio preestablecido ( $t_e$ ) y se determinaron las concentraciones de metales en cada una de ellas de manera similar al procedimiento anterior. La cantidad de metal captado en el equilibrio ( $q_e$ ), se calculó a partir de la siguiente ecuación:  $q_e = V (C_i - C_e) \cdot m^{-1}$ ; donde  $C_i$  y  $C_e$  (mg/L) son las concentraciones de metal inicial y en el equilibrio, respectivamente.

### **3.2. Resultados presentados como artículos**

Las dos secciones que se indican a continuación se corresponden con los dos artículos presentados en esta tesis.

### **3.2.1. Viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochromes and CLSM-Image Analysis.**

En estudios anteriores, nuestro grupo de trabajo había desarrollado un método basado en la microscopía láser confocal y en el análisis de imagen (CLSM-IA) para analizar la diversidad y determinar la biomasa total e individual de las cianobacterias, microorganismos dominantes en los tapetes microbianos del delta del Ebro (Tarragona, España). Esta metodología, que se aplicaba *in vivo*, sin manipulación de las muestras y a nivel de microescala, se utilizó posteriormente para evaluar los mismos parámetros biológicos en otros tapetes microbianos, principalmente de la Camarga (Francia) y de las islas Orkney (Escocia). Sin embargo, este método no se pudo aplicar para determinar la biomasa y la viabilidad de los microorganismos heterótrofos también abundantes en los tapetes microbianos, ya que éstos no presentan fluorescencia natural.

Por este motivo, en el trabajo que se presenta en este artículo se ha optimizado el método anteriormente mencionado introduciendo el uso de los fluorocromos: Hoechst 33342 y SYTOX Green. Además se han realizado algunas modificaciones en el método CLSM-IA, ahora denominado FLU-CLSM-IA, para determinar la biomasa y la viabilidad de *Micrococcus luteus* DE2008, un microorganismo heterótrofo también aislado de los tapetes microbianos del delta del Ebro.

El método se aplicó, por primera vez, para evaluar el efecto de la salinidad (0, 10, 35, 75, y 100 ‰) sobre estos parámetros biológicos en *M. luteus* DE2008. Las imágenes de los cultivos de este microorganismo

creciendo a diferentes concentraciones de sal se obtuvieron en el CLSM, y luego se analizaron mediante el programa *ImageJ v1.41*. Para este estudio se evaluaron 20 imágenes de cada concentración salina.

Los resultados muestran, que el efecto de la salinidad sobre la viabilidad varía significativamente dependiendo de la concentración de sal utilizada. La viabilidad de *M. luteus* DE2008 disminuye desde 94 % (a 10 ‰ NaCl) hasta 66.75 % (a 100 ‰ NaCl). Las diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) a las concentraciones de 75 y 100 ‰ con respecto a la de 10 ‰ NaCl. Estos datos se correlacionan con los cálculos obtenidos para la biomasa total ( $\text{mgC}/\text{cm}^3$ ) de *M. luteus* DE2008, en los que también se produce una disminución desde  $80.34 \text{ mgC}/\text{cm}^3$  (a 10 ‰ NaCl) hasta  $42.9$  (a 75 ‰ NaCl) y hasta  $40.59 \text{ mgC}/\text{cm}^3$  (a 100 ‰ NaCl) respectivamente. También es importante resaltar, que se observa una reducción tanto en el número de células como en el biovolumen del microorganismo y que ésta es inversamente proporcional al incremento en la concentración de sal. Del mismo modo, los resultados de la biomasa individual son coincidentes con los resultados anteriores al mostrar una disminución desde  $0.03 \text{ mgC}/\text{cm}^3$  (a 10 ‰ NaCl) hasta  $0.021 \text{ mgC}/\text{cm}^3$  (a 100 ‰ NaCl).

En el presente trabajo, se han combinado además, los resultados obtenidos mediante el método FLU-CLSM-IA con el método de recuento en placa, y se ha determinado por primera vez, la biomasa total y la viabilidad de las células durmientes, las cuáles presentan a la máxima concentración ensayada (100 ‰ NaCl), una viabilidad de 66.75 % y una biomasa total de  $40.59 \text{ mgC}/\text{cm}^3$ .

Finalmente, considerando todos los resultados expuestos se puede concluir que el FLU-CLSM-IA es un método eficaz, rápido y fiable para evaluar no solo la biomasa y la viabilidad de un microorganismo, sino que además permite cuantificar, las células durmientes, un aspecto de creciente interés en los estudios de ambientes naturales, especialmente los que son extremos para la vida.

**Viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochrome and CLSM - Image Analysis**

Zully M Puyen, Eduard Villagrasa,

Juan Maldonado, Isabel Esteve and Antonio Solé

*Department of Genetics and Microbiology, Biosciences Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C-Campus de la UAB, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain*

**Abstract**

In previous studies, our group developed a method based on Confocal Laser Scanning Microscopy and Image Analysis (CLSM-IA) to analyze the diversity and biomass of cyanobacteria in microbial mats. However, this method cannot be applied to heterotrophic microorganisms, as these do not have autofluorescence. In this paper, we present a method that combines CLSM-IA and Hoechst 33342 and SYTOX Green fluorochromes (FLU-CLSM-IA) to determine the viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008, isolated from a saline microbial mat (Ebro delta, Tarragona, Spain). The method has been applied to assess the effect of salinity on this microorganism. A reduction in viability and biomass (live cells) was observed as the salt concentration increases. The largest effect was at 100 ‰ NaCl with a cell death of 27.25 % and a decrease in total and individual biomass of 39.75 and 0.009 mgC/cm<sup>3</sup>, respectively both with respect to optimal growth (10 ‰ NaCl). On the other hand, another important contribution of this paper was that combining the FLU-CLSM-IA results with those achieved by plate counts enabled us to determine, for first time, the viability and the total biomass of the “dormant cells” (66.75 %

of viability and 40.59 mgC/cm<sup>3</sup> of total biomass at 100 ‰ NaCl). FLU-CLSM-IA is an efficient, fast and reliable method for making a total count of cells at pixel level, including the dormant cells, in order to evaluate the viability and the biomass of a heterotrophic microorganism, *Micrococcus luteus* DE2008.

## **Introduction**

Microbial mats, coastal benthic stratified ecosystems, are formed by mixed populations of phototrophic and heterotrophic microorganisms. Diestra et al. (2005) isolated from an Ebro delta microbial mat (Tarragona, Spain) a *Microcoleus* consortium, mainly formed by this cyanobacterium and different heterotrophic bacteria, one of which was identified as *Micrococcus luteus* DE2008. The capacity of different species of the genus *Micrococcus* to survive in very extreme conditions in a “dormant” state, in which the microorganisms remain viable but cannot be cultivated under standard conditions, has been reported (Votyakova et al., 1994; Greenblatt et al., 2004). In recent years, various methods have been used for determining cell viability and biomass. The plate count is the method most commonly used to determine the viability. However, this method does not count microorganisms which do not form colonies because they are viable but non-culturable (Kell et al., 1998). Moreover, it is known that viable microorganisms, which cannot be cultivated, can form a large part of the populations in natural environments (Roszak and Colwell, 1987). Also, different methodologies have been studied to estimate the total biomass in natural habitats, including measuring the optical density, thermal properties and pH values (Harris and Kell, 1985; Sonnleitner et al., 1992), quantifying and determining photosynthetic pigments (Neu et al., 2004). However, none of these methods can be used to determine biomass at cellular level (individual biomass). Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) has a high resolution power and differs from the conventional microscopy due to its optical system, its illumination technique and its ability to detect the light coming



from the sample (Lawrence and Neu, 1999). To analyze microorganisms that are not autofluorescent, specific fluorochromes need to be used, which act based on specific cell properties or states (Oh and Matsuoka., 2002). Solé et al. (2001) developed the first manual method for quantifying cyanobacterial biomass in microbial mats from images obtained with CLSM. Later, they optimized this method and published an automatic method based on CLSM and Image Analysis (CLSM-IA) (Solé et al., 2007). This last method was applied to analyze the diversity and biomass of the different cyanobacteria in the natural samples (Solé et al., 2007; Solé et al., 2009), but it can not be used in the same way with heterotrophic microorganisms, as these do not have autofluorescence. Therefore, in the present work we have incorporated the use of fluorochromes and we have modified the CLSM-IA method in order to determine both the viability and biomass of these microorganisms. This methodology, Fluorochromes-Confocal Laser Scanning Microscopy-Image Analysis (FLU-CLSM-IA), has been optimized using a heterotrophic microorganism, *M. luteus* DE2008, and has been applied to assess the effect of salinity on this bacterium, as it comes from an extreme saline environment. In addition, the plate counts obtained at different salt concentrations have been used to detect and count the dormant *M. luteus* DE2008 cells. Finally, we compare the results obtained by both methods to determine the viability and the total biomass of the dormant cells.

## **Materials and Methods**

### *Bacterial strain, culture conditions and sample preparation*

We used *M. luteus* DE2008 isolated from a *Microcoleus* consortium (Diestra et

al., 2005). The cultures were kept at 27°C in Luria-Bertani (LB) agar medium. To determine the salinity effect on *M. luteus* DE2008, overnight cultures of this bacterium grown on LB medium were inoculated into LB liquid medium supplemented with different final NaCl concentrations: 0, 10, 35, 75 and 100g/L equivalent to 0, 10, 35, 75 and 100 ‰, respectively. The cultures were incubated at 60 × g, 27°C for 12 h.

#### *Optimization of FLU-CLSM-IA method*

To determine the best sample preparation conditions we assayed different culture volumes of *M. luteus* DE2008 (0.5, 1.0 and 2.0 ml) at different centrifugation times (5, 10 and 15 min) at 12000 × g. The samples were then washed with ringer solution (0.9 % NaCl) and were finally pelleted by centrifugation. One pellet was resuspended in 1 ml of 80 % isopropyl alcohol to obtain a control of dead cells. All experiments were performed in duplicate.

Hoechst 33342 (H-3570) was used to distinguish live cells from dead cells stained with SYTOX Green (S-7020). The staining conditions were used according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) with some modifications. The fluorochrome concentrations used were: 16.2, 32.4, 64.9 µM for Hoechst 33342; and 5, 10 and 50 µM for SYTOX Green. Fluorochrome volumes of 50, 100 and 150 µl were added to the cell pellets and incubated for 15, 30 and 60 min at room temperature in darkness. Tests for each fluorochrome were performed separately and then in pairs. Later, stained suspensions were centrifuged at 12000 × g for 5 min and washed twice with deionised water. Finally, the stained cell pellets were mounted using BacLight mounting oil, covered with a coverslip (24 x 24 mm) and observed with

Confocal Laser Scanning Microscope (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany). The fluorochrome fluorescence emissions were distinguished on the screen as different pseudocolours. A sequential scan in two channels was carried out of each corresponding xy optical section from each sample. For every culture of *M. luteus* DE2008, 20 random images were acquired.

In this study, a modification of the CLSM-IA method described by Solé et al. (2007) was used to determine the viability and total and individual biomass of *M. luteus* DE2008 using fluorochromes. We called this modification FLU-CLSM-IA. The main changes introduced in this methodology refer to the use of specific fluorochromes and to the subsequent application of the *ImageJ* software. Once the CLSM images were obtained, the *ImageJ v1.41* software was used to count separately the blue and green pixels in each image. Each pair of xy images (blue and green) were opened in their original format (8-bit, 1024 x 1024 pixels) as tiff images and transformed to binary images (black/white) using an automatic threshold. The image calculator function of *ImageJ* was used to obtain the summa and the final images with only blue or green binary pixels. The final blue fluorescence image was obtained by subtracting the green fluorescence image from the summa image and the final green fluorescence image by subtracting the final blue fluorescence image from the same summa image. A median smoothing filter (radius of 2.0 pixels) was then used on the final images to eliminate the background before the Voxel Counter plugin was applied (Rasband, 1997-2010). This application calculates the ratio of the thresholded voxels (the live or dead cell volume) to the total voxels from each final binary image. The viability (live/dead) expressed as the percentage of live and dead cells was obtained by determining the ratio between the blue or green

thresholded voxels and the total thresholded voxels of each image (Volume Fraction). This biovolume value obtained for live cells was multiplied by a conversion factor of 310 mgC/cm<sup>3</sup> to convert it to biomass (Bloem et al., 1995). The total and individual biomasses were obtained in each image considering the total biomass as the sum of the biovolume from all live single cells present in every image and the individual biomass as a single cell biovolume. Moreover, to calculate the individual biomass, 20 live single cells from each sample were selected using the ROIs (region of interest) function from the *ImageJ* software and analyzed following the method described above.

#### *Plate Counts*

For plate counts, 0.1 ml from overnight cultures grown at different NaCl concentrations was spread onto LB agar plates also supplemented with the same final NaCl concentrations: 0, 10, 35, 75 and 100 ‰. In addition, to evaluate the number of dormant *M. luteus* DE2008 cells, 0.1 ml from overnight cultures grown at different NaCl concentrations was spread onto new LB agar plates with 10 ‰ NaCl. The plates were incubated at 27°C for 2 days in darkness. The viability counts were expressed in cfu/ml and ten replicates were made for each experiment.

#### *Statistical analysis*

Statistical analyses were carried out with the SPSS software (version 17.0 for Windows XP). The results were expressed as the mean value ± S.E.M. (Statistical Error Means). All data obtained were analyzed using the Student's t-test. The reported p-values were considered significant at  $p < 0.05$ .

## Results and Discussion

In this work, the method CLSM-IA was modified and optimized to determine the viability and biomass of *M. luteus* DE2008 using Hoechst 33342 and SYTOX Green (FLU-CLSM-IA). Also the effect of salinity on the viability and biomass of this heterotrophic microorganism was assessed.

### *Optimization of FLU-CLSM-IA method*

To obtain high-quality CLSM images, where the green and blue pseudocolours have a high-contrast and out-focus is virtually eliminated, 1mL of bacterial culture was centrifuged at 12000 × g for 5 min and a mixture of 100 µl of two fluorochromes was added. In this case, the appropriate final concentrations and time were: 64.9 µM for Hoechst 33342 and 5 µM for SYTOX Green during 30 min. Hoechst 33342 stains all bacteria and its fluorescence is enhanced upon binding to adenine-thymine-rich regions in the minor groove of DNA. Moreover, this dye is very sensitive to DNA conformation (detect gradations of nuclear damage) and the staining protocol does not require previous permeabilization and/or fixation of the cells unlike other DNA dyes such as DAPI (Chazzote, 2010). SYTOX Green stains only bacteria with damaged membranes and is highly fluorescent when is bound to DNA (Roth et al., 1997) in contrast to conventional dead DNA probes such as propidium iodide (PI), which has low extinction coefficient and hence relatively low fluorescence (Breeuwer and Abee, 2000). We selected a mixture of these fluorochromes because they differ both in their spectral characteristics and in their ability to penetrate healthy bacterial cells. Samples were observed with an 63 x /1.40 oil immersion objective using a zoom of 2.0. Blue (live cells) and green (dead cells) pseudocolours were used

in a sequential scan in two channels to distinguish the fluorescence emitted by Hoechst 33342 (414-464 nm) and SYTOX Green (520-580 nm), respectively (Fig. 3.2.1.1a and 3.2.1.1b). From each pair of images (blue and green), the corresponding confocal overlay image was acquired (Fig. 3.2.1.1c). Finally, once the CLSM images were obtained from each *M. luteus* DE2008 stained culture sample, the *ImageJ v1.41* software was applied to generate the summa binary image (Fig. 3.2.1.1d) and determine the viability and the total and individual biomasses.

*Applicability of the FLU-CLSM-IA method to determine the salinity effect on M. luteus DE2008.*

The FLU-CLSM-IA was applied to determine the effect of an environmental parameter, such as salinity, on the viability and biomass of the heterotrophic microorganism, *M. luteus* DE2008. Salinity was chosen, among other physicochemical parameters, because *M. luteus* DE2008 come from Ebro delta microbial mats, which are considered to be extreme saline environments (Martinez-Alonso et al., 2004; Diestra et al., 2005). The results obtained by FLU-CLSM-IA shown at 10 ‰ NaCl, the maximum percentage of live cells and biomass, after 12 h of exposition. The viability results show that the effect of salinity on *M. luteus* DE2008 varied significantly depending on the concentration (Fig. 3.2.1.2a). A decreasing viability from 94 %  $\pm$  0.33 at 10 ‰ NaCl to 66.75 %  $\pm$  2.55 at 100 ‰ NaCl was observed. The differences were statistically significant ( $p < 0.05$ ) from 75 ‰ with respect to 10 ‰ NaCl. Thus, the total biomass (live cells) expressed in mgC/cm<sup>3</sup> decreased from 80.34 mgC/cm<sup>3</sup>  $\pm$  3.24 at 10 ‰ NaCl to 42.9  $\pm$  2.3 and 40.59  $\pm$  2.85 mgC/cm<sup>3</sup> at 75 and 100 ‰

NaCl, respectively (Fig. 3.2.1.2b). This high salinity tolerance of this microorganism is explained by the salinity ranges from 40 ‰ to 70 ‰ of Ebro delta microbial mats (Martinez-Alonso et al., 2004; Diestra et al., 2005), where *M.luteus* DE2008 was isolated (Maldonado et al., 2010). Also, a reduction in both the number of cells and their biovolume can be observed as the salt concentration increases. So, the individual biomass results show a decreasing value from  $0.03 \pm 0.001$  mgC/cm<sup>3</sup> at 10 ‰ to  $0.021 \pm 0.001$  mgC/cm<sup>3</sup> at 100 ‰ NaCl. Although different methodologies have been used to evaluate the salinity effect on microbial diversity (microscopy, flow cytometry and DNA-based methods) and on biomass (pigment analysis, rates of gross photosynthesis and oxygen consumption by specific microsensors), they do not determine this effect in individual biomass (Estrada et al., 2004; Abed et al., 2007). The FLU-CLSM-IA method, as well as analyze the cell viability of each image obtained at different salt concentrations, is useful to determine accurately, individual biovolume and biomass. A reduction in cell biovolume will be probably due to cell osmosis or other energetically costly processes the cells use to adapt to high saline concentrations (Oren, 1999).

*Dormant cells of M. luteus DE2008 determined by combining FLU-CLSM-IA and plate counts at different salinity concentrations.*

In this work, the results obtained by plate counts shown that the viability of the tolerant cells decreased from  $4.01 \pm 6.31 \times 10^8$  cfu/ml at 10 ‰ NaCl to 0 cfu/ml at 100 ‰ NaCl, which indicates that the optimal growth is between 0 and 10 ‰ and that this bacterium is unable to grow at 100 ‰ NaCl in this medium (Fig. 3.2.1.3). The differences were statistically significant ( $p < 0.05$ ) from 75 ‰ with

respect to 10 ‰ NaCl. These results are in accordance with those obtained by Kocur et al. (1972), which demonstrated that *Micrococcus* sp. grows in 50 ‰ NaCl but not usually in 100 or 150 ‰. One of the mechanisms of salt adaptation that could explain this effect is that *Micrococcus luteus* produces highly salt-tolerant glutaminase, which is stable even at 2.74 M (160 ‰) NaCl with a residual activity of 40 % (Moriguchi, 1994), unlike most enzymes from non-halophilic microorganisms that are inhibited in high salt concentrations (Madern et al., 2000). In addition, Nagata et al. (2009) analyzed the effects of salt on *Escherichia coli*, a nonhalophilic heterotrophic microorganism, and concluded that when the external concentration of NaCl is over 60 ‰ the cellular activities such as division, transport and respiration are inhibited .

On the other hand, comparing the results obtained with FLU-CLSM-IA and plate counts, it can be observed that with the first method, live cells are detected in all the concentrations assayed, while with the second method, there are no viable cells at a concentration of 100 ‰ salt. Therefore, in order to determine whether the differences obtained were due to the presence of dormant cells, *M. luteus* DE2008 cultures exposed to the different salinity concentrations were spread onto plates with LB medium at 10 ‰ salt (optimal conditions). The dormant cells were determined as the difference between the total cells (corresponding to the bacteria growing at each salt concentration) and the tolerant cells (corresponding to the bacteria growing at 10 ‰ NaCl) at each salt concentration. The number of dormant cells increases as the salt concentration increases, being from 0 % at 10 ‰ NaCl to 100 % at 100 ‰ NaCl (Fig. 3.2.1.3). These results agree with studies by Koltunov and colleagues (Koltunov et al., 2010), which suggested that this cellular state of low metabolic activity, called



dormancy, can be considered a response to environmental stress. On the other hand, Yamamoto et al. (1996) demonstrated that although the capacity to form colonies has been lost due to nutrient starvation, cells retain the DNA and RNA intact, and in favourable conditions can recover, elongate and multiply.

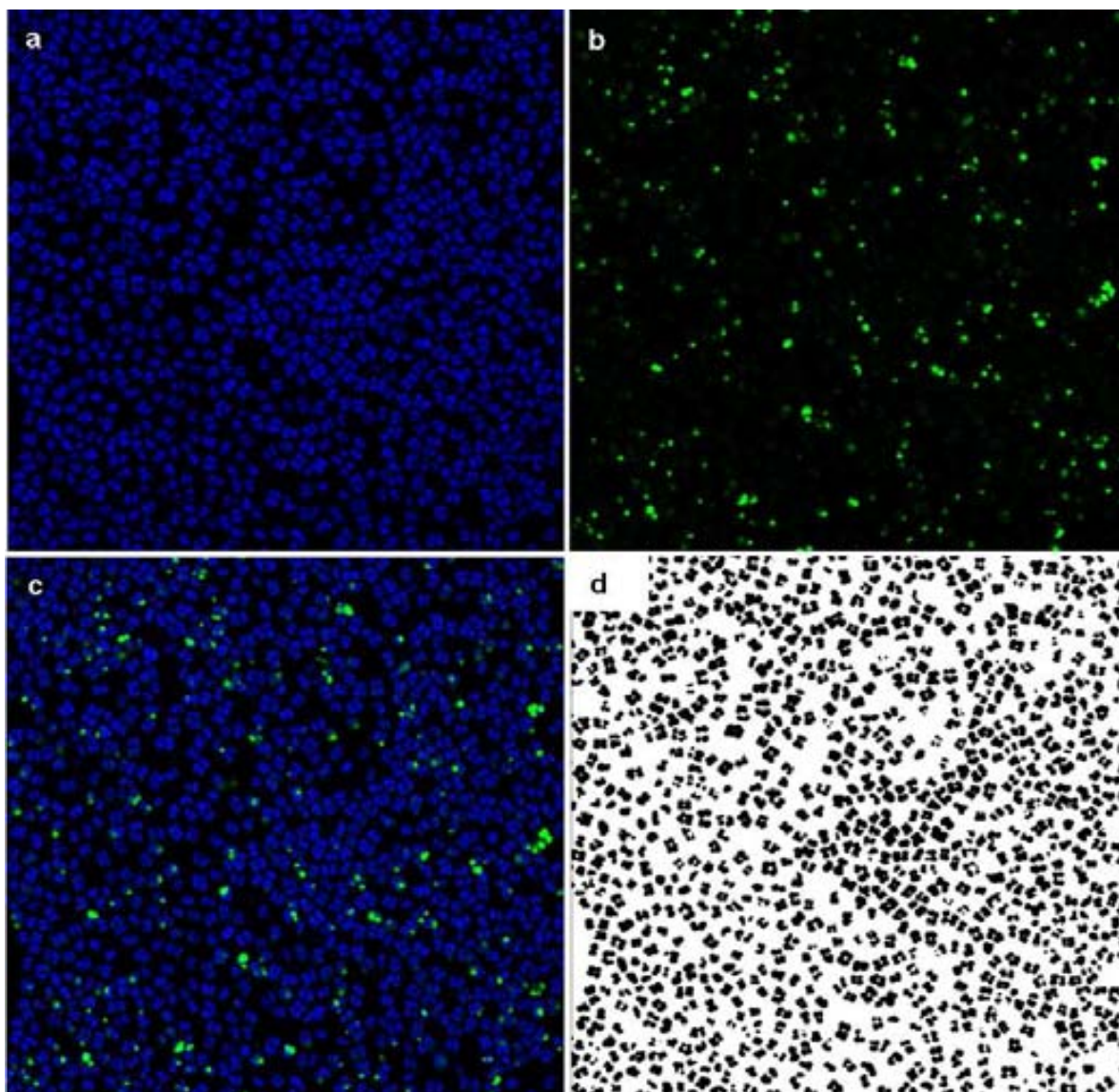
Finally, the results obtained using FLU-CLSM-IA combined with those achieved by plate counts enabled us to determine, for first time, the viability and the total biomass of the dormant cells, which can reach a viability of 66.75% and a total biomass of 40.59 mgC/cm<sup>3</sup> at 100 ‰ NaCl. These results also suggest that *M. luteus* DE2008 cells that are blue when stained with Hoechst 33342 and observed by CLSM are possibly dormant cells.

In conclusion, the results presented in this study, although the viability and biomass (live cells) of *M.luteus* DE2008 decrease with the increase in salinity concentration, it shows high tolerance to extreme saline conditions, such as those of the microbial mats from the Ebro delta. Finally, we think that FLU-CLSM-IA could be an efficient, fast and reliable method for making a total count of cells at pixel level, including dormant cells, in order to evaluate the viability and the biomass (total and individual). Though this work was done on *M. luteus* DE2008, the same methodology could probably be applied to heterotrophic microorganisms in general.

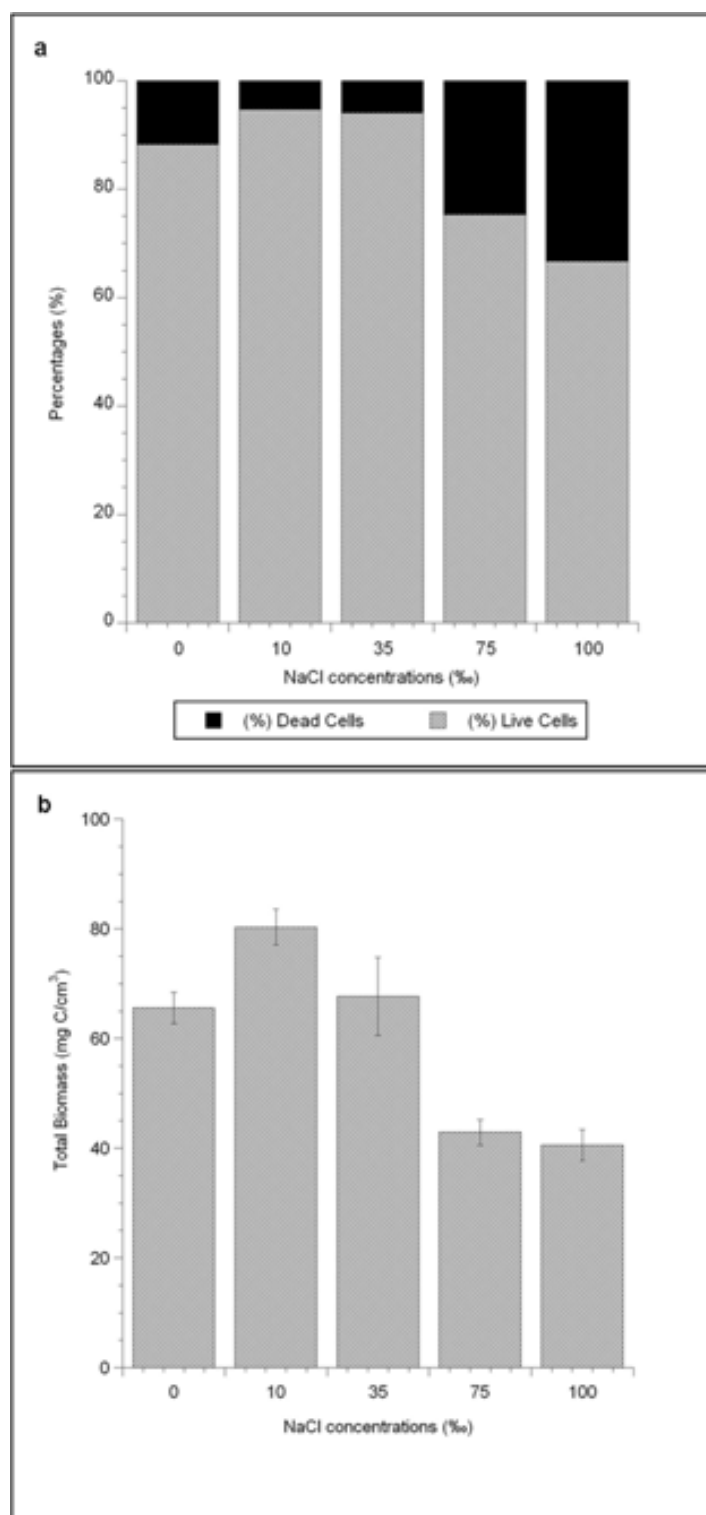
#### *Acknowledgments*

This research was supported by the following grants: DGICYT (CGL2008-01891/BOS) and a UAB postgraduate scholarship to Zully Puyen. We express our thanks to the staff of the Servei de Microscòpia at the Universitat Autònoma de Barcelona for technical assistance with the confocal microscopy. We also

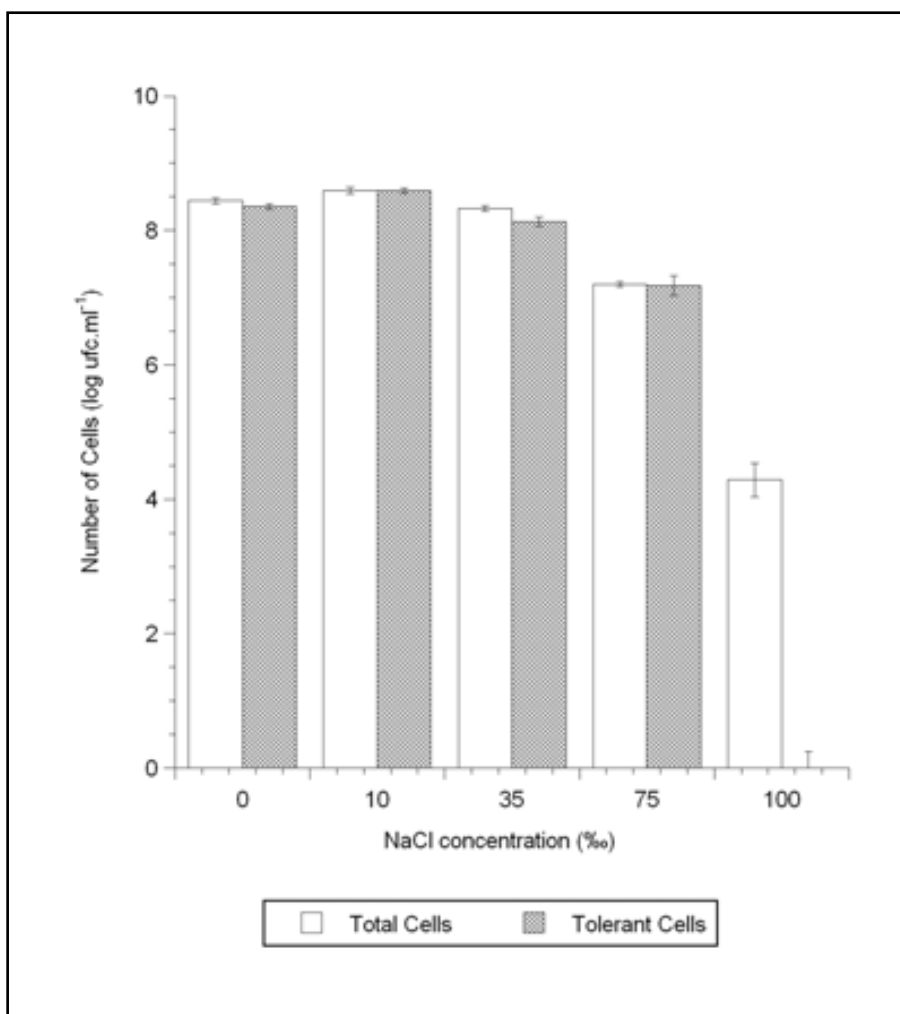
thank Marc Alamany and Francesc Fornells from Ecología Portuaria S. L. (Spain), who provided valuable comments on the manuscript. Finally, we acknowledge Elia Diestra, Pilar Jarque and Cristina Sosa for their help in this work.



**Fig. 3.2.1.1.** CLSM images of *Micrococcus luteus* DE2008 using (a) Hoechst 33342, and (b) SYTOX Green. (c) Overlay CLSM image. (d) Summa binary image obtained by *ImageJ v1.41*.



**Fig. 3.2.1.2.** Application of the FLU-CLSM-IA method on *Micrococcus luteus* DE2008 at different NaCl concentrations. (a) Percentages of live and dead cells (b) Total Biomass (mgC/cm<sup>3</sup>). The bars indicate the Standard Error of the Means (S.E.M.).



**Fig. 3.2.1.3.** Plate counts of *M. luteus* DE2008 growing at different NaCl concentration. The number of cells is expressed in log cfu/ml. The bars indicate the Standard Error of the Means (S.E.M.).

## References

- Abed R.M.M., Kohls K., De Beer D.** (2007) Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environ Microbiol* 9(6):1384–1392
- Bloem J., Veninga M., Shepherd J.** (1995) Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl Environ Microbiol* 61:926-936
- Breeuwer P., Abee T.** (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 55:193 – 200
- Chazotte B.** (2010) Labeling Nuclear DNA using DAPI. Adapted from *Imaging: A Laboratory Manual* (ed. Yuste). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Diestra E., Sole A., Marti M., García 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., Martinez-alonso M., Mir J., Guerrero R.** (1992) Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain: a preliminary study. *Limnologia* 8:185-195
- Estrada M., Henriksen P., Gasol J.M., Casamayor E.O., Pedrós-Alió C.** (2004) Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 49:281-293.
- Greenblatt C.L., Baum J., Klein B.Y., Nachshon S., Koltunov V., Cano R.J.** (2004) *Micrococcus luteus* -survival in amber. *Microb Ecol* 48:120-127

**Harris C.M., Kell D.B.** (1985) The estimation of microbial biomass. *Biosensors* 1:17-84

**Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R.** (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-187

Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H.,

**Kocur M., Smid B., Martinec T.** (1972) The fine structure of extreme halophilic cocci. *Microbios* 5:101-107

**Koltunov V., Greenblatt C.L., Goncharenko A.V., Demina G.R., Klein B.Y., Young M., Kaprelyants A.S.** (2010) Structural changes and cellular localization of resuscitation-promoting factor in environmental isolates of *Micrococcus luteus*. *Microb Ecol* 59:296-310

**Lawrence J.R., Neu T.R.** (1999) Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol* 310:131-144

**Madern D., Ebel C., Zaccai G.** (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4: 91–98.

**Maldonado J., Diestra E., Huang L., Doménech A.M., Villagrasa E., Puyen Z.M., Duran R., Esteve I., Solé A.** (2010) Isolation of a bacterium with high tolerance to lead and copper from a marine microbial mat in Spain. *Ann Microbiol* 60:113–120.

**Martinez-Alonso M., Mir J., Caumette P., Gaju N., Guerrero R., Esteve I.** (2004) Distribution of phototrophic populations and primary production in a microbial mat from the Ebro Delta, Spain. *Int Microbiol* 7:19-25

**Moriguchi M., Sakai K., Tateyama R., Furuta Y., Wakayama M.** (1994) Isolation and characterization of salttolerant glutaminase from *Micrococcus*

*luteus* K-3. J Ferment Bioeng 77:621–625.

**Nagata S., Wang Y., Zhang H., Sasaki H., Oshima A., Ishida A.** (2009) Effect of moderate salinity stress treatment on the stimulation of proline uptake and growth in *Escherichia coli* CSH4 and its mutants under high salinity. J Biosci Bioeng 108:205-210

**Neu T.R., Woelfl S., Lawrence J.R.** (2004) Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). J Microbiol Methods 56:161-172

**Oh K.B., Matsuoka H.** (2002) Rapid viability assessment of yeast cells using vital staining with 2-NBDG, a fluorescent derivative of glucose. Int J Food Microbiol 76:47-53

**Oren A.** (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. Microbiol Mol Biol Rev 63(2): 334-348

**Rasband W.S.** (1997-2010) ImageJ. US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. HYPERLINK "<http://rsb.info.nih.gov/ij>" \t "\_blank"  
<http://rsb.info.nih.gov/ij>

**Roszak D.B., Colwell R.R.** (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol Rev 51:365-379

**Roth B., Poot M., Yue S.T., Millard P.J.** (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox green nucleic acid stain. Appl Environ Microbiol 63: 2421–2431.

**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



**Solé A., Mas J., Esteve I.** (2007) A new method based on image analysis for determining cyanobacterial biomass by CLSM in stratified benthic sediments. *Ultramicroscopy* 107:669-673

**Solé A., Gaju N., Mendez-Alvarez S., Esteve I.** (2001) Confocal laser scanning microscopy as a tool to determine cyanobacteria biomass in microbial mats. *J Microsc* 204:258-262

**Sonnleitner B., Locher G., Fiechter A.** (1992) Biomass determination. *J Biotechnol* 25:5-22

**Votyakova T.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B.** (1994) Influence of Viable Cells on the Resuscitation of Dormant Cells in *Micrococcus luteus* Cultures Held in an Extended Stationary Phase: the Population Effect. *Appl Environ Microbiol* 60:3284-3291

**Yamamoto H., Hashimoto Y., Ezaki T.** (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple nutrient starvation. *FEMS Microbiol Ecol* 20:149-154.

### **3.2.2. Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008.**

En el apartado anterior se mostró el efecto de la salinidad en la biomasa y en la viabilidad de *Micrococcus luteus* DE2008, y para este objetivo se utilizaron diferentes técnicas convencionales y de microscopía de alta resolución.

En este apartado se ha aplicado la misma metodología (FLU-CLSM-IA) para determinar la biomasa y la viabilidad de este microorganismo cuando está expuesto a diferentes concentraciones y tipos de metal. Además, se han optimizado y aplicado métodos bioquímicos y químicos para determinar su potencial bioreparador.

Como ya se ha indicado en la Introducción, nuestro grupo de trabajo aisló e identificó una bacteria heterótrofa, *M. luteus* DE2008, de los tapetes microbianos del delta del Ebro. Este microorganismo se demostró que tenía la capacidad de captar plomo y cobre en sus envueltas de exopolisacárido (EPS), pero no se conocía su eficiencia de biocaptación.

El objetivo del trabajo que se presenta en este artículo ha sido determinar la capacidad de bioabsorción de *M. luteus* DE2008 para el Pb (II) y el Cu (II) en cultivos de laboratorio contaminados. Para ello, en primer lugar, se ha determinado previamente el efecto de las diferentes concentraciones de estos metales sobre la biomasa total e individual y sobre la viabilidad de este microorganismo, y en segundo lugar, se han analizado los cambios en la composición bioquímica de su EPS y en la eficiencia de biocaptación de dichos metales.

Los resultados indican que tanto la biomasa total e individual, como la viabilidad de *M. luteus* DE2008 son inversamente proporcionales a la concentración de Pb (II) y de Cu (II) en el medio. La biomasa total del microorganismo disminuye desde 96.25 mgC/cm<sup>3</sup> (experimento control) hasta 77.88 y 42.11 mgC/cm<sup>3</sup>, a 1.5 mM de plomo y cobre, respectivamente. En el caso del plomo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre todas las condiciones ensayadas con respecto al control, mientras que en el caso del cobre, la concentración mínima que afecta la biomasa total es de 0.1 mM de Cu (II). Resultados parecidos se obtienen en el cálculo de la biomasa individual (células vivas individuales) que disminuye desde 0.03 mgC/cm<sup>3</sup> (experimento control) hasta 0.022 y 0.018 mgC/cm<sup>3</sup> a 1.5 mM Pb (II) y Cu (II), respectivamente. Un efecto análogo se observa al estudiar la viabilidad de esta bacteria frente a los metales que disminuye desde 87.52 % (experimento control) hasta 62.50 % a 1.5 mM Pb (II) y hasta 67 % a 1.5 mM Cu (II). Al contrario que en el estudio del efecto de la salinidad, se produce un incremento en el diámetro celular (analizado mediante el microscopio electrónico de barrido) desde 1.01 ± 0.016 µm (experimento control) hasta 1.38 ± 0.009 y 1.27 ± 0.013 µm en los cultivos expuestos a 0.5 mM Pb (II) y Cu (II), respectivamente. Sin embargo, el diámetro de las células disminuye a 1.18 ± 0.01 y a 1.11 ± 0.004 µm en presencia de 1.5 mM Pb (II) y Cu (II), respectivamente. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en la producción de EPS por parte del microorganismo, con una drástica reducción (de un 70 %) a la concentración de 1.5 mM en ambos metales.

Finalmente, también se demuestra que a una mayor concentración inicial del metal en el medio, mayores también son los valores del porcentaje de

bioabsorción (%) y de la capacidad específica de biocaptación ( $q$ ). Estos valores son además mas altos para el Pb (II) que para el Cu (II) lo que demuestra que *M. luteus* DE2008 tiene mayor afinidad para la captación del plomo.

Teniendo en cuenta todos los resultados presentados puede concluirse que *M. luteus* DE2008 podría ser considerado como un microorganismo capaz de bioreparar ambientes contaminados por ambos metales, ya que: (i) es autóctono en los tapetes microbianos del delta del Ebro y es fácil de cultivar en condiciones de laboratorio; (ii) mantiene una elevada biomasa total y un alto porcentaje de células viables incluso a las concentraciones más altas de ambos metales; (iii) es capaz de captar ambos metales en sus envueltas de EPS y (iv) presenta una alta afinidad en la biocaptación tanto del plomo, como del cobre.



## **Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant**

### ***Micrococcus luteus* DE2008**

Zully M Puyen, Eduard Villagrasa,

Juan Maldonado, Elia Diestra, Isabel Esteve and Antoni Solé.

*Department of Genetics and Microbiology, Biosciences Faculty, Universitat Autònoma de  
Barcelona, Edifici C-Campus de la UAB, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain*

#### **Abstract**

*Micrococcus luteus* DE2008 has the ability to absorb lead and copper. The effect of these metals on biomass and viability of this microorganism were investigated and removal of the metals from culture media was determined.

Lead had no effect on the biomass expressed as mgC/cm<sup>3</sup> of *M. luteus* DE2008, but in the case of copper, the minimum metal concentration that affected the biomass was 0.1 mM Cu (II). According to these results this microorganism shows a greater tolerance for lead. The minimum metal concentration that affected viability (expressed as the percentage of live cells) was 0.5 mM for both metals. *M. luteus* DE2008 exhibited a specific removal capacity of 408 mg/g for copper and 1965 mg/g for lead. *M. luteus* DE2008 has a greater ability to absorb Pb (II) than Cu (II). *Micrococcus luteus* DE2008 could be considered a microorganism capable to recover polluted environments by lead and copper

## Introduction

Contamination of natural habitats by heavy metals through industrial and agricultural activities has the potential of affecting the health of living beings and the environment due to the toxicity of these substances and the difficulty in their remediation (Bahadir et al., 2007; Pérez-Marín et al., 2008). For example, a large area of the Ebro delta (Tarragona, Spain) has been affected by lead and copper as a consequence of the use of lead bullets for hunting (Mateo et al., 1997) and of pesticides for the protection of rice crops (Mañosa et al., 2000). A consortium of *Microcoleus* sp.(cyanobacterium) and different heterotrophic bacteria was isolated from Microbial mats located in the Ebro delta (Diestra et al., 2005). *Micrococcus luteus* DE2008 is a member of this consortium and is able to accumulate lead and copper extracellularly in layers of extracellular polymeric substances (EPS) (Maldonado et al., 2010). The ability of some microorganisms to bind metals and convert some of them to less toxic species (Congeevaran et al., 2007; Guo et al., 2010) has been demonstrated as an alternative to current remediation methods such as precipitation, filtration, ion exchange, electrochemical treatment, and membrane technologies (Volesky, 2001; Bai et al., 2008; Wang and Chen, 2009).

In the present study the absorption capacity of *Micrococcus luteus* DE2008 for Pb (II) and Cu (II) in laboratory cultures was determined and the effect of different concentrations of Pb (II) and Cu (II) on total biomass, mass of individual cells and viability was investigated. Changes in the EPS and the capacity of this microorganism to remove Pb (II) and Cu (II) from cultures were also monitored.

## Materials and Methods

### *Bacterial strain and culture conditions*

*M. luteus* DE2008, isolated from a *Microcoleus* sp. consortium (Diestra et al., 2005) was grown at 27°C in Luria-Bertani (LB) agar medium containing tryptone (10.0 g/L), yeast extract (5.0 g/L), NaCl (10.0 g/L) and agar (15.0 g/L).

### *Preparation of heavy metal stock solutions*

Lead and copper stock solutions were prepared as Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The 50 mM Pb (II) and Cu (II) stock solutions were prepared by dissolving the exact quantities of the Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub> in Milli-Q water and filtering through a 0.2-µm filter (Millex). Working concentrations of Pb (II) and Cu (II) were obtained by serial dilution. The stock solutions were stored in the dark at 4°C.

### *Exposure of Micrococcus luteus DE2008 to different concentrations of Pb (II) and Cu (II)*

One mL of an overnight culture (12 h) of *M. luteus* DE2008 grown on LB medium was inoculated into 19 ml of LB liquid medium with different Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or CuSO<sub>4</sub> concentrations. The cultures were incubated in an orbital shaker (220 rpm) at 27°C for 12 h. The pH of the medium was adjusted to 6.5-7 with 1 M HCl or 1 M NaOH. Triplicate cultures were grown for each heavy metal concentration.



*Estimation of biomass and viability of Micrococcus luteus DE2008*

*M. luteus* DE2008 was exposed to Pb (II) and Cu (II) concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 1.5 mM and total biomass, mass of individual cells and viability of *M. luteus* DE2008 at different Pb (II) and Cu (II) concentrations were determined following the *fluorochromes - confocal laser scanning - image analysis method (FLU-CLSM-IA)* described by Puyen et al. (2012a). This method combines the use of the fluorochromes, CLSM (confocal laser scanning microscope) and image analysis using the *ImageJ* v1.41 program (Rasband, 2010).

Fluorescence microscopy analysis was performed using a CSLM (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany). Blue (live cells) and green (dead cells) pseudocolors were used in a sequential scan in two channels to distinguish the fluorescence emitted by Hoechst 33342 (414–464 nm) and SYTOX Green (520–580 nm), respectively. For every culture of *M. luteus* DE2008 at different Pb (II) and Cu (II) concentrations, 20 confocal images were acquired to calculate total biomass and viability. Moreover, to calculate the mass of individual cells, 20 live single cells from each sample were selected using the ROIs (region of interest) function from the *ImageJ* software and analyzed following the method mentioned above.

*Visualization of the cell structure of Micrococcus luteus DE2008 by scanning electron microscopy (SEM)*

Samples of *M. luteus* DE2008 cultures were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in Millonig buffer phosphate for 2 h (Millonig, 1961), washed four times in the same buffer, dehydrated in increasing concentrations of acetone (30, 50, 70, 90,

and 100 %), and dried by critical-point drying. Samples were mounted on metal stubs and coated with gold. A Jeol JSM-6300 scanning electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) was used to generate the images.

*Biochemical analysis of the extracellular polymeric substances (EPS) of Micrococcus luteus DE2008*

EPS was extracted as described by Adav et al. (2008) with some modifications. Thirty ml of culture was centrifuged at 2,000 x g for 10 min at 4°C (Eppendorf 5804R). The supernatant was removed and the pellet was re-suspended in 10 mL of sterile Milli-Q water. The cell suspension was mixed with 0.60 mL of formamide and incubated on ice for 1 h. Four mL of 1 N NaOH was added and the mixture was incubated for 40 min on ice. The mixture was subjected to ultrasound at 120 W for 5 min on ice in an ultrasonic bath (Sonorex, Bandelin). The sonicated sample was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C and filtered through a 0.2-µm filter (Millex) to collect the soluble fraction (EPS). The EPS extracts were stored at -20°C. Cell damage was assessed by quantification of DNA present in the EPS extracts by the diphenylamine colorimetric method (Burton, 1956) using salmon sperm DNA (1 mg/mL in a Tris - EDTA buffer solution) as standard. The carbohydrate content of the EPS was measured by the phenol sulfuric method (Dubois et al., 1956) with glucose (4 mg/ml in a Milli-Q water solution, Merck) as standard. Protein content was measured by the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine albumin serum (2 mg/mL in a 0.9 % aqueous NaCl solution, Pierce) as standard. Uronic acid content was determined by the *m*-hydroxyphenyl method (Kintner and Van Buren, 1982) using galacturonic acid (0.4 mg/mL in a MilliQ water solution,

Fluka) as standard. Twenty replicates were analyzed in each experiment. The dry weights (DW) of untreated and EPS-free cells pellets were obtained after lyophilization for 48 – 72 h. The EPS DW was obtained as the difference.

#### *Removal of Pb (II) and Cu (II) by growing Micrococcus luteus DE2008*

Four ml of 12-h cultures was inoculated into 76 mL of LB medium (without NaCl) in 100-mL conical flasks containing 0, 0.5, 1 and 1.5 mM of Pb (II) and Cu (II). The pH of the medium was adjusted to 6.5 –7 with 1 M HCl or 1 M NaOH and the flasks were incubated in an orbital shaker (220 rpm) at 27°C for 12 h. In all experiments, control sets without any added bacterial cells were also incubated. All experiments were performed in triplicate. The cultures were centrifuged at 8,000 x g for 15 min. The biosorption yields of *M. luteus* DE2008 were calculated as the percentage difference between the initial and final concentrations of Pb (II) and Cu (II) in the supernatants (Radhika et al., 2006). Specific metal removal ( $q$ ), expressed as (mg metal removed).(g dry weight)<sup>-1</sup> was calculated as:  $q \text{ (mgg}^{-1}\text{)}=V(C_i-C_f)m^{-1}$ , where  $V$  is the sample volume (L),  $C_i$  and  $C_f$  are the initial and final metal concentrations (mgL<sup>-1</sup>), respectively, and  $m$  is the amount (g) of dry biomass (Volesky and May-Phillips, 1995). The dry weight was obtained by centrifugation of 4 ml of a 12-h culture and lyophilization of the cell pellet for 48 h. Concentrations of Pb (II) and Cu (II) were determined by a Perkin-Elmer OPTIMA-3200RL inductively coupled plasma optical spectrometer (ICP-OES). The analytical wavelengths were set at 220.35 and 324.75 nm for detection of Pb (II) and Cu (II), respectively.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey and Bonferroni comparison post hoc tests. Significant differences were accepted at  $p < 0.05$ . The analyses were performed using SPSS software (version 19.0 for Windows).

## **Results and Discussion**

### *Changes in total biomass and mass of individual cells*

The total biomass of *M. luteus* DE2008 was 96.25 mgC/cm<sup>3</sup> (in the control experiment), but 77.88 mgC/cm<sup>3</sup> and 42.11 mgC/cm<sup>3</sup> after growth in the presence of 1.5 mM Pb (II) and Cu (II), respectively (Fig. 3.2.2.1a and 3.2.2.1b). In Pb-containing cultures, no statistically significant differences in total biomass were observed between the conditions tested with respect to the control, while differences were observed for copper ( $F = 236.980$ ) ( $p < 0.05$ ). Using the Tukey and Bonferroni comparison tests, the minimum metal concentration (when compared with the control) that affected significantly ( $p < 0.05$ ) the total biomass was 0.1 mM Cu (II). Similarly, the mass of individual cells decreased from 0.03 mgC/cm<sup>3</sup> in the control experiment to 0.022 mgC/cm<sup>3</sup> at 1.5 mM Pb (II) and 0.018 mgC/cm<sup>3</sup> at 1.5 mM Cu (II). A reduction in both the number of cells and their biovolume was observed as the Pb (II) and Cu (II) concentration increased, which agrees with the results obtained for the total biomass. Benka-Coker and Ekundayo, (1998), estudiando el efecto de estos metales en *Micrococcus* y *Pseudomonas* también demostraron que había una relación inversa entre la concentración de los metales y el número de células, a pesar

de haber utilizados diferentes concentraciones de metales y tiempo de exposición a éstos distintos a los utilizados en el presente trabajo. No obstante, la técnica utilizada por los mismos autores fue el recuento en placa, mientras que en el presente trabajo fue el FLU-CLSM-IA. La ventaja de la utilización de esta técnica con respecto al recuento en placa es que permite determinar la biomasa a nivel total e individual.

#### *Changes in viability*

The viability expressed as the percentage (%) of live cells among all cells (live and dead) was inversely proportional to the concentration of Pb (II) and Cu (II) in the medium. Viability was 87.52 % in the control, but 62.5 and 67 % after exposure to 1.5 mM Pb (II) and Cu (II), respectively (Fig. 3.2.2.2a and 3.2.2.2b). Statistically significant differences were found between the conditions tested for Pb ( $F = 236.980$ ) ( $p < 0.05$ ) and Cu ( $F = 278.870$ ) ( $p < 0.05$ ). Using the Tukey and Bonferroni comparison tests, the minimum metal concentration (when compared with the control) that affected viability significantly ( $p < 0.05$ ) was 0.5 mM Pb (II) and Cu (II). By correlating the results for total biomass with the cellular viability of *M. luteus* DE2008, the mass of live cells ( $\text{mgC}/\text{cm}^3$ ) at different Pb (II) and Cu (II) concentrations was calculated (Table 3.2.2.1). The mass of live cells decreased as the concentration of the metals increased.

#### *Changes in cell structure of Micrococcus luteus DE2008 growing at different metal concentrations*

The size (diameter) of cells increased from  $1.01 \pm 0.016 \mu\text{m}$  (in the control experiment) to  $1.38 \pm 0.009$  and  $1.27 \pm 0.013$  in cultures exposed

to 0.5 mM lead and copper, respectively; however, the diameter decreased to  $1.18 \pm 0.01 \mu\text{m}$  and  $1.11 \pm 0.004 \mu\text{m}$  in the presence of 1.5 mM Pb (II) and Cu (II) (Fig. 3.2.2.3). Statistically significant differences were found between the conditions tested for Pb ( $F = 222.980$ ) ( $p < 0.05$ ) and for Cu ( $F = 258.870$ ) ( $p < 0.05$ ) with respect to the control experiment.

#### *EPS composition and production by Micrococcus luteus DE2008 at different metal concentrations*

Less than 0.2 mg of DNA per g DW was observed in all cases, which confirmed that there had been little to no cellular lysis during EPS extraction (Liu and Fang, 2003; Adav et al., 2008). The EPS composition and production of *M. luteus* DE2008 grown with and without metal (0.5 mM and 1.5 mM Pb (II) and Cu (II), respectively) is shown in Table 3.2.2.2. Carbohydrates (71 %) and proteins (28 %) were the largest fractions in the control experiment. These results are in accordance with those obtained by Sutherland et al. (1997) who considered carbohydrates to be the main constituent of EPS in pure cultures. The EPS composition and production changed with the Pb (II) and Cu (II) concentration in the medium. The highest EPS production was obtained at a concentration of 0.5 mM Pb (II) and Cu (II); it was 70 % lower at 1.5 mM of both metals. The increase in EPS production coincided with an increase in the cellular diameter of metal-exposed cells. These results indicate a response by the cells to the toxic effect of the metals, as shown for other microorganisms (Decho, 1994).

Furthermore, an increase in carbohydrate (higher in lead than copper) and uronic acid contents (with no difference for the two metals) at a concentration of 0.5 mM was observed, whereas the protein content remained the same

regardless of the metal content. However, the content of the different components of the EPS of *M. luteus* DE2008 decreased drastically at 1.5 mM Pb (II) and Cu (II).

#### *Removal of lead and copper by growing Micrococcus luteus DE2008*

The higher the initial concentration of metal in the medium, the higher the values for biosorption yield (%) and specific metal removal ( $q$ ) (Table 3.2.2.3). In addition, when *M. luteus* DE2008 was in contact with Pb or Cu, this microorganism showed more affinity to removing Pb (II) than Cu (II), as the biosorption yields (%) and specific metal removal ( $q$ ) were higher for Pb (II) than Cu (II) (Table 5.3). Similar results were obtained with a *Gloeotheca* sp. (Pereira et al., 2011) and *Bacillus* sp. (Guo et al., 2010).

### **Conclusions**

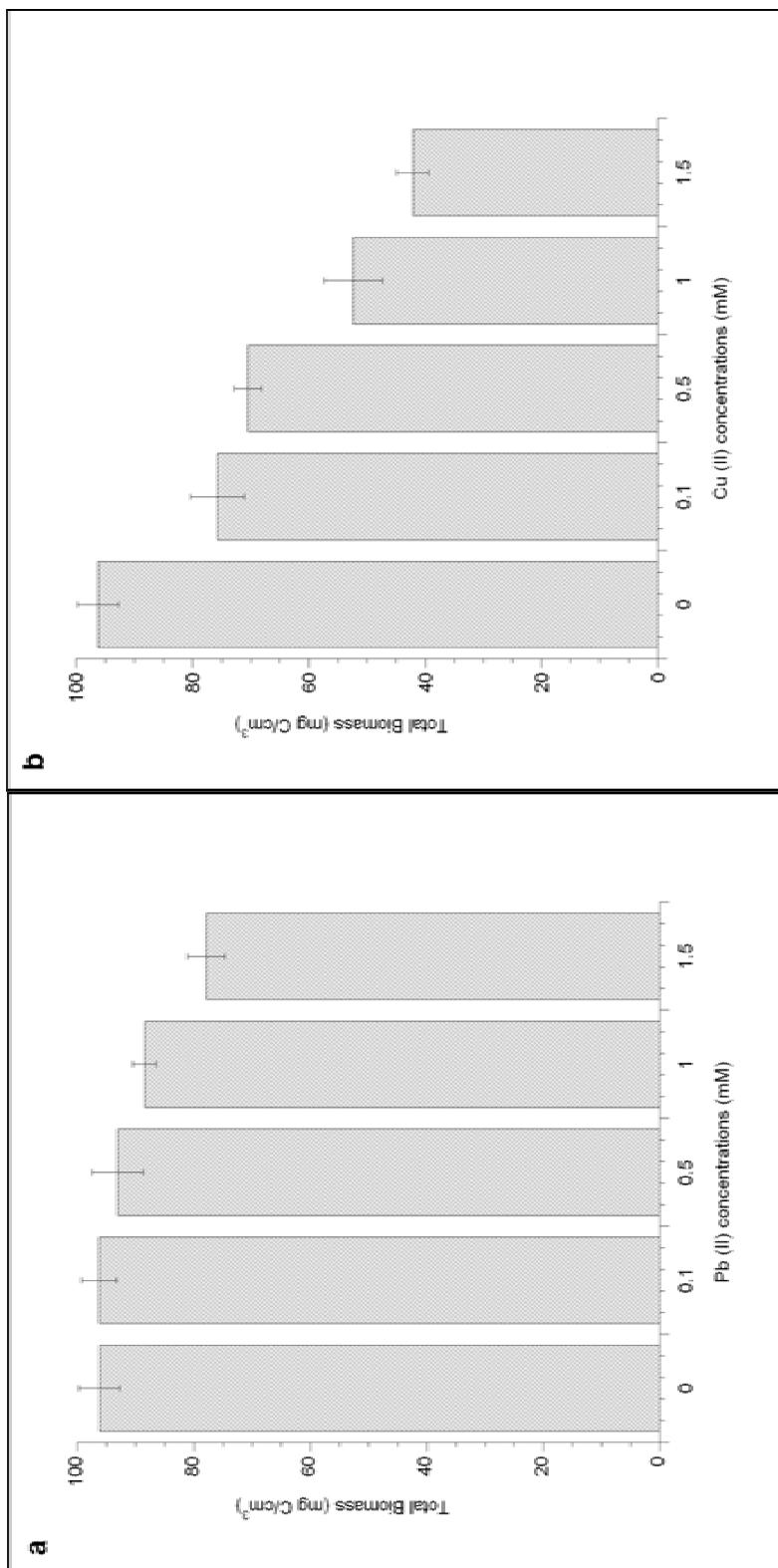
*Micrococcus luteus* DE2008 could be considered a microorganism capable to recover polluted environments by lead and copper as it meets the followings conditions: (i) this microorganism is indigenous in Ebro delta microbial mats, an ecosystem polluted by lead and copper; (ii) it easily grow in axenic cultures; (iii) it is able to adsorb both metals in EPS envelopes and (iii) it exhibit a great tolerance and a high removal affinity by lead and copper.

### **Acknowledgments**

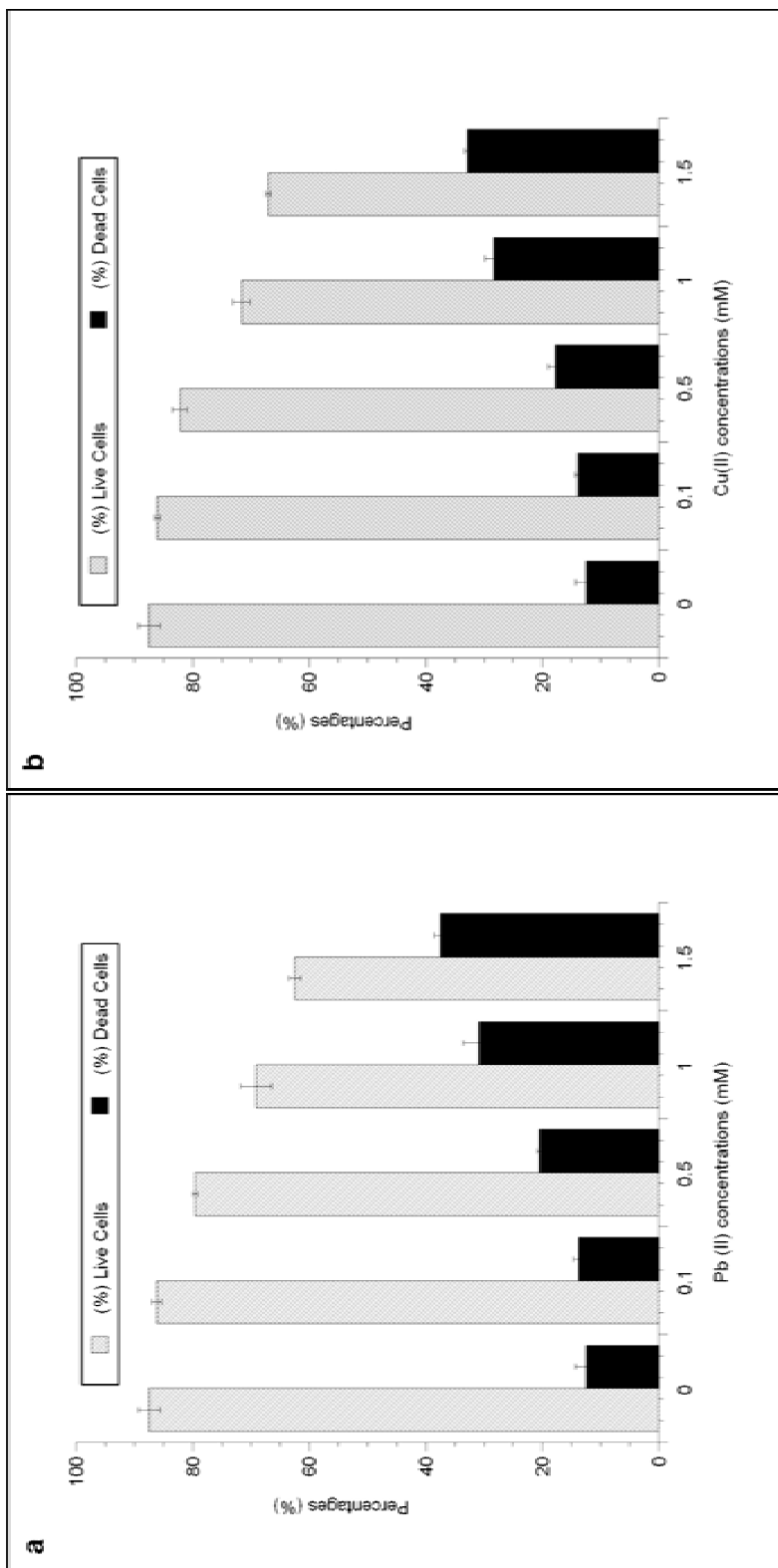
This research was supported by the following grants: DGICYT (CGL2008-01891/BOS) and a UAB postgraduate scholarship to Zully M. Puyen. We express our thanks to the staff of the Servei de Microscòpia at the Universitat

Autònoma de Barcelona and of the Serveis Científicotècnics at the Universitat de Barcelona. We also thank Marc Alamany and Francesc Fornells from Ecología Portuaria S. L. (Spain), who provided valuable comments on the manuscript. Finally, we acknowledge Pilar Jarque and Cristina Sosa for their help with this work.

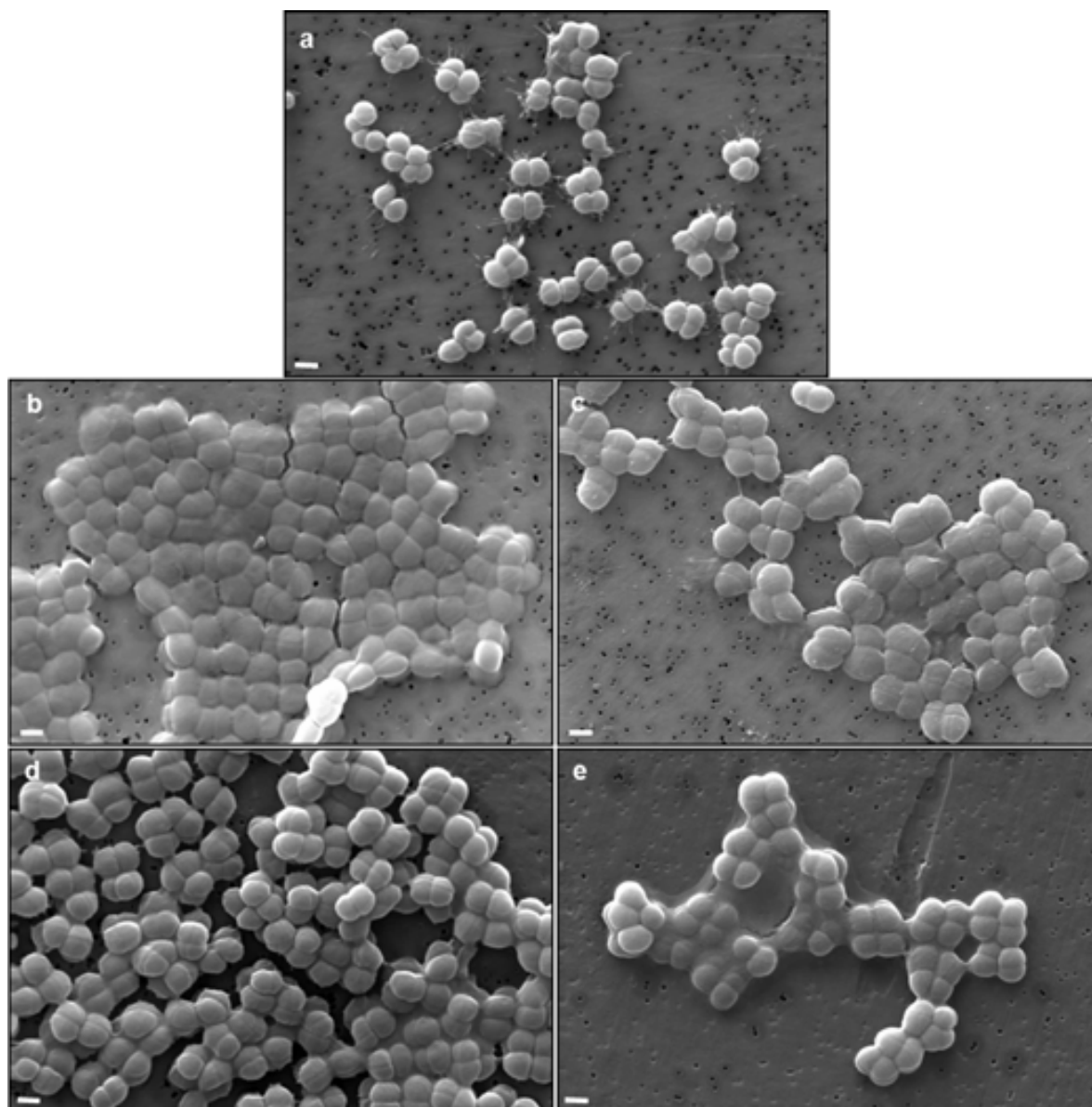




**Fig. 3.2.2.1.** Total Biomass (mgC/cm<sup>3</sup>) of *Micrococcus luteus* DE2008 at different (a) Pb (II) and (b) Cu (II) concentrations determined with the FLU-CLSM-IA method (Puyen et al., 2012).



**Fig. 3.2.2.2.** Percentages of live and dead cells of *Micrococcus luteus* DE2008 at different (a) Pb (II) and (b) Cu (II) concentrations calculated with the FLU-CLSM-IA method (Puyen et al., 2012).



**Fig. 3.2.2.3.** Changes in cell structure of *Micrococcus luteus* DE2008 growing at different metal concentrations by SEM. (a) control experiment (b) 0.5 mM Pb (II), (c) 1.5 mM Pb (II), (d) 0.5 mM Cu (II) and (e) 1.5 mM Cu (II). Scale bar represents 1 μm.

**Table 3.2.2.1.** Biomass of live cells (mgC/cm<sup>3</sup>) of *Micrococcus luteus* DE2008 at different Pb (II) and Cu (II) concentrations.

Heavy metal concentration (mM)	Biomass of live cells (mgC/cm <sup>3</sup> )	
	Pb (II)	Cu (II)
0	84.24	84.24
0.1	83.07	65.19
0.5	74.14	57.96
1.0	61.2	37.5
1.5	48.68	28.25

**Table 3.2.2.2.** EPS composition and production of *Micrococcus luteus* DE2008 at different Pb (II) and Cu (II) concentrations.

Heavy metal	Concentrations (mM)	Total of components	Protein ( $\mu\text{g-EPS}^{-1}\cdot\text{gDW}^{-1}$ )	Uronic acid	Carbohydrate
Control	0	36.93 $\pm$ 2.241	10,270 $\pm$ 2,015	0,523 $\pm$ 0,218	26,1355 $\pm$ 4,49
Pb (II)	0.5	74.78 $\pm$ 3.01	10,967 $\pm$ 1,84	2,095 $\pm$ 0,60	61,717 $\pm$ 6,61
	1.5	8.596 $\pm$ 0.1	3,741 $\pm$ 0,31	0,243 $\pm$ 0,02	4,612 $\pm$ 0,01
CU (II)	0.5	64.04 $\pm$ 1.65	10,256 $\pm$ 2,51	2,616 $\pm$ 0,58	51,165 $\pm$ 1,86
	1.5	10.016 $\pm$ 0.57	2,710 $\pm$ 0,19	0,109 $\pm$ 0,07	7,197 $\pm$ 1,46

**Table 3.2.2.3.** Removal capacity of Pb (II) and Cu (II) by *Micrococcus luteus* DE2008.

Heavy metal	Initial metal concentration (mg/L)	Final metal concentration (mg/L)	Metal adsorbed (mg/L)	% Biosorption	Specific metal removal (q)*
Pb (II)	91.06 (~0.5 mM)	68.01	23.05	25.31	461
	184.26 (~1.0 mM)	122.7	61.56	33.41	1231
	272.39 (~1.5 mM)	174.14	98.25	36.07	1965
Cu (II)	24.99 (~0.5 mM)	21.27	3.73	14.91	75
	54.3 (~1.0 mM)	41.69	12.61	23.22	252
	80.24 (~1.5 mM)	59.84	20.40	25.42	408

\*Specific metal removal (q) expressed as (mg metal removed) x (g dry biomass)<sup>-1</sup>

## References

- Adav S.S., Lee D.J.** (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J. Hazard. Mater.*154, 1120–1126.
- Bahadir T., Bakan G., Altas L., Buykgungar H.** (2007) The investigation of lead removal by biosorption. An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme Microbiol. Technol.* 41, 98–102.
- 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.
- Benka-Coker M.O., Ekundayo J.A.** (1998) Effects of heavy metals on growth of species of *Micrococcus* and *Pseudomonas* in a crude oil/mineral salts medium. *Bioresour. Technol.* 66, 241-245
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Burton K.** (1956) A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochem J.* 62(2), 315–323.
- 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.

**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.

**Diestra E., Solé A., Martí M., García 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.

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.

**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 hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Biores. Technol.* 101, 8599–8605.

**Kintner P.K., Van Buren J.P.** (1982) Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using m-hydroxydiphenyl method. *J. Food Science*. 47, 756-760.

**Liu Y., Fang H.P.** (2003) Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 33, 237–273.

**Maldonado J., Diestra E., Huang L., Domènech A.M., Villagrasa E., Puyen Z.M., Duran R., Esteve I., Solé A.** (2010) 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.



**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., Martinez-Vilalta A., Guitart R.** (1997) Lead shot pellets in the Ebro delta, Spain: densities in sediments and prevalence of exposure in waterflow. *Environ. Pollut.* 96, 335-341.

**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? *Microbiology* 157, 451- 458.

**Pérez-Marín A.B., Ballester A., González F., Blázquez M.L., Muñoz J.A., Sáez J., Meseguer Zapata V.** (2008) Study of cadmium, zinc and lead biosorption by orange wastes using the subsequent addition method. *Bioresour. Technol.* 99, 8101–8106.

**Puyen Z.M., Villagrasa E., Maldonado J., Esteve I., Sole A.** (2012) Viability and Biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at Different Salinity Concentrations Determined by Specific Fluorochromes and CLSM-Image Analysis. *Curr Microbiol.* 64, 75–80.

**Radhika V., Subramanian S., Natarajan K.A.** (2006) Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. *Water Res.* 40, 3628–3636.

**Sutherland I.W.** (1997) Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure Appl. Chem.* 69, 1911–1917.

**Volesky B.**, (2001) Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59:203–16.

**Volesky B., May-Phillips H.A.** (1995) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 42(5), 797-806.

**Wang J., Chen C.** (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27,195–226.



### **3.3. Resultados complementarios: Toxicidad y captación de cromo (III) en la cianobacteria *Chroococcus* sp. PCC 9106.**

Este artículo, que es complementario a los dos anteriores está pendiente de aceptación, por lo que el texto correspondiente se adjunta en el Anexo I de esta tesis doctoral.

#### **Resumen**

El delta del Ebro (Tarragona, España), a pesar de haber sido declarado una área protegida se ha visto afectada por la contaminación por metales pesados entre ellos el plomo, el cobre y el cromo, 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. Entre los microorganismos que conforman estos tapetes microbianos, las cianobacterias son las más abundantes y son además importantes productores primarios en estos ecosistemas. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha optimizado diversas técnicas de microscopía de alta resolución para determinar el efecto *in vivo* del plomo y del cobre sobre diferentes microorganismos fotótrofos así como su capacidad para captarlos. Además, se ha demostrado que *Chroococcus* sp. PCC 9106 es una cianobacteria que presenta una alta tolerancia-resistencia a estos metales pesados y que tiene la capacidad para captarlos. No obstante se conoce muy poco sobre el efecto del cromo en estas poblaciones, a pesar de tratarse de un metal muy tóxico y que también se encuentra como contaminante en el río Ebro.

Es por ello, que el objetivo del trabajo que se presenta en este artículo, es evaluar el potencial bioreparador de este microorganismo fotótrofo frente al

---

Cr (III), determinando: a) la tolerancia-resistencia de *Chroococcus* sp. PCC 9106 al Cr (III); b) los cambios producidos tanto en la biomasa como en la viabilidad de esta cianobacteria frente al metal, c) su capacidad para captarlo tanto intra como extracelularmente, y d) su eficiencia de captación.

Los resultados obtenidos demuestran que el microorganismo es tolerante-resistente hasta una dosis de metal de 0.26 mM. Con respecto a la biomasa total, esta disminuye desde un 44.57 mgC/cm<sup>3</sup> (experimento control) hasta un 32.5 mgC/cm<sup>3</sup> (a 1.0 mM Cr (III)). También la viabilidad disminuye desde un 90.08 % (experimento control) hasta un 70.28 % (1.0 mM Cr (III)). Lo que demuestra que este microorganismo se mantiene viable a altas dosis de metal. *Chroococcus* sp. PCC 9106 tiene además una gran capacidad para captar Cr (III) extracelularmente en sus envueltas de EPS así como de captarlo intracelularmente en sus inclusiones de polifosfato. Según los resultados obtenidos en este trabajo, el tiempo requerido para que la captación del Cr (III) en *Chroococcus* sp. PCC 9106 llegue al equilibrio (tiempo en el que la capacidad de bioabsorción es máxima) es de 72 h, tiempo en el que presenta una capacidad específica máxima de biocaptación de este metal de 54 mg/g.

Considerando todo lo expuesto, y que además el género *Chroococcus* es autóctono y abundante en los tapetes microbianos del delta del Ebro, se puede concluir que este microorganismo presenta las características necesarias para bioreparar ambientes contaminados por este metal.

#### 4. Discusión

Ante la problemática ambiental que generan los residuos industriales y los derivados de la agricultura que en consecuencia contaminan los ríos y sus deltas, se hace necesario y de manera urgente, seleccionar microorganismos que tengan capacidad para biorepararlos. En la mayoría de los casos los microorganismos se aíslan de vertidos industriales (Congeevaram et al., 2007; Sharma et al., 2008; Choi et al., 2009; Shukla et al., 2012), sin embargo existen muy pocas referencias de aislamientos de microorganismos directamente de ambientes naturales contaminados.

Por otra parte, también se conoce muy poco sobre el papel que los microorganismos autóctonos desarrollan en su mismo hábitat (Maldonado et al., 2011), y sobre la utilización directa de microorganismos para recuperar ambientes contaminados. La mayor parte de estos ensayos se han realizado en cultivos de laboratorio (Han et al., 2006; Pandi et al., 2009; Guo et al., 2010; Li et al., 2011) y en microcosmos, que son sistemas artificiales de laboratorio que reproducen las condiciones del ambiente natural (Maldonado et al., 2011).

Con respecto a la capacidad de los microorganismos para bioreparar metales, existe una extensa bibliografía que implica en este proceso a: los hongos (Han et al., 2006; Congeevaram et al., 2007; Sari et al., 2009); las algas (Doshi et al., 2008; Mar Areco et al., 2010) y las bacterias tanto heterótrofas (Nakajima & Tsuruta, 2004; Choi et al., 2009; Li et al., 2011) como fotótrofas (Sharma et al., 2008; Aksu et al., 2009; Lee et al., 2011). En la Tabla 4.1, se han seleccionado algunos ejemplos.

**Tabla 4.1:** Microorganismos aislados de cultivos de laboratorio y de muestras contaminadas utilizadas para evaluar en ellos el efecto de diferentes metales pesados.

Microorganismo	Procedencia de la muestra	Metales ensayados	Referencias
<i>Bacillus circulans</i>	Cultivos de colección.	Cu, Cd	Sahoo et al., 1992
<i>Bacillus</i> sp. L14	Superficie estéril de <i>Solanum nigrum</i> , un hiperacumulador de cadmio.	Cd (II), Pb (II), Cu (II), Cr (VI), Zn (II)	Guo et al., 2010
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivos de colección.	Ag	Li et al., 2011
<i>Ralstonia</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp.	Muestras de suelo contaminadas con petróleo y metales pesados, Korea.	Cd, Cu, Pb	Choi et al., 2009
<i>Pseudomonas</i> spp.	Suelo recolectado de campos de agricultura tratados con desechos industriales.	Hg, Cd, Cu, Cr, Zn	Malik & Jaiswal, 2000
<i>Micrococcus luteus</i>	Cultivos de colección.	Th, U	Nakajima & Tsuruta, 2004
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Suelos sometidos a enriquecimiento.	Pb, Cu, Cr	Ilhan et al., 2004
Hongos y bacterias	Muestras de suelo recolectadas de una industria que utiliza Cr y Ni para enchapado metálico, India.	Cr (VI), Ni (II)	Congeevaram et al., 2007
Levaduras	Subproducto de la industria cervecera.	Pb, Cu	Han et al., 2006
<i>Amanita rubescens</i>	Mar negro, Turquía.	Pb, Cd	Sari et al., 2009
Algas verdes	Fuentes locales (Dharmaj, Nr. Anand, Gujarat).	Ni, Cu, Cr (III), Cr (VI)	Doshi et al., 2008
<i>Gymnogongrus torulosus</i>	Cabo Corrientes - Mar del Plata, Argentina.	Cu, Zn, Cd, Pb	Mar Areco et al., 2010
Cianobacterias	Tapetes microbianos cercanos a una curtiembre.	Cr (VI)	Shukla et al., 2012
<i>Nostoc</i> y <i>Gloeocapsa</i>	Lugar contaminado con metales cerca de una industria textil.	Cr (VI)	Sharma et al., 2008
<i>Spirogyra</i> y <i>Cladophora</i>	Reservorio Tseng-Wen, Taiwan.	Pb (II), Cu (II)	Chao et al., 2011
<i>Gloeotheca</i> sp.	Cultivos de la Colección Pasteur.	Pb (II), Cu (II)	Pereira et al., 2011
<i>Spirulina</i> sp.	Cultivos de colección.	Cr (III), Cd (II), Cu (II)	Chojnacka et al., 2005
<i>Polysiphonia nigrescens</i>	Cabo Corrientes - Mar del Plata, Argentina.	Cr (III)	Blanes et al., 2011
<i>Spirulina fusiformis</i>	Cultivos de colección.	Cr	Pandi et al., 2009
<i>Phormidium</i> sp.	Fuente termal -Turquía.	Cr (VI)	Aksu et al., 2009

Considerando lo expuesto y como se ha mencionado con anterioridad, el objetivo de la presente tesis doctoral, ha sido seleccionar microorganismos con un posible potencial bioreparador de ambientes contaminados por metales, en este caso de los tapetes microbianos del delta del Ebro. Ya existían algunos estudios previos, realizados por nuestro grupo de trabajo, sobre la tolerancia-resistencia de diferentes microorganismos fotótrofos (*Microcoleus* sp. DE2005, Microalga DE2009, *Chroococcus* sp. PCC 9106, *Spirulina* sp. PCC 6313 y *Oscillatoria* sp. PCC 7515) y de un microorganismo heterótrofo (*M. luteus* DE2008) a diferentes metales, así como su capacidad para captarlos (Tabla 4.2). En este trabajo se han seleccionado aquellos microorganismos que ofrecían mejores posibilidades de ser utilizados como bioreparadores de ambientes contaminados por metales: *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 (ver capítulo de Resultados).

**Tabla 4.2.** Tolerancia-resistencia y capacidad de captación de diferentes microorganismos a distintos metales.

Microorganismos	Pb (II)	Cu (II)	Cr (III)	Referencia
<i>Microcoleus</i> sp. DE2005	0.25 mM	300 nM	ND	Burnat et al., 2010 (Pb) / Seder-Colomina et al., 2013 (Cu).
Microalga DE2009	0.5 mM	5 µM	ND	Maldonado et al., 2010b (Pb) / Seder-Colomina et al., 2013 (Cu).
<i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106	0.5 mM	100 nM	0.26 mM	Maldonado et al., 2011 (Pb) / Seder-Colomina et al., 2013 (Cu)/ Puyen et al., (Cr), enviado para aceptación.
<i>Spirulina</i> sp. PCC 6313	0.1 mM	100 nM	ND	Maldonado et al., 2011 (Pb) / Seder-Colomina et al., 2013 (Cu).
<i>Oscillatoria</i> sp. PCC 7515	0.1 mM	NC	ND	Maldonado et al., 2011 (Pb) / no detectado (Cu).
<i>Micrococcus luteus</i> DE2008	0.5 mM	0.1 mM	ND	Maldonado et al., 2010a.

ND: No determinado; NC: No concluyente



En este capítulo de la presente tesis doctoral se comparan mediante tablas las características que se han evaluado tanto de *M. luteus* DE2008 como de *Chroococcus* sp. PCC 9106, y al mismo tiempo, se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo con los obtenidos por otros autores.

Cada una de las tablas que se presentan a continuación, se corresponden con cada uno de los objetivos señalados.

### **Objetivo 1: Efecto de los metales pesados en la biomasa y viabilidad de *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106.**

Se ha valorado en primer lugar, el efecto de los metales pesados seleccionados en la biomasa y en la viabilidad de estos dos microorganismos (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Concentración mínima de metal con un efecto significativo en la biomasa y en la viabilidad de *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106.

Microorganismos	Biomasa total			Viabilidad			Referencias
	Pb (II)	Cu (II)	Cr (III)	Pb (II)	Cu (II)	Cr (III)	
<i>Micrococcus luteus</i> DE2008	1.5 mM	0.1 mM	ND	0.5 mM	0.5 mM	ND	Puyen et al., 2012b Puyen et al., (Cr), enviado para aceptación.
<i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106	ND	ND	1.0 mM	ND	ND	0.1 mM	

ND: No determinado

Según los resultados mostrados, *M. luteus* DE2008 presenta a nivel de biomasa total, una mayor resistencia al plomo (1.5 mM) que al cobre (0.1 mM). La biomasa de este microorganismo se reduce desde un 96.25 mgC/cm<sup>3</sup> (en el experimento control) hasta un 77.88 mgC/cm<sup>3</sup> y un 42.11 mgC/cm<sup>3</sup> en presencia de 1.5 mM de Pb (II) y de Cu (II), respectivamente.

Del mismo modo, la viabilidad de *M. luteus* DE2008 se ve afectada a partir de una concentración de 0.5 mM tanto para el Pb (II) como para el Cu (II). El porcentaje de células vivas se reduce desde un 87.52 % (en el experimento control) hasta un 62.5 y 67 % a 1.5 mM de Pb (II) y de Cu (II), respectivamente.

Análogos estudios realizados por otros autores han demostrado el mismo tipo de correlación, a pesar de haber estudiado el efecto de estos mismos metales pero con diferentes condiciones de laboratorio como concentraciones del metal, tiempo de exposición, técnica de estudio y microorganismo utilizado (Benka-Coker & Ekundayo, 1998; Yilmaz, 2003; Teitzel et al., 2003; Maldonado et al., 2010a; Pereira et al., 2011)

Finalmente, en el apartado 3.2 (sección 3.2.1) de esta tesis doctoral, se mencionó el interés creciente de la comunidad científica por desarrollar metodologías, que permitan determinar el papel de las células durmientes (células con una baja actividad metabólica) y la capacidad de recuperación de éstas cuando habiendo estado previamente en ambientes contaminados o estresantes, cesa el factor que condiciona este estrés y son capaces de recuperarse.

Por este motivo, en este trabajo se consideró de gran importancia analizar la capacidad de recuperación de *M. luteus* DE2008 después de su exposición a los distintos metales. Comparando los resultados obtenidos mediante el método FLU-CLSM-IA y el método de recuento en placa (con o sin metal) se pudo determinar la biomasa total de las células durmientes, las cuales alcanzaron una biomasa de 41.38 y 42.11 mgC/cm<sup>3</sup> a la concentración de 1.5 mM de Pb (II) y de Cu(II), respectivamente.

Por otro lado, con respecto a la cianobacteria *Chroococcus* sp. PCC 9106, la concentración mínima de Cr (III) que tuvo un efecto significativo en la biomasa total y en la viabilidad de este microorganismo fue de 1.0 y 0.1 mM, respectivamente (Tabla 4.3). Thompson et al. (2002), realizaron experimentos parecidos, analizando el crecimiento mediante espectrofotometría en *Synechococcus* sp. (cianobacteria unicelular) y en *Nostoc* sp. (cianobacteria filamentosa) y demostraron que dosis más bajas a las ensayadas en el presente trabajo ya eran letales para estos microorganismos, lo que demuestra una mayor capacidad de resistencia de *Chroococcus* sp. PCC 9106.

**Objetivo 2: Capacidad de captar metales por *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106.**

Se indican a continuación, los resultados obtenidos con respecto a la captación extra e intracelular de Pb (II), Cu (II) y Cr (III) por *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Capacidad de *M. luteus* DE2008 y de *Chroococcus* sp. PCC 9106 para captar distintos metales.

Microorganismos	Captación extracelular			Captación intracelular			Referencias
	Pb (II)	Cu (II)	Cr (III)	Pb (II)	Cu (II)	Cr (III)	
<i>Micrococcus luteus</i> DE2008	+	+	ND	-	ND	ND	Maldonado et al., 2010a
<i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106	+	+	+	+	NC	+	Maldonado et al., 2011 (Pb)/ Resultados no publicados (Cu)/ Puyen et al., (Cr), enviado para aceptación.

ND: No determinado      +: Capta el metal  
 NC: No concluyente      -: No capta el metal

De los resultados obtenidos mediante el SEM-EDX, se puede indicar que *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 son capaces de captar Pb (II)

y Cu (II) en sus envueltas de EPS y además que *Chroococcus* sp. PCC 9106 es capaz de captar Cr (III).

Adicionalmente se realizó también un estudio para determinar la composición y producción del EPS de *M. luteus* DE2008 a diferentes concentraciones de metales (Pb y Cu), determinándose por una parte, que los carbohidratos (71 %) y las proteínas (28 %) eran las principales fracciones encontradas en el EPS del experimento control de este microorganismo, y por otra, que la composición y producción del EPS varía con las diferentes concentraciones de Pb (II) y Cu (II) en el medio. La mayor producción de EPS se obtuvo a una concentración de 0.5 mM de Pb (II) y de Cu (II), reduciéndose hasta un 70 % a la concentración de 1.5 mM en ambos metales. El aumento en la producción de EPS coincidió con el aumento en el diámetro celular (obtenido por SEM) de las células expuestas al metal. Estos resultados indican una respuesta de las células a los efectos tóxicos de los metales, tal como se menciona para otros microorganismos (Decho, 1994). Además, se observó un incremento en el contenido de carbohidratos (mayor en el plomo que en el cobre) y en el contenido de ácidos urónicos (sin diferencia entre los dos metales) a la concentración de 0.5 mM, mientras que el contenido de proteínas siguió siendo el mismo, independientemente de la concentración de metal.

Por otro lado, de los resultados obtenidos mediante el TEM-EDX se ha demostrado que *M. luteus* DE2008 no es capaz de acumular Pb (II) intracelularmente, a diferencia de *Chroococcus* sp. PCC 9106 que sí es capaz de acumular este metal y además el Cr (III) en sus inclusiones intracitoplasmáticas. Dichas inclusiones demostraron contener P y Ca según los espectros EDX obtenidos, siendo inclusiones de polifosfato (PP). La

afinidad por los metales que presentan estas inclusiones es conocida y ha sido demostrada en otros microorganismos por diferentes autores (Surosz & Palinska, 2004; Burnat et al., 2010; Maldonado et al., 2010b, Pereira et al., 2011; Burgos et al., 2012).

Los resultados obtenidos en las muestras contaminadas con Cu (II) no han sido consideradas concluyentes, debido a que la contaminación externa que genera el propio microscopio enmascara los resultados obtenidos.

### **Objetivo 3: Eficiencia en la captación de metales por *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106.**

Finalmente, se ha considerado, que para que un microorganismo tenga capacidad para bioreparar ambientes contaminados por metales pesados, debe ser eficiente en su captación, considerando eficiente aquel microorganismo que es capaz de captar una mayor concentración de metal en un menor tiempo. Los resultados obtenidos sobre la eficiencia de captación de los dos microorganismos ensayados con respecto a los distintos metales se muestran en la Tabla 4.5. Para ello, los parámetros que se han considerado han sido principalmente el porcentaje de bioabsorción (%) y la capacidad específica de biocaptación de metal ( $q$ ) para cada uno de los metales y microorganismos estudiados.

**Tabla 4.5.** Eficiencia de captación de *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 cuando estén expuestos a distintos metales pesados.

Microorganismo	Metal pesado	Tiempo de contacto (h)	% Bioabsorción	Capacidad específica de biocaptación (q)*	Referencia
<i>Micrococcus luteus</i> DE2008	Pb (II)	12	36	1965	Puyen et al., 2012b
	Cu (II)	12	25	408	Puyen et al., 2012b
	Cr (III)	ND	ND	ND	-
<i>Chroococcus</i> sp. PCC 9106	Pb (II)	ND	ND	ND	-
	Cu (II)	ND	ND	ND	-
	Cr (III)	72	62	54	Puyen et al., (Cr), enviado para aceptación.

ND: No determinado,

\*Capacidad específica de biocaptación (q) expresada como (mg metal removido).(g biomasa seca)<sup>-1</sup>

Según los resultados, *M. luteus* DE2008 tiene una mayor afinidad por el Pb (II) que por el Cu (II), ya que el porcentaje de bioabsorción (%) y la capacidad específica de biocaptación (q) son mayores en ambos casos. También influye la concentración del metal, ya que a mayor concentración se obtienen valores más elevados de bioabsorción y de la q (veáse Anexo I). Similares resultados se obtuvieron para la cianobacteria *Gloeothece* sp. (Pereira et al., 2011) y *Bacillus* sp. (Guo et al., 2010) utilizando los mismos metales.

Por otra parte, en el caso de la cianobacteria *Chroococcus* sp. PCC 9106, según el estudio cinético que se realizó, el tiempo requerido para que la captación del Cr (III) llegara al equilibrio (tiempo en el que la capacidad de captación es máxima) fue de 72 h y la capacidad máxima de biocaptación del metal (q) en este tiempo fue de 54 mg/g con un porcentaje de bioabsorción de 62 %. Comparando estos resultados, con los obtenidos con otros autores, la capacidad máxima de biocaptación de cromo (q) obtenida para *Chroococcus* sp

PCC 9106 fue superior a las obtenidas para este metal por otros microorganismos fotótrofos por ejemplo la  $q$  para *Spirulina* sp. fue de 35 mg/g (Jaggiello et al., 2006); para *Chlorella miniata* de 41.12 mg/g (Han et al., 2006) y para *Spirogyra* sp. de 30.21 mg/g (Bishnoi et al., 2007), por lo que tomando en consideración estos resultados *Chroococcus* sp. PCC 9106 tiene una mayor eficiencia de captación que estos últimos microorganismos.

En el apartado siguiente, se extraen finalmente las principales conclusiones del trabajo realizado.

## 5. Conclusiones finales

### 5.1. Optimización metodológica. Conclusiones

Entre las diferentes metodologías utilizadas en el presente trabajo, en primer lugar se ha optimizado especialmente el método FLU-CLSM-IA para determinar la biomasa y la viabilidad de *M. luteus* DE2008 y de *Chroococcus* sp. PCC 9106 cuando ambos microorganismos se exponen a metales pesados. Además se ha puesto a punto esta metodología para determinar la biomasa de las células durmientes. En segundo lugar, se ha optimizado el protocolo basado en la utilización del ICP-OES para determinar la eficiencia de captación de los metales pesados por estos microorganismos.

A continuación se presentan las conclusiones de este apartado:

1. Utilizando los fluorocromos Hoechst 33342 y SYTOX Green S-7020, se obtiene una coloración diferencial de células vivas y muertas al ser observadas en el CLSM y aplicando a la vez el programa *Image J* se han podido calcular dos parámetros biológicos: la biomasa y la viabilidad. Finalmente, con el uso de estos fluorocromos se minimiza el solapamiento con la autofluorescencia emitida por las cianobacterias.

2. En la actualidad no existe una buena metodología para cuantificar las células durmientes, por este motivo en este estudio se han combinado los resultados obtenidos por el método FLU-CLSM-IA y por el método de recuento en placa, obteniéndose para *M. luteus* DE2008 una biomasa de células durmientes de 41.38 y 42.11 mgC/cm<sup>3</sup> a la concentración de 1.5 mM de Pb (II) y de Cu (II), respectivamente.



3. Para los estudios de biocaptación se ha utilizado el ICP-OES. El protocolo de preparación de las muestras ha sido optimizado principalmente en dos aspectos: a) para el proceso de biocaptación se ha utilizado, para ambos microorganismos, medios de cultivo en lugar de agua milliQ, con el objetivo de mantener las células vivas ya que en el caso de *Chroococcus* sp. PCC 9106 se ha determinado previamente la capacidad de dicho microorganismo para captar el metal intracelularmente (proceso activo); y b) para eliminar los precipitados que se producen por la formación de complejos entre el medio y el metal, se ha utilizado un rango de concentraciones entre 0 y 1.5 mM de Cr (III), ya que se ha observado la presencia de precipitación a partir de 2.0 mM.

## **5.2. Resultados. Conclusiones.**

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido determinar la capacidad bioreparadora de metales de *M. luteus* DE2008, un microorganismo heterótrofo aislado directamente de los tapetes microbianos del delta del Ebro y de *Chroococcus* sp. PCC 9106, una cianobacteria procedente de la Colección de Cultivos Pasteur, la cual es también abundante en dichos tapetes. Las conclusiones que se han obtenido mediante la aplicación de métodos de microscopía, bioquímicos y químicos para cada uno de los microorganismos estudiados se detallan a continuación:

### ***Micrococcus luteus* DE2008**

4. La biomasa total para este microorganismo ha sido determinada mediante el método FLU-CLSM-IA. A la concentración de 1.5 mM de Pb (II) no se produce

un efecto significativo con respecto al control en su biomasa total, mientras que a 0.1 mM de Cu (II) sí se produce dicho efecto. Por lo que se puede concluir que el cobre tiene un mayor efecto citotóxico que el plomo.

5. Al evaluar la viabilidad de este microorganismo por la misma metodología (FLU-CLSM-IA), se ha determinado que a la máxima concentración de metal ensayada (1.5 mM), la reducción en el número de las células vivas con respecto al experimento control es de 29 % para el Pb (II) y 24 %, para el Cu (II).

6. Se ha analizado la biocaptación tanto extracelular (SEM-EDX) como intracelular (TEM-EDX) de *M. luteus* DE2008, observándose que este microorganismo es capaz de captar Pb (II) y Cu (II) en sus envueltas de EPS, pero no de captarlos intracelularmente.

7. El EPS de *M. luteus* DE2008 está compuesto mayoritariamente por carbohidratos (71%) y proteínas (28%). Cuando este microorganismo se expone a diferentes concentraciones de metal, la mayor producción de EPS se obtiene a una concentración de 0.5 mM de Pb (II) y de Cu (II), disminuyendo hasta un 70% a la concentración de 1.5 mM para ambos metales.

8. La eficiencia de captación de *M. luteus* DE2008 cuando está expuesto a diferentes concentraciones de Pb (II) y Cu (II) se ha evaluado utilizando el ICP-OES, considerando el cálculo del porcentaje de bioabsorción (%) y la capacidad específica de biocaptación de metales ( $q$ ). Los resultados

demuestran que este microorganismo tiene un porcentaje de bioabsorción y una  $q$  mayor para el plomo (36 %; 1965 mg/g) que para el cobre (25 %; 408 mg/g).

### **Chroococcus sp. PCC 9106**

9. La tolerancia- resistencia de este microorganismo al Cr (III) ha sido analizada mediante el CLSM- $\lambda$ scan, *in vivo* y a nivel celular. El resultado obtenido es que este microorganismo es tolerante-resistente al Cr (III) hasta una concentración de 0.26 mM.

10. Mediante el método FLU-CLSM-IA se ha determinado la biomasa total de este microorganismo cuando se expone a diferentes concentraciones de Cr (III). Los resultados indican que la concentración mínima de este metal que afecta la biomasa total es de 1.0 mM Cr (III). La reducción de este parámetro con respecto al experimento control es de 16.83 mgC/cm<sup>3</sup>.

11. La viabilidad de este microorganismo cuando se expone a diferentes concentraciones de Cr (III), mediante la misma metodología (FLU-CLSM-IA), se afecta significativamente a partir de una concentración de 0.1 mM. La reducción en el número de las células vivas con respecto al control es de 19%.

12. Al analizar la biocaptación de Cr (III) externa (SEM-EDX) e internamente (TEM-EDX) se ha observado que este microorganismo es capaz de captar Cr (III) tanto en sus envueltas de EPS como en sus inclusiones intracitoplasmáticas de polifosfato.

13. Los resultados de la eficiencia de captación de *Chroococcus* sp. PCC 9106, utilizando el ICP-OES, cuando está expuesto a diferentes concentraciones de Cr (III) indican que la capacidad específica de biocaptación para este metal es de 54 mg/g y que el porcentaje de bioabsorción es de 62% a las 72 h de incubación.

14. Considerando todos los resultados obtenidos, se puede concluir finalmente que *M. luteus* DE2008 y *Chroococcus* sp. PCC 9106 podrían ser considerados como microorganismos capaces de bioreparar ambientes contaminados por metales, ya que: (i) son microorganismos autóctonos en los tapetes microbianos del delta del Ebro y son fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio;(ii) presentan una alta tolerancia-resistencia a los metales;(iii) mantienen una elevada biomasa total y un alto porcentaje de células viables incluso a las dosis más altas ensayadas; (iv) son capaces de captar los metales extra y/o intracelularmente y (v) presentan una alta afinidad en la biocaptación de los metales utilizados.



**6. Artículos publicados:**



# Viability and Biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at Different Salinity Concentrations Determined by Specific Fluorochromes and CLSM-Image Analysis

Zully M. Puyen · Eduard Villagrasa ·  
Juan Maldonado · Isabel Esteve · Antonio Solé

Received: 27 July 2011 / Accepted: 12 September 2011 / Published online: 18 October 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** In previous studies, our group developed a method based on Confocal Laser Scanning Microscopy and Image Analysis (CLSM-IA) to analyze the diversity and biomass of cyanobacteria in microbial mats. However, this method cannot be applied to heterotrophic microorganisms, as these do not have autofluorescence. In this article, we present a method that combines CLSM-IA and Hoechst 33342 and SYTOX Green fluorochromes (FLU-CLSM-IA) to determine the viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008, isolated from a saline microbial mat (Ebro Delta, Tarragona, Spain). The method has been applied to assess the effect of salinity on this microorganism. A reduction in viability and biomass (live cells) was observed as the salt concentration increases. The largest effect was at 100‰ NaCl with a cell death of 27.25% and a decrease in total and individual biomass of 39.75 and 0.009 mgC/cm<sup>3</sup>, respectively, both with respect to optimal growth (10 ‰ NaCl). On the other hand, another important contribution of this article was that combining the FLU-CLSM-IA results with those achieved by plate counts enabled us to determine, for first time, the viability and the total biomass of the “dormant cells” (66.75% of viability and 40.59 mgC/cm<sup>3</sup> of total biomass at 100‰ NaCl). FLU-CLSM-IA is an efficient, fast, and reliable method for making a total count of cells at pixel level, including the dormant cells, to evaluate the viability and the biomass of a heterotrophic microorganism, *M. luteus* DE2008.

## Introduction

Microbial mats, coastal benthic stratified ecosystems, are formed by mixed populations of phototrophic and heterotrophic microorganisms. Diestra et al. [1] isolated from an Ebro Delta microbial mat (Tarragona, Spain) a *Microcoleus* consortium, mainly formed by this cyanobacterium and different heterotrophic bacteria, one of which was identified as *Micrococcus luteus* DE2008. The capacity of different species of the genus *Micrococcus* to survive in very extreme conditions in a “dormant” state, in which the microorganisms remain viable but cannot be cultivated under standard conditions, has been reported [2, 3]. In recent years, various methods have been used for determining cell viability and biomass. The plate count is the method most commonly used to determine the viability. However, this method does not count microorganisms which do not form colonies because they are viable but non-culturable [4]. Moreover, it is known that viable microorganisms, which cannot be cultivated, can form a large part of the populations in natural environments [5]. Also, different methodologies have been studied to estimate the total biomass in natural habitats, including measuring the optical density, thermal properties, and pH values [6, 7], quantifying and determining photosynthetic pigments [8]. However, none of these methods can be used to determine biomass at cellular level (individual biomass). Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) has a high resolution power and differs from the conventional microscopy because of its optical system, its illumination technique and its ability to detect the light coming from the sample [9]. To analyze microorganisms that are not autofluorescent, specific fluorochromes need to be used, which act based on specific cell properties or states [10]. Solé et al. [11] developed the first manual method for

Z. M. Puyen · E. Villagrasa · J. Maldonado · I. Esteve ·  
A. Solé (✉)  
Department of Genetics and Microbiology, Universitat  
Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain  
e-mail: Antoni.sole@uab.es



quantifying cyanobacterial biomass in microbial mats from images obtained with CLSM. Later, they optimized this method and published an automatic method based on CLSM and Image Analysis (CLSM-IA) [12]. This last method was applied to analyze the diversity and biomass of the different cyanobacteria in the natural samples [12, 13], but it can not be used in the same way with heterotrophic microorganisms, as these do not have autofluorescence. Therefore, in the present study we have incorporated the use of fluorochromes, and we have modified the CLSM-IA method to determine both the viability and biomass of these microorganisms. This methodology, Fluorochromes-Confocal Laser Scanning Microscopy-Image Analysis (FLU-CLSM-IA), has been optimized using a heterotrophic microorganism, *M. luteus* DE2008, and has been applied to assess the effect of salinity on this bacterium, as it comes from an extreme saline environment. In addition, the plate counts obtained at different salt concentrations have been used to detect and count the dormant *M. luteus* DE2008 cells. Finally, we compare the results obtained by both methods to determine the viability and the total biomass of the dormant cells.

## Materials and Methods

### Bacterial Strain, Culture Conditions and Sample Preparation

We used *M. luteus* DE2008 isolated from a *Microcoleus* consortium [1]. The cultures were kept at 27°C in Luria-Bertani (LB) agar medium. To determine the salinity effect on *M. luteus* DE2008, overnight cultures of this bacterium grown on LB medium were inoculated into LB liquid medium supplemented with different final NaCl concentrations: 0, 10, 35, 75, and 100 g/L equivalent to 0, 10, 35, 75, and 100‰, respectively. The cultures were incubated at 60 × g, 27°C for 12 h.

### Optimization of FLU-CLSM-IA Method

To determine the best sample preparation conditions we assayed different culture volumes of *M. luteus* DE2008 (0.5, 1.0 and 2.0 ml) at different centrifugation times (5, 10, and 15 min) at 12000×g. The samples were then washed with ringer solution (0.9% NaCl) and were finally pelleted by centrifugation. One pellet was resuspended in 1 ml of 80% isopropyl alcohol to obtain a control of dead cells. All experiments were performed in duplicate.

Hoechst 33342 (H-3570) was used to distinguish live cells from dead cells stained with SYTOX Green (S-7020). The staining conditions were used according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Eugene,

Oregon, USA) with some modifications. The fluorochrome concentrations used were: 16.2, 32.4, 64.9 μM for Hoechst 33342; and 5, 10, and 50 μM for SYTOX Green. Fluorochrome volumes of 50, 100, and 150 μl were added to the cell pellets and incubated for 15, 30, and 60 min at room temperature in darkness. Tests for each fluorochrome were performed separately and then in pairs. Later, stained suspensions were centrifuged at 12000×g for 5 min and washed twice with deionized water. Finally, the stained cell pellets were mounted using BacLight mounting oil, covered with a coverslip (24 × 24 mm) and observed with Confocal Laser Scanning Microscope (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany). The fluorochrome fluorescence emissions were distinguished on the screen as different pseudocolors. A sequential scan in two channels was carried out of each corresponding xy optical section from each sample. For every culture of *M. luteus* DE2008, 20 random images were acquired.

In this study, a modification of the CLSM-IA method described by Solé et al. [12] was used to determine the viability and total and individual biomass of *M. luteus* DE2008 using fluorochromes. We called this modification as FLU-CLSM-IA. The main changes introduced in this methodology refer to the use of specific fluorochromes and to the subsequent application of the *ImageJ* software. Once the CLSM images were obtained, the *ImageJ v1.41* software was used to count separately the blue and green pixels in each image. Each pair of xy images (blue and green) were opened in their original format (8-bit, 1024 × 1024 pixels) as tiff images and transformed to binary images (black/white) using an automatic threshold. The image calculator function of *ImageJ* was used to obtain the summa and the final images with only blue or green binary pixels. The final blue fluorescence image was obtained by subtracting the green fluorescence image from the summa image and the final green fluorescence image by subtracting the final blue fluorescence image from the same summa image. A median smoothing filter (radius of 2.0 pixels) was then used on the final images to eliminate the background before the Voxel Counter plugin was applied [14]. This application calculates the ratio of the thresholded voxels (the live or dead cell volume) to the total voxels from each final binary image. The viability (live/dead) expressed as the percentage of live and dead cells was obtained by determining the ratio between the blue or green thresholded voxels and the total thresholded voxels of each image (Volume Fraction). This biovolume value obtained for live cells was multiplied by a conversion factor of 310 mgC/cm<sup>3</sup> to convert it to biomass [15]. The total and individual biomasses were obtained in each image considering the total biomass as the sum of the biovolume from all live single cells present in every image and the individual biomass as a single cell biovolume. Moreover, to calculate

the individual biomass, 20 live single cells from each sample were selected using the ROIs (region of interest) function from the *ImageJ* software and analyzed following the method described above.

### Plate Counts

For plate counts, 0.1 ml from overnight cultures grown at different NaCl concentrations was spread onto LB agar plates also supplemented with the same final NaCl concentrations: 0, 10, 35, 75, and 100‰. In addition, to evaluate the number of dormant *M. luteus* DE2008 cells, 0.1 ml from overnight cultures grown at different NaCl concentrations was spread onto new LB agar plates with 10‰ NaCl. The plates were incubated at 27°C for 2 days in darkness. The viability counts were expressed in cfu/ml and ten replicates were made for each experiment.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out with the SPSS software (version 17.0 for Windows XP). The results were expressed as the mean value  $\pm$  SEM (Statistical Error Means). All data obtained were analyzed using the Student's *t*-test. The reported *P*-values were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results and Discussion

In this study, the method CLSM-IA was modified and optimized to determine the viability and biomass of *M. luteus* DE2008 using Hoechst 33342 and SYTOX Green (FLU-CLSM-IA). Also the effect of salinity on the viability and biomass of this heterotrophic microorganism was assessed.

### Optimization of FLU-CLSM-IA Method

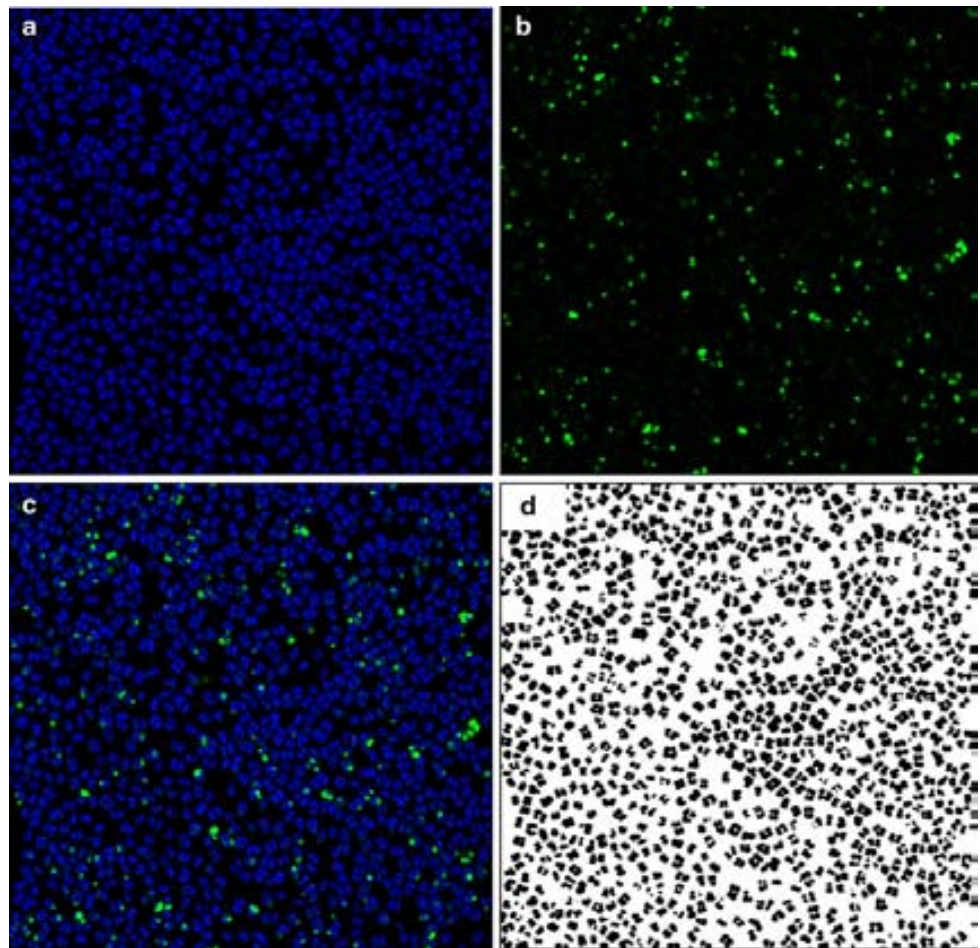
To obtain high-quality CLSM images, where the green and blue pseudocolors have a high-contrast and out-focus is virtually eliminated, 1 mL of bacterial culture was centrifuged at  $12000 \times g$  for 5 min and a mixture of 100  $\mu$ l of two fluorochromes was added. In this case, the appropriate final concentrations and time were: 64.9  $\mu$ M for Hoechst 33342 and 5  $\mu$ M for SYTOX Green during 30 min. Hoechst 33342 stains all bacteria and its fluorescence is enhanced upon binding to adenine–thymine-rich regions in the minor groove of DNA. Moreover, this dye is very sensitive to DNA conformation (detect gradations of nuclear damage) and the staining protocol does not require previous permeabilization and/or fixation of the cells unlike other DNA dyes, such as DAPI [16]. SYTOX Green stains only

bacteria with damaged membranes and is highly fluorescent when is bound to DNA [17] in contrast to conventional dead DNA probes, such as propidium iodide (PI), which has low extinction coefficient and hence relatively low fluorescence [18]. We selected a mixture of these fluorochromes because they differ both in their spectral characteristics and in their ability to penetrate healthy bacterial cells. Samples were observed with an 63x/1.40 oil immersion objective using a zoom of 2.0. Blue (live cells) and green (dead cells) pseudocolors were used in a sequential scan in two channels to distinguish the fluorescence emitted by Hoechst 33342 (414–464 nm) and SYTOX Green (520–580 nm), respectively (Fig. 1a, b). From each pair of images (blue and green), the corresponding confocal overlay image was acquired (Fig. 1c). Finally, once the CLSM images were obtained from each *M. luteus* DE2008 stained culture sample, the *ImageJ v1.41* software was applied to generate the summa binary image (Fig. 1d) and determine the viability, and the total and individual biomasses.

### Applicability of the FLU-CLSM-IA Method to Determine the Salinity Effect on *M. luteus* DE2008

The FLU-CLSM-IA was applied to determine the effect of an environmental parameter, such as salinity, on the viability and biomass of the heterotrophic microorganism, *M. luteus* DE2008. Salinity was chosen, among other physicochemical parameters, because *M. luteus* DE2008 come from Ebro Delta microbial mats, which are considered to be extreme saline environments [19, 20]. The results obtained by FLU-CLSM-IA shown at 10‰ NaCl, the maximum percentage of live cells and biomass, after 12 h of exposition. The viability results show that the effect of salinity on *M. luteus* DE2008 varied significantly depending on the concentration (Fig. 2a). A decreasing viability from  $94\% \pm 0.33$  at 10‰ NaCl to  $66.75\% \pm 2.55$  at 100‰ NaCl was observed. The differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ) from 75‰ with respect to 10‰ NaCl. Thus, the total biomass (live cells) expressed in  $\text{mgC}/\text{cm}^3$  decreased from  $80.34 \text{ mgC}/\text{cm}^3 \pm 3.24$  at 10‰ NaCl to  $42.9 \pm 2.3$  and  $40.59 \pm 2.85 \text{ mgC}/\text{cm}^3$  at 75 and 100‰ NaCl, respectively (Fig. 2b). This high salinity tolerance of this microorganism is explained by the salinity ranges from 40 to 70‰ of Ebro Delta microbial mats [19, 20], where *M. luteus* DE2008 was isolated [21]. Also, a reduction in both the number of cells and their biovolume can be observed as the salt concentration increases. So, the individual biomass results show a decreasing value from  $0.03 \pm 0.001 \text{ mgC}/\text{cm}^3$  at 10‰ to  $0.021 \pm 0.001 \text{ mgC}/\text{cm}^3$  at 100‰ NaCl. Although different methodologies have been used to evaluate, the salinity effect on microbial diversity (microscopy, flow cytometry and DNA-based

**Fig. 1** CLSM images of *Micrococcus luteus* DE2008 stained with a mixture of two fluorochromes. **a** Image of blue pseudocolor (live cells) stained by Hoechst 33342 (excitation/emission = 405/band pass 414–464 nm). **b** Image of green pseudocolor (dead cells) stained by SYTOX Green (excitation/emission = 488/band pass 520–580 nm). **c** Overlay CLSM image of two pseudocolors. **d** Summa binary image obtained by ImageJ v1.41. 80 × 77 mm (300 × 300 DPI)



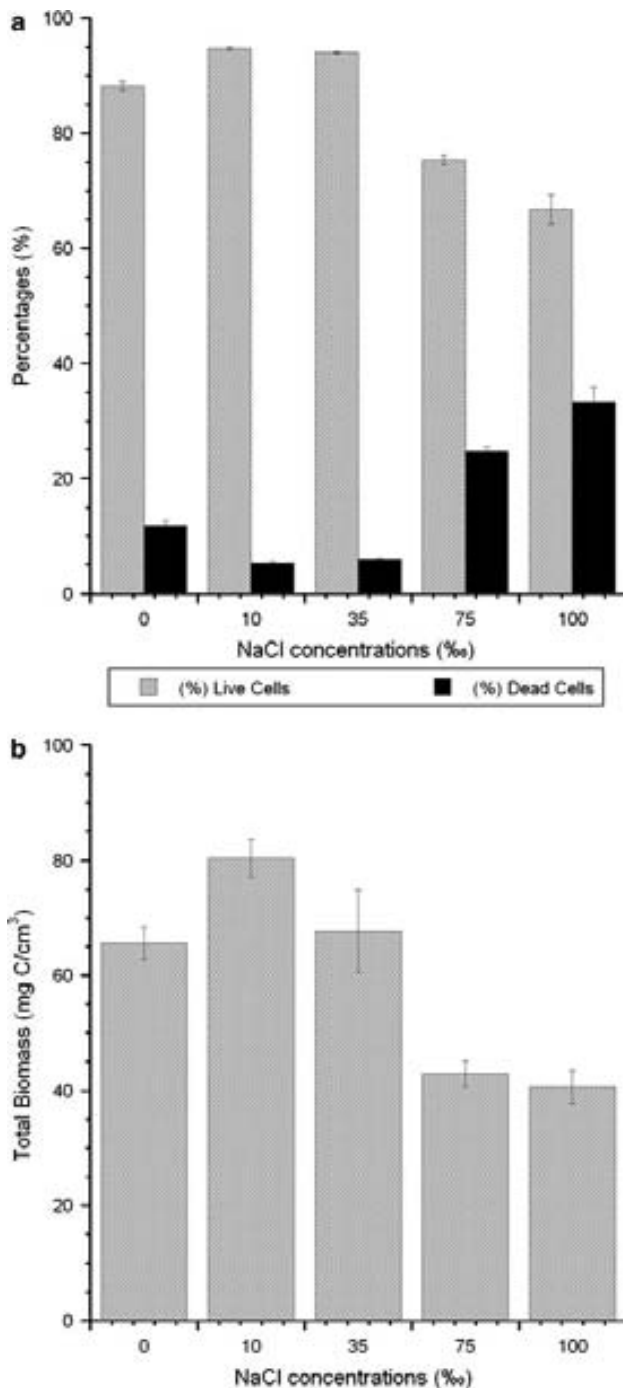
methods) and on biomass (pigment analysis, rates of gross photosynthesis and oxygen consumption by specific microsensors), they do not determine this effect in individual biomass [22, 23]. The FLU-CLSM-IA method, as well as analyze the cell viability of each image obtained at different salt concentrations, is useful to determine accurately, individual biovolume and biomass. A reduction in cell biovolume will be probably because of cell osmosis or other energetically costly processes the cells use to adapt to high saline concentrations [24].

#### Dormant Cells of *M. luteus* DE2008 Determined by Combining FLU-CLSM-IA and Plate Counts at Different Salinity Concentrations

In this study, the results obtained by plate counts have shown that the viability of the tolerant cells decreased from  $4.01 \pm 6.31 \times 10^8$  cfu/ml at 10‰ NaCl to 0 cfu/ml at 100‰ NaCl, which indicates that the optimal growth is between 0 and 10‰ and that this bacterium is unable to grow at 100‰ NaCl in this medium (Fig. 3). The differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ) from 75‰ with respect to 10‰ NaCl. These results are in accordance

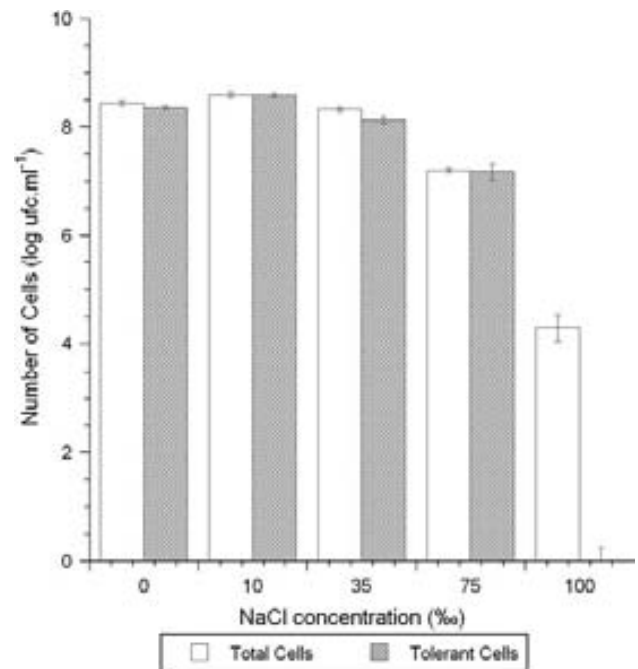
with those obtained by Kocur et al. [25], which demonstrated that *Micrococcus* sp. grows in 50‰ NaCl but not usually in 100 or 150‰. One of the mechanisms of salt adaptation that could explain this effect is that *M. luteus* produces highly salt-tolerant glutaminase, which is stable even at 2.74 M (160 ‰) NaCl with a residual activity of 40% [26], unlike most enzymes from non-halophilic microorganisms that are inhibited in high salt concentrations [27]. In addition, Nagata et al. [28] analyzed the effects of salt on *Escherichia coli*, a non-halophilic heterotrophic microorganism, and concluded that when the external concentration of NaCl is over 60‰ the cellular activities such as division, transport, and respiration are inhibited.

On the other hand, comparing the results obtained with FLU-CLSM-IA and plate counts, it can be observed that with the first method, live cells are detected in all the concentrations assayed, while with the second method, there are no viable cells at a concentration of 100‰ salt. Therefore, to determine whether the differences obtained were because of the presence of dormant cells, *M. luteus* DE2008 cultures exposed to the different salinity concentrations were spread onto plates with LB medium at 10‰



**Fig. 2** Application of the FLU-CLSM-IA method on *M. luteus* DE2008 at different NaCl concentrations. **a** Percentages of live and dead cells; **b** Total Biomass (only live cells) expressed in mgC/cm<sup>3</sup>. The bars indicate the Standard Error of the Means (SEM). 78 × 157 mm (600 × 600 DPI)

salt (optimal conditions). The dormant cells were determined as the difference between the total cells (corresponding to the bacteria growing at each salt concentration) and the tolerant cells (corresponding to the bacteria growing at 10‰ NaCl) at each salt concentration. The



**Fig. 3** Plate counts of *M. luteus* DE2008 growing at different NaCl concentration. The number of cells is expressed in log cfu/ml. The bars indicate the Standard Error of the Means (SEM). 39 × 39 mm (600 × 600 DPI)

number of dormant cells increases as the salt concentration increases, being from 0% at 10‰ NaCl to 100% at 100‰ NaCl (Fig. 3). These results agree with studies by Koltunov and colleagues [29], which suggested that this cellular state of low metabolic activity, called dormancy, can be considered a response to environmental stress. On the other hand, Yamamoto et al. [30] demonstrated that although the capacity to form colonies has been lost because of nutrient starvation, cells retain the DNA and RNA intact, and in favorable conditions can recover, elongate, and multiply.

Finally, the results obtained using FLU-CLSM-IA combined with those achieved by plate counts enabled us to determine, for first time, the viability and the total biomass of the dormant cells, which can reach a viability of 66.75% and a total biomass of 40.59 mgC/cm<sup>3</sup> at 100‰ NaCl. These results also suggest that *M. luteus* DE2008 cells that are blue when stained with Hoechst 33342 and observed by CLSM are possibly dormant cells.

In conclusion, the results presented in this study, although the viability and biomass (live cells) of *M. luteus* DE2008 decrease with the increase in salinity concentration, it shows high tolerance to extreme saline conditions, such as those of the microbial mats from the Ebro delta. Finally, we think that FLU-CLSM-IA could be an efficient, fast, and reliable method for making a total count of cells at pixel level, including dormant cells to evaluate the viability and the biomass (total and individual). Though this study

was done on *M. luteus* DE2008, the same methodology could probably be applied to heterotrophic microorganisms in general.

**Acknowledgments** This research was supported by the following grants: DGICYT (CGL2008-01891/BOS) and a UAB postgraduate scholarship to Zully M. Puyen. We express our thanks to the staff of the Servei de Microscòpia at the Universitat Autònoma de Barcelona for technical assistance with the confocal microscopy. We also thank Marc Alamany and Francesc Fornells from Ecología Portuaria S. L. (Spain), who provided valuable comments on the manuscript. Finally, we acknowledge Elia Diestra, Pilar Jarque, and Cristina Sosa for their help in this study.

## References

1. Diestra E, Sole A, Marti M et al (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
2. Greenblatt CL, Baum J, Klein BY et al (2004) *Micrococcus luteus*: survival in amber. *Microb Ecol* 48:120–127
3. Votyakova TV, Kaprelyants AS, Kell DB (1994) Influence of viable cells on the resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase: the population effect. *Appl Environ Microbiol* 60:3284–3291
4. Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH et al (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169–187
5. Roszak DB, Colwell RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* 51:365–379
6. Harris CM, Kell DB (1985) The estimation of microbial biomass. *Biosensors* 1:17–84
7. Sonnleitner B, Locher G, Fiechter A (1992) Biomass determination. *J Biotechnol* 25:5–22
8. Neu TR, Woelfl S, Lawrence JR (2004) Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J Microbiol Methods* 56:161–172
9. Lawrence JR, Neu TR (1999) Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol* 310:131–144
10. Oh KB, Matsuoka H (2002) Rapid viability assessment of yeast cells using vital staining with 2-NBDG, a fluorescent derivative of glucose. *Int J Food Microbiol* 76:47–53
11. Sole A, Gaju N, Mendez-Alvarez S et al (2001) Confocal laser scanning microscopy as a tool to determine cyanobacteria biomass in microbial mats. *J Microsc* 204:258–262
12. Solé A, Mas J, Esteve I (2007) A new method based on image analysis for determining cyanobacterial biomass by CLSM in stratified benthic sediments. *Ultramicroscopy* 107:669–673
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
14. Rasband WS (1997-2010) ImageJ. US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. HYPERLINK “<http://rsb.info.nih.gov/ij>” “\t “\_blank” <http://rsb.info.nih.gov/ij>
15. Bloem J, Veninga M, Shepherd J (1995) Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl Environ Microbiol* 61:926–936
16. Chazotte B (2010) Labeling Nuclear DNA using DAPI. In: Yuste (ed) *Imaging: a laboratory manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor
17. Roth B, Poot M, Yue ST, Millard PJ (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol* 63:2421–2431
18. Breeuwer P, Abee T (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 55:193–200
19. Esteve I, Martinez-Alonso M, Mir J, Guerrero R (1992) Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain: a preliminary study. *Limnetica* 8:185–195
20. Martinez-Alonso M, Mir J, Caumette P et al (2004) Distribution of phototrophic populations and primary production in a microbial mat from the Ebro Delta, Spain. *Int Microbiol* 7:19–25
21. Maldonado J, Diestra E, Huang L et al (2010) Isolation of a bacterium with high tolerance to lead and copper from a marine microbial mat in Spain. *Ann Microbiol* 60:113–120
22. Abed RMM, Kohls K, De Beer D (2007) Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environ Microbiol* 9(6):1384–1392
23. Estrada M, Henriksen P, Gasol JM et al (2004) Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 49:281–293
24. Oren A (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(2):334–348
25. Kocur M, Smid B, Martinec T (1972) The fine structure of extreme halophilic cocci. *Microbios* 5:101–107
26. Moriguchi M, Sakai K, Tateyama R et al (1994) Isolation and characterization of salttolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. *J Ferment Bioeng* 77:621–625
27. Madern D, Ebel C, Zaccai G (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4:91–98
28. Nagata S, Wang Y, Zhang H et al (2009) Effect of moderate salinity stress treatment on the stimulation of proline uptake and growth in *Escherichia coli* CSH4 and its mutants under high salinity. *J Biosci Bioeng* 108:205–210
29. Koltunov V, Greenblatt CL, Goncharenko AV et al (2010) Structural changes and cellular localization of resuscitation-promoting factor in environmental isolates of *Micrococcus luteus*. *Microb Ecol* 59:296–310
30. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple nutrient starvation. *FEMS Microbiol Ecol* 20:149–154



# Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008

Zully M. Puyen, Eduard Villagrasa, Juan Maldonado, Elia Diestra, Isabel Esteve, Antoni Solé\*

Department of Genetics and Microbiology, Biosciences Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C-Campus de la UAB, Bellaterra 08193, Barcelona, Spain

## HIGHLIGHTS

- ▶ *Micrococcus luteus* DE2008 is capable of absorbing lead and copper.
- ▶ There is an inverse correlation between biomass and viability of *M. luteus* DE2008 and metal concentration.
- ▶ Copper has a greater toxic effect than lead on *M. luteus* DE2008.
- ▶ *M. luteus* DE2008 could be considered for bioremediation of lead-contaminated environments.

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 10 February 2012  
 Received in revised form 12 September 2012  
 Accepted 13 September 2012  
 Available online 25 September 2012

### Keywords:

Micrococcus  
 Lead  
 Copper  
 Biosorption  
 Biomass

## ABSTRACT

*Micrococcus luteus* DE2008 has the ability to absorb lead and copper. The effect of these metals on biomass and viability of this microorganism were investigated and removal of the metals from culture media was determined.

Lead had no effect on the biomass expressed as mg Carbon/cm<sup>3</sup> of *M. luteus* DE2008, but in the case of copper, the minimum metal concentration that affected the biomass was 0.1 mM Cu(II). According to these results this microorganism shows a greater tolerance for lead. The minimum metal concentration that affected viability (expressed as the percentage of live cells) was 0.5 mM for both metals. *M. luteus* DE2008 exhibited a specific removal capacity of 408 mg/g for copper and 1965 mg/g for lead. This microorganism has a greater ability to absorb Pb(II) than Cu(II). *M. luteus* DE2008 could be seen as a microorganism capable of restoring environments polluted by lead and copper.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Contamination of natural habitats by heavy metals through industrial and agricultural activities has the potential of affecting the health of living beings and the environment due to the toxicity of these substances and the difficulty in their remediation (Bahadir et al., 2007; Pérez-Marín et al., 2008). For example, a large area of the Ebro delta (Tarragona, Spain) has been affected by lead and copper as a consequence of the use of lead bullets for hunting (Mateo et al., 1997) and of pesticides for the protection of rice crops (Mañosa et al., 2001).

A consortium of *Microcoleus* sp. (cyanobacterium) and different heterotrophic bacteria was isolated from microbial mats located in the Ebro delta (Diestra et al., 2005). *Micrococcus luteus* DE2008 is a member of this consortium and is able to accumulate lead and copper extracellularly in layers of extracellular polymeric substances (EPS) (Maldonado et al., 2010). The ability of some microorganisms to bind metals and convert some of them to less toxic species

(Congeevaram et al., 2007; Guo et al., 2010) has been demonstrated as an alternative to current remediation methods such as precipitation, filtration, ion exchange, electrochemical treatment, and membrane technologies (Volesky, 2001; Bai et al., 2008; Wang and Chen, 2009).

In the present study the absorption capacity of *M. luteus* DE2008 for Pb(II) and Cu(II) in laboratory cultures was determined and the effect of different concentrations of Pb(II) and Cu(II) on total biomass, mass of individual cells and viability was investigated. Changes in the EPS and the capacity of this microorganism to remove Pb(II) and Cu(II) from cultures were also monitored.

## 2. Methods

### 2.1. Bacterial strain and culture conditions

*M. luteus* DE2008, isolated from a *Microcoleus* sp. consortium (Diestra et al., 2005) was grown at 27 °C in Luria–Bertani (LB) agar medium containing tryptone (10.0 g/L), yeast extract (5.0 g/L), NaCl (10.0 g/L) and agar (15.0 g/L).

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 586 8289; fax: +34 93 581 2387.  
 E-mail address: [antoni.sole@uab.cat](mailto:antoni.sole@uab.cat) (A. Solé).

## 2.2. Preparation of heavy metal stock solutions

Lead and copper stock solutions were prepared as Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The 50 mM Pb(II) and Cu(II) stock solutions were prepared by dissolving the exact quantities of the Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub> in Milli-Q water and filtering through a 0.2-μm filter (Millex). Working concentrations of Pb(II) and Cu(II) were obtained by serial dilution. The stock solutions were stored in the dark at 4 °C.

## 2.3. Exposure of *M. luteus* DE2008 to different concentrations of Pb(II) and Cu(II)

One milliliter of an overnight culture (12 h) of *M. luteus* DE2008 grown on LB medium was inoculated into 19 ml of LB liquid medium with different Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or CuSO<sub>4</sub> concentrations. The cultures were incubated in an orbital shaker (220 rpm) at 27 °C for 12 h. The pH of the medium was adjusted to 6.5–7 with 1 M HCl or 1 M NaOH. Triplicate cultures were grown for each heavy metal concentration.

## 2.4. Estimation of biomass and viability of *M. luteus* DE2008

*M. luteus* DE2008 was exposed to Pb(II) and Cu(II) concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 1.5 mM and total biomass, mass of individual cells and viability of this microorganism at different Pb(II) and Cu(II) concentrations were determined following the fluorochromes-confocal laser scanning-image analysis method (FLU-CLSM-IA) described by Puyen et al. (2012). This method combines the use of the fluorochromes, CLSM (confocal laser scanning microscope) and image analysis using the *ImageJ* v1.41 program (Rasband, 1997–2010).

Fluorescence microscopy analysis was performed using a CSLM (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany). Blue (live cells) and green (dead cells) pseudocolors were used in a sequential scan in two channels to distinguish the fluorescence emitted by Hoechst 33342 (414–464 nm) and SYTOX Green (520–580 nm), respectively. For every culture of *M. luteus* DE2008 at different Pb(II) and Cu(II) concentrations, 20 confocal images were acquired to calculate total biomass and viability. Moreover, to calculate the mass of individual cells, 20 live single cells from each sample were selected using the ROIs (region of interest) function from the *ImageJ* software and analyzed following the method mentioned above.

## 2.5. Visualization of the cell structure of *M. luteus* DE2008 by scanning electron microscopy (SEM)

Samples of *M. luteus* DE2008 cultures were fixed in 2.5% glutaraldehyde in Millonig buffer phosphate for 2 h (Millonig, 1961), washed four times in the same buffer, dehydrated in increasing concentrations of acetone (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%), and dried by critical-point drying. Samples were mounted on metal stubs and coated with gold. A Jeol JSM-6300 scanning electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) was used to generate the images.

## 2.6. Biochemical analysis of the extracellular polymeric substances (EPS) of *M. luteus* DE2008

EPS was extracted as described by Adav and Lee (2008) with some modifications. Thirty ml of culture was centrifuged at 2000g for 10 min at 4 °C (Eppendorf 5804R). The supernatant was removed and the pellet was re-suspended in 10 mL of sterile Milli-Q water. The cell suspension was mixed with 0.60 mL of formamide and incubated on ice for 1 h. Four milliliter of 1 N NaOH was added and the mixture was incubated for 40 min on ice. The mixture was subjected to ultrasound at 120 W for 5 min on ice in

an ultrasonic bath (Sonorex, Bandelin). The sonicated sample was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C and filtered through a 0.2-μm filter (Millex) to collect the soluble fraction (EPS). The EPS extracts were stored at –20 °C. Cell damage was assessed by quantification of DNA present in the EPS extracts by the diphenylamine colorimetric method (Burton, 1956) using salmon sperm DNA (1 mg/mL in a Tris–EDTA buffer solution) as standard. The carbohydrate content of the EPS was measured by the phenol sulfuric method (Dubois et al., 1956) with glucose (4 mg/ml in a Milli-Q water solution, Merck) as standard. Protein content was measured by the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine albumin serum (2 mg/mL in a 0.9% aqueous NaCl solution, Pierce) as standard. Uronic acid content was determined by the *m*-hydroxyphenyl method (Kintner and Van Buren, 1982) using galacturonic acid (0.4 mg/mL in a MilliQ water solution, Fluka) as standard. Twenty replicates were analyzed in each experiment. The dry weights (DW) of untreated and EPS-free cells pellets were obtained after lyophilization for 48–72 h. The EPS DW was obtained as the difference.

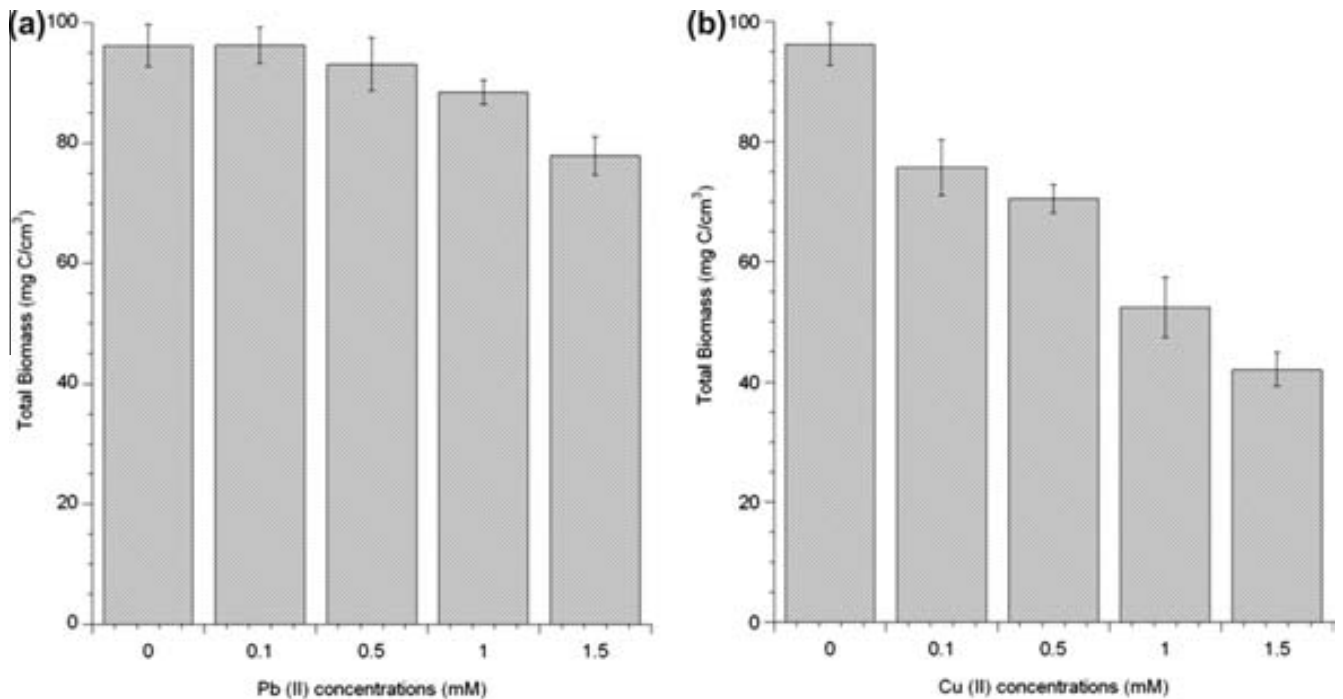
## 2.7. Removal of Pb(II) and Cu(II) by growing *M. luteus* DE2008

Four ml of 12-h cultures was inoculated into 76 mL of LB medium (without NaCl) in 100-mL conical flasks containing 0, 0.5, 1 and 1.5 mM of Pb(II) and Cu(II). The pH of the medium was adjusted to 6.5–7 with 1 M HCl or 1 M NaOH and the flasks were incubated in an orbital shaker (220 rpm) at 27 °C for 12 h. In all experiments, control sets without any added bacterial cells were also incubated. All experiments were performed in triplicate. The cultures were centrifuged at 8000g for 15 min. The biosorption yields of *M. luteus* DE2008 were calculated as the percentage difference between the initial and final concentrations of Pb(II) and Cu(II) in the supernatants (Radhika et al., 2006). Specific metal removal (*q*), expressed as (mg metal removed)/(g dry weight)<sup>–1</sup> was calculated as:  $q \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = V(C_i - C_f)m^{-1}$ , where *V* is the sample volume (L), *C<sub>i</sub>* and *C<sub>f</sub>* are the initial and final metal concentrations (mgL<sup>–1</sup>), respectively, and *m* is the amount (g) of dry biomass (Volesky and May-Phillips, 1995). The dry weight was obtained by centrifugation of 4 ml of a 12-h culture and lyophilization of the cell pellet for 48 h. Concentrations of Pb(II) and Cu(II) were determined by a Perkin-Elmer OPTIMA-3200RL inductively coupled plasma optical spectrometer (ICP-OES). The analytical wavelengths were set at 220.35 and 324.75 nm for detection of Pb(II) and Cu(II), respectively.

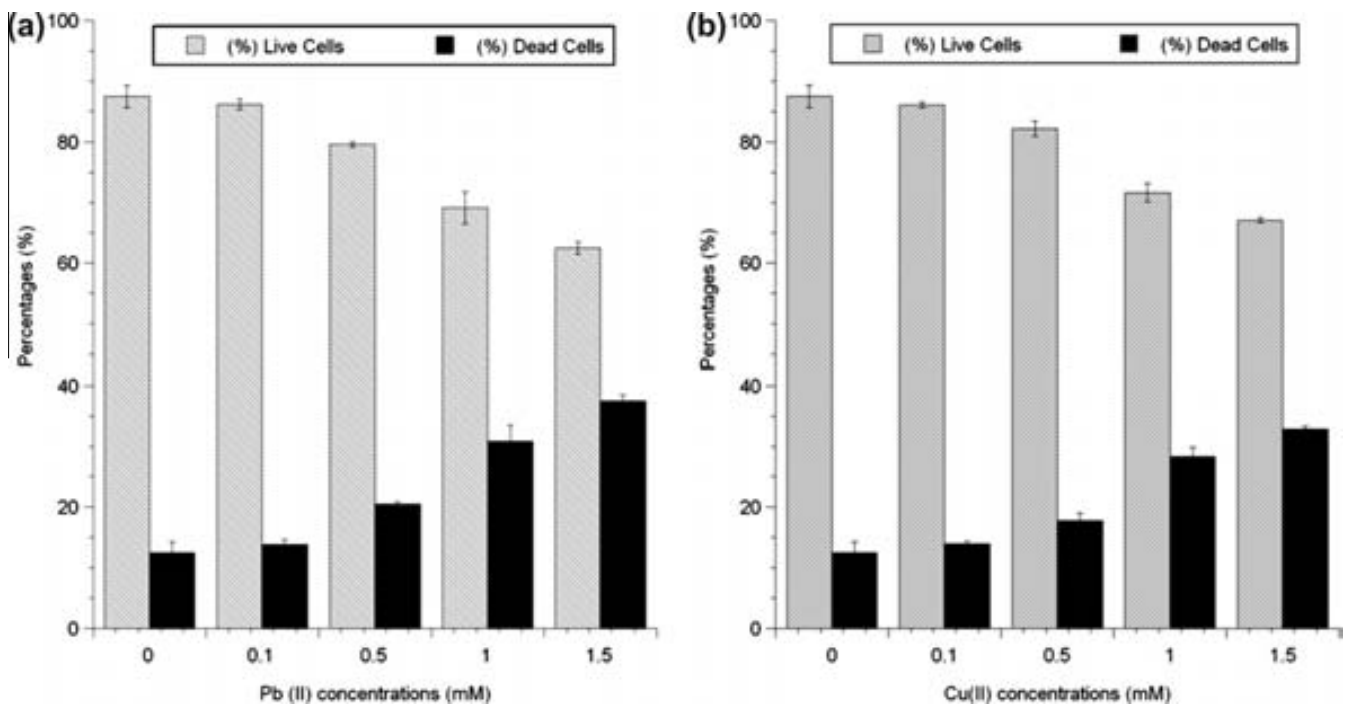
## 3. Results and discussion

### 3.1. Changes in total biomass and mass of individual cells

The total biomass of *M. luteus* DE2008 was 96.25 mg Carbon/cm<sup>3</sup> (in the control experiment), but 77.88 and 42.11 mgC/cm<sup>3</sup> after growth in the presence of 1.5 mM Pb(II) and Cu(II), respectively (Fig. 1a and b). In Pb-containing cultures, no statistically significant differences in total biomass were observed between the conditions tested with respect to the control, while differences were observed for copper ( $F = 236.980$ ) ( $p < 0.05$ ). Using the Tukey and Bonferroni comparison tests, the minimum metal concentration (when compared with the control) that affected significantly ( $p < 0.05$ ) the total biomass was 0.1 mM Cu(II). Similarly, the mass of individual cells decreased from 0.03 mgC/cm<sup>3</sup> in the control experiment to 0.022 mgC/cm<sup>3</sup> at 1.5 mM Pb(II) and 0.018 mgC/cm<sup>3</sup> at 1.5 mM Cu(II). A reduction in both the number of cells and their biovolume was observed as the Pb(II) and Cu(II) concentration increased, which agrees with the results obtained for the total biomass. Studying the effect of these metals on *Micrococcus*



**Fig. 1.** Total Biomass (mg Carbon/cm<sup>3</sup>) of *Micrococcus luteus* DE2008 at different (a) Pb(II) and (b) Cu(II) concentrations determined with the FLU-CLSM-IA (fluorochromes - confocal laser scanning - image analysis) method (Puyen et al., 2012).



**Fig. 2.** Percentages of live and dead cells of *Micrococcus luteus* DE2008 at different (a) Pb(II) and (b) Cu(II) concentrations calculated with the FLU CLSM-IA method (Puyen et al., 2012). The bars indicate the Standard Error of the Means (S.E.M.).

and *Pseudomonas*, Benka-Coker and Ekundayo (1998) also showed that there was an inverse relation between the concentration of the metals and the number of cells, in spite of having used lesser concentrations of metals, greater time of exposure and a different study technique (plate counts) to that used in this current work. The FLU-CLSM-IA technique has the advantage of allowing the determination of both total and individual biomass, without the need for growth in a solid medium.

### 3.2. Changes in viability

The viability expressed as the percentage (%) of live cells among all cells (live and dead) was inversely proportional to the concentration of Pb(II) and Cu(II) in the medium. Viability was 87.52% in the control, but 62.5 and 67% after exposure to 1.5 mM Pb(II) and Cu(II), respectively (Fig. 2a and b). Statistically significant differences were found between the conditions tested for Pb



**Table 1**  
Mass of live cells (mg Carbon/cm<sup>3</sup>) of *Micrococcus luteus* DE2008 at different Pb(II) and Cu(II) concentrations.

Heavy metal concentration (mM)	Biomass of live cells (mg C/cm <sup>3</sup> )	
	Pb(II)	Cu(II)
0	84.24	84.24
0.1	83.07	65.19
0.5	74.14	57.96
1.0	61.2	37.5
1.5	48.68	28.25

( $F = 236.980$ ) ( $p < 0.05$ ) and Cu ( $F = 278.870$ ) ( $p < 0.05$ ). Using the Tukey and Bonferroni comparison tests, the minimum metal concentration (when compared with the control) that affected significantly ( $p < 0.05$ ) the viability was 0.5 mM Pb(II) and Cu(II). By correlating the results for total biomass with the cellular viability of *M. luteus* DE2008, the mass of live cells (mgC/cm<sup>3</sup>) at different Pb(II) and Cu(II) concentrations was calculated (Table 1). The mass of live cells decreased as the concentration of the metals increased.

### 3.3. Changes in cell structure of *M. luteus* DE2008 growing at different metal concentrations

The size (diameter) of cells increased from  $1.01 \pm 0.016 \mu\text{m}$  (in the control experiment) to  $1.38 \pm 0.009$  and  $1.27 \pm 0.013$  in cultures exposed to 0.5 mM lead and copper, respectively; however, the diameter decreased to  $1.18 \pm 0.01$  and  $1.11 \pm 0.004 \mu\text{m}$  in the presence of 1.5 mM Pb(II) and Cu(II) (see supplementary data). Statistically significant differences were found between the conditions tested for Pb ( $F = 222.980$ ) ( $p < 0.05$ ) and for Cu ( $F = 258.870$ ) ( $p < 0.05$ ) with respect to the control experiment.

### 3.4. EPS composition and production by *M. luteus* DE2008 at different metal concentrations

Less than 0.2 mg of DNA per g DW was observed in all cases, which confirmed that there had been little to no cellular lysis during EPS extraction (Liu and Fang, 2003; Adav and Lee, 2008). The EPS composition and production of *M. luteus* DE2008 grown with and without metal (0.5 and 1.5 mM Pb(II) and Cu(II), respectively)

is shown in Table 2. Carbohydrates (71%) and proteins (28%) were the largest fractions in the control experiment. These results are in accordance with those obtained by Sutherland (1997) who considered carbohydrates to be the main constituent of EPS in pure cultures. The EPS composition and production changed with the Pb(II) and Cu(II) concentration in the medium. The highest EPS production was obtained at a concentration of 0.5 mM Pb(II) and Cu(II); it was 70% lower at 1.5 mM of both metals. The increase in EPS production coincided with an increase in the cellular diameter of metal-exposed cells. These results indicate a response by the cells to the toxic effect of the metals, as shown for other microorganisms (Decho, 1994).

Furthermore, an increase in carbohydrate (higher in lead than copper) and uronic acid contents (with no difference for the two metals) at a concentration of 0.5 mM was observed, whereas the protein content remained the same regardless of the metal content. However, the content of the different components of the EPS of *M. luteus* DE2008 decreased drastically at 1.5 mM Pb(II) and Cu(II).

### 3.5. Removal of lead and copper by growing *M. luteus* DE2008

The higher the initial concentration of metal in the medium, the higher the values for biosorption yield (%) and specific metal removal ( $q$ ) (Table 3). In addition, when *M. luteus* DE2008 was in contact with lead or copper, this microorganism showed more affinity to removing Pb(II) than Cu(II), as the biosorption yields (%) and specific metal removal ( $q$ ) were higher for Pb(II) than Cu(II) (Table 3). Similar results were obtained with a *Gloeotheca* sp. (Pereira et al., 2011) and *Bacillus* sp. (Guo et al., 2010).

## 4. Conclusions

*M. luteus* DE2008 could be seen as a microorganism capable of restoring polluted environments by lead and copper, as it meets the following conditions: (i) it is indigenous in Ebro delta microbial mats, an ecosystem polluted by both metals; (ii) it is easy to grow in axenic cultures; (iii) it is able to absorb both metals in EPS envelopes and (iv) it exhibits a great tolerance to and a high removal affinity for lead and copper.

**Table 2**  
Extracellular polymeric substances (EPS) composition and production of *Micrococcus luteus* DE2008 at different Pb(II) and Cu(II) concentrations.

Heavy metal	Concentrations (mM)	Total of components ( $\mu\text{g g EPS}^{-1} \text{ g DW}^{-1}$ )	Protein ( $\mu\text{g g EPS}^{-1} \text{ g DW}^{-1}$ )	Uronic acid ( $\mu\text{g g EPS}^{-1} \text{ g DW}^{-1}$ )	Carbohydrate ( $\mu\text{g g EPS}^{-1} \text{ g DW}^{-1}$ )
Control	0	$36.93 \pm 2.241$	$10.270 \pm 2.015$	$0.523 \pm 0.218$	$26.1355 \pm 4.49$
Pb(II)	0.5	$74.78 \pm 3.01$	$10.967 \pm 1.84$	$2.095 \pm 0.60$	$61.717 \pm 6.61$
	1.5	$8.596 \pm 0.1$	$3.741 \pm 0.31$	$0.243 \pm 0.02$	$4.612 \pm 0.01$
Cu(II)	0.5	$64.04 \pm 1.65$	$10.256 \pm 2.51$	$2.616 \pm 0.58$	$51.165 \pm 1.86$
	1.5	$10.016 \pm 0.57$	$2.710 \pm 0.19$	$0.109 \pm 0.07$	$7.197 \pm 1.46$

**Table 3**  
Removal capacity for Pb(II) and Cu(II) by *Micrococcus luteus* DE2008.

Heavy metal	Initial metal concentration (mg/L)	Final metal concentration (mg/L)	Metal adsorbed (mg/L)	% Biosorption	Specific metal removal ( $q$ ) <sup>a</sup>
Pb(II)	91.06 (~0.5 mM)	68.01	23.05	25.31	461
	184.26 (~1.0 mM)	122.7	61.56	33.41	1231
	272.39 (~1.5 mM)	174.14	98.25	36.07	1965
Cu(II)	24.99 (~0.5 mM)	21.27	3.73	14.91	75
	54.3 (~1.0 mM)	41.69	12.61	23.22	252
	80.24 (~1.5 mM)	59.84	20.40	25.42	408

<sup>a</sup> Specific metal removal ( $q$ ) expressed as (mg metal removed) (g dry biomass)<sup>-1</sup>.

## Acknowledgements

This research was supported by the following grants: DGICYT (CGL2008-01891/BOS) and a UAB postgraduate scholarship to Zully M. Puyen. We express our thanks to the staff of the Servei de Microscòpia at the Universitat Autònoma de Barcelona and of the Serveis Científicotècnics at the Universitat de Barcelona. We also thank Marc Alaman and Francesc Fornells from Ecología Portuaria S. L. (Spain), who provided valuable comments on the manuscript. Finally, we acknowledge Pilar Jarque and Cristina Sosa for their help with this work.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.036>.

## References

- Adav, S.S., Lee, D.J., 2008. Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J. Hazard. Mater.* 154, 1120–1126.
- Bahadir, T., Bakan, G., Altas, L., Buykgungar, H., 2007. The investigation of lead removal by biosorption. An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme Microbiol. Technol.* 41, 98–102.
- 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.
- Benka-Coker, M.O., Ekundayo, J.A., 1998. Effects of heavy metals on growth of species of *Micrococcus* and *Pseudomonas* in a crude oil/mineral salts medium. *Bioresour. Technol.* 66, 241–245.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Burton, K., 1956. A Study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic. *Acid. Biochem J.* 62 (2), 315–323.
- 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.
- Decho, A.W., 1994. Exopolymers in microbial mats: assessing their adaptative roles. In: Stal, L.J., Caumette, P. (Eds.), *Microbial Mats. Structure, Development and Environment Significance*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 215–219.
- Diestra, E., Solé, A., Martí, M., García de Oteya, 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.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- 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. *Biores. Technol.* 101, 8599–8605.
- Kintner, P.K., Van Buren, J.P., 1982. Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using m-hydroxydiphenyl method. *J. Food Science* 47, 756–760.
- Liu, Y., Fang, H.P., 2003. Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 33, 237–273.
- Maldonado, J., Diestra, E., Huang, L., Domènech, A.M., Villagrasa, E., Puyen, Z.M., Duran, R., Esteve, I., Solé, A., 2010. 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.
- 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 waterflow. *Environ. Pollut.* 96, 335–341.
- Milloning, G., 1961. A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 736–739.
- 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? *Microbiology* 157, 451–458.
- Pérez-Marín, A.B., Ballester, A., González, F., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., Sáez, J., Meseguer Zapata, V., 2008. Study of cadmium, zinc and lead biosorption by orange wastes using the subsequent addition method. *Bioresour. Technol.* 99, 8101–8106.
- Puyen, Z.M., Villagrasa, E., Maldonado, J., Esteve, I., Solé, A., 2012. Viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochromes and CLSM-image analysis. *Curr. Microbiol.* 64, 75–80.
- Radhika, V., Subramanian, S., Natarajan, K.A., 2006. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. *Water Res.* 40, 3628–3636.
- Rasband, W.S., 1997–2010. *Image J*. US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Available from: <<http://rsb.info.nih.gov/ij>>.
- Sutherland, I.W., 1997. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure Appl. Chem.* 69, 1911–1917.
- Volesky, B., 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59, 203–216.
- Volesky, B., May-Phillips, H.A., 1995. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 (5), 797–806.
- Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27, 195–226.

**ANEXO I:** Artículo enviado para su aceptación.

**Toxicity and sequestration of chromium (III) on the cyanobacterium**

***Chroococcus* sp. PCC 9106. Microscopical and kinetics studies.**

Zully M. Puyen, Isabel Esteve, Juan Maldonado and Antoni Solé.

*Department of Genetics and Microbiology, Biosciences Faculty, Universitat*

*Autònoma de Barcelona, Edifici C-Campus de la UAB, Bellaterra 08193,*

*Barcelona, Spain*

**Abstract**

In this paper, the *in vivo* effect of Cr (III) in individual cells and the changes on the total biomass and viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 were investigated. Also, the capacity of this microorganism to sequester Cr (III) and its ability to remove it, from laboratory cultures were determined by microscopical and kinetics studies. The results indicated that the minimum dose of Cr (III) that was capable of significantly altering chlorophyll a fluorescence intensity was 0.26 mM, whilst the total biomass and viability were drastically reduced at 1 mM and 0.1 mM Cr (III), respectively.

Furthermore, *Chroococcus* sp. PCC 9106 had a great ability to remove Cr (III) extra and intracellularly, and a specific removal capacity of 54.4 mg/g at 72 h. Considering these results, it could be concluded that *Chroococcus* sp. PCC 9106 holds great promise in helping to detoxify environments polluted by this metal.

## Introduction

In natural environments, chromium has increased as a result of human activities such as electroplating, textile production, mining, wood preservation, animal husbandry and use as biocide in water-cooling for industrial and manufacturing plants. The breakdown and by-products generated as part of the production process of these activities end up in natural aquatic environments, leading to serious environmental and health problems (Someda et al., 2005; Anjana et al., 2007; Cheung and Gu, 2007; Srivastata et al., 2007).

The main forms of chromium that can be found in the aquatic environments are Cr (VI) and Cr (III) (Evangelou, 1998; Vignati et al., 2010). On the one hand, chromium (VI) is a more toxic form of the metal (Shanket et al., 2005), due to its association with oxygen as chromate ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) ions. However, in the presence of organic matter it is reduced to chromium (III), which occurs more rapidly in an acidic environment. On the other hand, chromium (III) is considered an essential trace element with known biological functions in all microorganisms. At high concentrations, however, it can be an important pollutant with toxic effects on both terrestrial and aquatic habitats (Pereira et al., 2005).

Microbial mats are coastal benthic stratified ecosystems formed by vertically laminated microbial communities, which develop coloured layers (Esteve et al., 1992; Guerrero et al., 1999). These mats can be found in deltas and contain cyanobacteria as the most abundant prokaryotic microorganisms. They are located mainly in the upper layers (green layer), and because of their large surface area, greater mucilage volume with high binding affinity and simple nutrient requirements (Roy et al., 1993) have gained consideration for their

potential use in pollution abatement (Thajuddin and Subramanian, 2005). The role of cyanobacteria in the degradation of aromatic hydrocarbons, pesticide degradation and metal biosorption has been researched by a variety of authors (Subramanian et al., 1994; Kumar et al., 2009; Kumar et al., 2011; Rajeshwari et al., 2011).

The Ebro delta (Tarragona, Spain) has been a protected area for over 25 years. Despite this, a large area of the delta has been affected by lead, copper and chromium as a consequence of the use of lead bullets for hunting (Mateo et al., 1997), pesticides for the protection of rice crops (Mañosa et al., 2000) and contamination by anthropogenic pollution (Bouza-Deaño et al., 2008).

In previous works and to determine the *in vivo* effect of different metals on phototrophic microorganisms and their capacity to remove them, our research group optimized a number of high-resolution microscopy techniques. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) both coupled to an electron dispersive X-ray detector (EDX) were used for this purpose (Burnat et al., 2009; 2010).

Recently, Maldonado et al. (2011) has also reported that *Chroococcus* sp. PCC 9106 shows a great tolerance to Pb (II) and Cu (II) and that this cyanobacterium has the ability to accumulate these heavy metals intra and extracellularly. In general, very little is known about the effect of Cr (III) in contaminated natural environments and in laboratory cultures. With this in mind, the aim of this study, as the first objective, was to determine the *in vivo* effect of Cr (III) in individual cells and the changes on the total biomass and viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 in laboratory cultures. And as a second objective, the aim was to

analyze the capacity of this microorganism to sequester Cr (III) and its ability to remove it.

## **Materials and methods**

### *Cyanobacteria strain and culture conditions*

In this paper, *Chroococcus* sp. PCC 9106 obtained of Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria was used due to this coccoid cyanobacterium is very abundant in Ebro delta microbial mats. The cultures were grown at 27°C and  $15 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$  in plates with a 1:1 (v/v) BG11 - ASN III mixture medium (Rippka et al., 1979).

### *Preparation of Heavy Metal Stock Solutions*

Chromium stock solution was prepared as  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_2$  (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The 5 mM Cr (III) stock solution was made by dissolving the exact quantities of the  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_2$  in Milli-Q water and filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter (Millex). Working concentration of Cr (III) was obtained by serial dilution of the stock solution. Heavy metal stock solution was stored in the dark at 4°C.

To determine the effect of Cr (III) on *Chroococcus* sp. PCC 9106, cultures of this microorganism were grown at 27°C and  $15 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$  in liquid BG11 - ASN III mixture medium supplemented with different  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_2$  concentrations for 9 days. Unpolluted culture was used as a control experiment. The pH of the medium was adjusted to 6.5-7 with 1M HCl or 1M NaOH and all cultures were made in triplicates.

### *Confocal laser scanning microscopy (CLSM)*

The confocal experiments were performed using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP5; Leica Heidelberg, Germany).

#### **$\lambda$ Scan function**

Cultures of *Chroococcus* sp. PCC 9106 strain were polluted at different Cr (III) concentrations: 0 (unpolluted culture), 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29 and 0.30 mM (polluted cultures). All experiments were performed under the same culture conditions mentioned in Section "Preparation of Heavy Metal Stock Solutions".

Pigment analysis of *Chroococcus* sp. PCC 9106 cultures was determined by  $\lambda$ scan function of CLSM. This technique provides information on the state of the photosynthetic pigments of phototrophic microorganisms on the basis of the emission wavelength region and the fluorescence intensity emitted (autofluorescence). 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. The sample excitation was carried out with an Argon Laser at 488nm ( $\lambda_{\text{exe}}$  488) with a  $\lambda$ step size of 3 nm for an emission wavelength between 550 and 750 nm. In order to measure the mean fluorescence intensity (MFI) of the xy $\lambda$  data sets, the Leica Confocal Software (Leica Microsystems CMS GmbH) was used. The regions-of-interest (ROIs) function of the software was used to measure the spectral signature of the samples. 70 ROIs of  $1\mu\text{m}^2$  taken from *Chroococcus* sp. PCC 9106 cells were analyzed per every culture tested. Finally, the minimum metal dose capable of

significantly altering the fluorescence intensity of chlorophyll *a* (Chl *a*) (used as a marker) of *Chroococcus* sp. PCC 9106 was determined.

### **Biomass and viability Estimations**

*Chroococcus* sp. PCC 9106 was exposed to Cr (III) concentrations of 0 (unpolluted culture), 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5 and 1 mM (polluted cultures). All experiments were performed under the same culture conditions mentioned in Section “Preparation of Heavy Metal Stock Solutions”.

The total biomass and viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 at different Cr (III) concentrations were obtained following a modification of the FLU-CLSM-IA method described by Puyen et al. (2012). This method combines the use of specific fluorochromes, CLSM and image analysis using the *ImageJ v1.41* program. This method originally used the Hoechst 33342 and SYTOX Green fluorochromes to stain the cells of an unpigmented microorganism. In this study, since *Chroococcus* sp. PCC 9106 has autofluorescence, in order to differentiate between living and dead cells, only SYTOX Green was used. Furthermore, the images obtained were transformed to binary images (black/white) using different fluorescence thresholds. Values of 50 and 80 were applied respectively to live and dead images from all concentrations assayed. A smoothing filter (median filter with a radius of 3.0 pixels) was then applied to the images. For every culture of *Chroococcus*, 20 confocal images were acquired to calculate the total biomass and viability.

### *Scanning electron microscopy (SEM)*

SEM was used to determine structural characteristics of *Chroococcus* sp. PCC 9106 cells and SEM coupled to EDX (SEM-EDX) to assess whether this



cyanobacterium was able to capture Cr (III) extracellularly. Unpolluted culture (0 mM) and cultures polluted with 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 mM Cr (III) were incubated under the same conditions indicated in Section “Preparation of Heavy Metal Stock Solutions”.

For SEM analysis, samples of *Chroococcus* sp. PCC 9106 cultures were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in Millonig buffer phosphate for 2 h (Millonig, 1961), washed four times in the same buffer, dehydrated in increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 90, and 100 %) and dried by critical-point drying. Finally, all samples were mounted on metal stubs and coated with gold. A Jeol JSM-6300 scanning electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) was used to view the images. To analyze the samples with SEM-EDX, an EDX Link Isis-200 (Oxford Instruments, Bucks, England) coupled to Zeiss EVO® MA 10 scanning electron microscope (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany) operated at 20 kV was used.

#### *Transmission electron microscopy (TEM)*

TEM was used to determine the ultrastructure of *Chroococcus* sp. PCC 9106 and TEM coupled to EDX (TEM-EDX) to assess whether this cyanobacterium strain was able to bioaccumulate intracellularly the studied metal. Culture conditions and metal concentrations used were the same as described for scanning electron microscopy. For TEM analysis samples were fixed in 2.5 % glutaraldehyde in Millonig buffer phosphate for 2 h (Millonig, 1961), washed in the same buffer, post-fixed in 1 % OsO<sub>4</sub> at 4°C for 2 h, and washed again. They were then dehydrated in a graded series (30, 50, 70, 90, and 100 %) of acetone and embedded in Spurr resin. To show a better quality image, ultrathin sections

of 70 nm were mounted on carbon coated copper grids and stained with acetate and lead citrate. Samples were viewed in a Hitachi H-7000 electron microscope (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). To analyze the samples with EDX, sections of 200 nm thick mounted on carbon-coated titanium grids were used. Samples were analyzed with an EDX Link Isis-200 (Oxford Instruments, Bucks, England) coupled to a Jeol Jem-2011 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) operated at 20 kV.

*Removal assays of Cr (III) by growing Chroococcus sp. PCC 9106*

Adsorption experiments were carried out by adding a fixed amount of living *Chroococcus* sp. PCC 9106 (2.2 mg) to 5 ml of liquid BG11 and ASN III mixture medium, supplemented in each culture with 0, 13, 26, 39, 52 and 78 mg/L Cr (III) and incubated at 27°C and  $15 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  for 9 days at pH 6.5. Samples were taken at predefined time intervals (0, 3, 6, 9, 12, 24, 72, 144 and 216 h), filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter (Millex) and the Cr (III) concentrations in the filtrate were analyzed by a Perkin-Elmer OPTIMA-3200RL inductively coupled plasma optical spectrometer (ICP-OES). The analytical wavelength was set at 267.716 for detection of Cr. All experiments were done in quadruplicates, yielding an experimental error of less than 5 %. In all experiments, a blank of each concentration without cells was used to ensure the metal uptake by the cyanobacterium. The dry weight used (2.2 mg) was obtained by centrifuging 10 ml of the cells suspension after 7 days of grown in plates and subsequently the pellet cell was lyophilized for 48 h. In order to determine the final metal content in the supernatant, duplicate subsamples of each culture were diluted with 20 % (v/v) Milli-Q water.

Efficiency of metal sorption was determined by the sorption capacity which is given as the amount of metal adsorption ( $q$ ) expressed as (mg metal removed). (g dry weight)<sup>-1</sup> and calculated as:  $q$  (mg/g) =  $V(C_i - C_o) \cdot m^{-1}$ , where  $V$  is the sample volume (L),  $C_i$  and  $C_o$  are the initial and final metal concentrations (mg/L), respectively, and  $m$  is the amount (g) of dry biomass (Volesky and May-Phillips, 1995).

On the other hand, adsorption isotherms explain the interaction of a sorbate molecule to the sorbent and are considered a critical parameter for designing sorption systems. The aqueous samples were taken to preset equilibrium time ( $t_e$ ) and the concentrations of metal were similarly measured as the above procedure. The amount of adsorption at equilibrium ( $q_e$ ), at equilibrium time ( $t_e$ ), was calculated from the following equation:  $q_e = V(C_o - C_e) \cdot m^{-1}$ , where  $C_o$  and  $C_e$  (mg/L) are the liquid phase concentrations of metal at initial and equilibrium, respectively.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey and Bonferroni comparison post hoc tests. Significant differences were accepted at  $p < 0.05$ . The analyses were performed using SPSS software (version 19.0 for Windows).

## **Results and discussion**

The aim of this study as was mentioned above was to determine as the first objective, the *in vivo* effect of Cr (III) in individual cells and the changes on

the total biomass and viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 in laboratory cultures.

#### *Effect of Cr (III) on Chroococcus sp. PCC 9106*

##### ***In vivo* effect of Cr (III) on pigments by means of the $\lambda$ Scan function of CLSM**

To determine the *in vivo* effect of Cr (III) on *Chroococcus* sp. PCC 9106 pigments, the  $\lambda$ scan function of CLSM was used. This method, allowed us to evaluate the physiological state of the cyanobacteria at single-cell level, considering changes in Chl *a* spectrum (maximum absorption at 682 nm). The autofluorescence detected in control cultures (without metal) corresponding to a xyz optical section is shown in Fig. 1a. The  $\lambda$ scan plot results (Fig. 1b) indicate that the pigment peak decreases while the concentration of metal increases. Statistically significant differences were found between all the conditions tested ( $F = 245.67$ ) ( $p < 0.05$ ). Using the Tukey and Bonferroni comparison tests, the only concentration that was not significantly different was 0.25 mM. This concentration had the same effect on the MFI that obtained in control experiment. Thus, the minimum metal dose capable of significantly altering the fluorescence intensity of chl *a* (used as a marker) of *Chroococcus* sp. PCC 9106 was 0.26 mM Cr (III). It is probable that this change was due to the degradation of photosynthetic pigments and to the formation of phaeophytins and the magnesium-free derivative of chlorophylls through the consequent diminishing of fluorescence in cyanobacteria (Beatriz Juarez et al., 2008). Likewise, an analog effect also has been demonstrated by various authors, that reported adverse effect of heavy metals including chromium on chloroplasts and

chlorophyll biosynthesis of some microalgae and higher plants (Stratton and Corke, 1979; Vajpayee et al., 2000).

### **Effect of Cr (III) on the total biomass and viability**

The total biomass expressed as  $\text{mgC/cm}^3$  of *Chroococcus* sp. PCC 9106 varied significantly depending on the metal concentration. A decreasing value from  $44.57 \text{ mgC/cm}^3$  (in the control experiment) to  $32.5 \text{ mgC/cm}^3$  at  $1.0 \text{ mM Cr (III)}$  was observed (Fig. 2a). The results obtained show that the total biomass of *Chroococcus* sp. PCC 9106 is inversely proportional to the concentration of chromium in the medium. Statistically significant differences were observed between all the conditions tested ( $F = 5.387$ ) ( $p < 0.05$ ). Using the Tukey and Bonferroni comparison tests, the minimum metal concentration (when compared with the control) that affected the total biomass was  $1.0 \text{ mM Cr}$ . These results are in accordance with those obtained by Pandi et al. (2007) who demonstrate that both biomass and chlorophyll content after 3 weeks showed gradual decrease with increasing concentration of chromium in the growth media.

In addition, the effect of Cr (III) on the viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 cells was evaluated (Fig. 2b). The results show that the viability, expressed in percentages (%), is also inversely proportional to the concentration of Cr (III) in the medium. A decreasing value from  $90.08 \%$  in the control experiment to  $70.28 \%$  at  $1.0 \text{ mM Cr (III)}$  in the viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106 was observed. Statistically significant differences were found between all the conditions tested ( $F = 20.876$ ) ( $p < 0.05$ ). Using the Tukey and Bonferroni comparison tests, the minimum metal concentration (when

compared with the control) that affected viability was 0.1 mM Cr (III). Similar results were obtained by Thompson et al. (2002) who demonstrate that Cr concentrations above 100  $\mu$ M (~ 0.1 mM) lead to a cessation in growth of *Synechococcus* sp. (unicellular cyanobacterium) and *Nostoc* sp. (filamentous cyanobacterium).

By correlating the results for total biomass with the cellular viability of *Chroococcus* sp. PCC 9106, the biomass of live cells ( $\text{mgC}/\text{cm}^3$ ) at different Cr (III) concentrations was calculated (Table 1). The changes on the biomass of live cells follow the same pattern that the viability percentages.

As was mentioned above, the second objective of this study was to analyze the heavy metal accumulation of *Chroococcus* sp. PCC 9106 at different concentrations of chromium and to quantify its capacity to remove it. To do this, first SEM-EDX and TEM-EDX were used to determine whether this cyanobacterium was able to capture Cr (III) extra and intracellularly, respectively. Thereafter, ICP-OES (inductively coupled plasma-optical emission spectrometry) was applied to obtain the adsorption efficiency and removal capacity of *Chroococcus* sp. PCC 9106.

#### *Heavy metal accumulation in Chroococcus sp. PCC 9106 by SEM-EDX and TEM-EDX*

With the aim of proving whether *Chroococcus* sp. PCC 9106 could capture metals extracellularly, cells from cultures growing with and without Cr (III) were analyzed by SEM-EDX. In control cultures Cr (III) was not detected externally (Fig. 3a and 3b). Cultures exposed to Cr (III) were also analyzed using the same above-mentioned procedure. The difference in the surface morphology

after the metal uptake is evident in the cyanobacterium (Fig. 3c). The surface of the cell becomes rough after metal uptakes, this was probably due to an increase in the EPS production. Other authors have demonstrated that the exposure to elevated concentrations of Cr (VI) affected the composition of EPS produced by *Chroococcus* sp. (Ozturk and Aslim, 2008). Moreover, It has been proved that different microorganisms have an EPS matrix which can protect cells against toxic compounds such as metals and that its presence can overproduce exopolymer secretion (Decho et al., 1994). Additionally, the SEM-EDX spectrum indicated that *Chroococcus* sp. PCC 9106 accumulated Cr (III) in the EPS (Fig. 3d). Different parts of the filter were also tested as a control that Cr (III) was retained only in cells, being the results negatives in all cases.

Furthermore, with the purpose of ascertaining whether this cyanobacterium could accumulate metal internally, cells from cultures growing with and without Cr (III) were analyzed by TEM-EDX. In control cultures Cr (III) was not detected internally (Fig. 4a and 4b). The ultrathin sections of this microorganism growing in polluted cultures showed abundant high electrondense inclusions of different sizes in its cytoplasm (Fig. 3.2.3.4c). EDX analysis of these inclusions demonstrates the presence of polyphosphate inclusions (PP) (see P and Ca peaks in this figure) which retain Cr (III) (Fig. 4d). The presence of these inside the cells is compatible with the theory exposed by Gadd (1988) which suggests that, once metals are inside the cell, they may bind to intracellular components. Further, similar inclusions have been found when cyanobacteria are grown in adverse culture conditions, including metal pollution (Stevens et al., 1985; Burnat et al., 2010; Maldonado et al., 2011),

suggesting that these kind of inclusions had a detoxifying effect by sequestering heavy metals (Goldberg et al., 2001).

#### *Batch equilibrium and kinetic studies*

Biosorption capacity is influenced by many factors including: properties of metal ions (radius of ion, valence, etc.) in aqueous solution, biosorption conditions (such as pH, temperature, contact time, the presence of other ions in the solution, initial concentration of metal ions and the biomass) and cyanobacterial species (Yongnian et al., 2002). In this study, the metal removal efficiency on *Chroococcus* sp. PCC 9106 from aqueous solutions was studied as a function of two important parameters: initial metal concentrations of the solution and contact time. The adsorption uptake versus the adsorption time at different initial metal concentrations is shown in Fig. 5. The amount of metal adsorbed (mg/g) increased as the time increased until reach the equilibrium (this state is considered the best to evaluate the biosorption process). The amount of metal removed at equilibrium also increased from 17 to 54 mg/g as the metal concentration from 13 to 39 mg/L increased. However, the adsorption uptake decrease at higher initial concentration (52 and 78 mg/L). Thus, the Cr (III) uptake process can be mainly divided into two stages: a rapid increases at the beginning of the incubation followed by slow uptake. These results are in agreement with those reported by Davis et al. (2003) in brown algae.

Additionally, the results obtained in this work also show that the equilibrium time required for the adsorption of Cr (III) on *Chroococcus* sp. PCC 9106 is 72 h with an initial metal concentrations of 13 - 39 mg/L. The samples were left for 216 hours to ensure equilibrium.



On the other hand, the specific metal removal at equilibrium ( $q_e$ ) expressed as (mg metal removed).(g dry biomass)<sup>-1</sup> of *Chroococcus* sp. PCC 9106 as a result of exposure to different Cr (III) concentrations was determined by ICP-OES. According to the results obtained (Table 2), the higher the initial concentration of Cr (III) in the medium (up to 39 mg/L), the higher the specific metal removal ( $q_e$ ) (up to 54 mg/g). However, from 52 mg/L Cr (III), the specific metal removal lightly decreases. Therefore, the concentration obtaining the highest value of the specific metal removal at 72 h (when equilibrium was attained) was 39 mg/L. This may be because total biomass was not significantly affected until this concentration of metal in the medium.

Finally, the adsorption isotherm is represented in Fig. 6. This isotherm indicates how the adsorption molecules distribute between the liquid phase and the solid phase when the adsorption process reaches an equilibrium state. In this figure, the contact time of 72 h was chosen for the determination of Cr uptake isotherm. Moreover, the isotherm shows an increase in metal uptake as the equilibrium concentration rises to 15 mg/L, indicating that the maximum adsorption ( $q_{max}$ ) of *Chroococcus* sp. PCC 9106 for Cr (III) is approximately 54 mg/g. Comparing these results with those reported by other authors, the  $q_{max}$  determined for *Chroococcus* sp. PCC 9106 was higher than those obtained by other phototrophic microorganisms (Jaggiello et al., 2006; Han et al., 2006; Bishnoi et al., 2007).

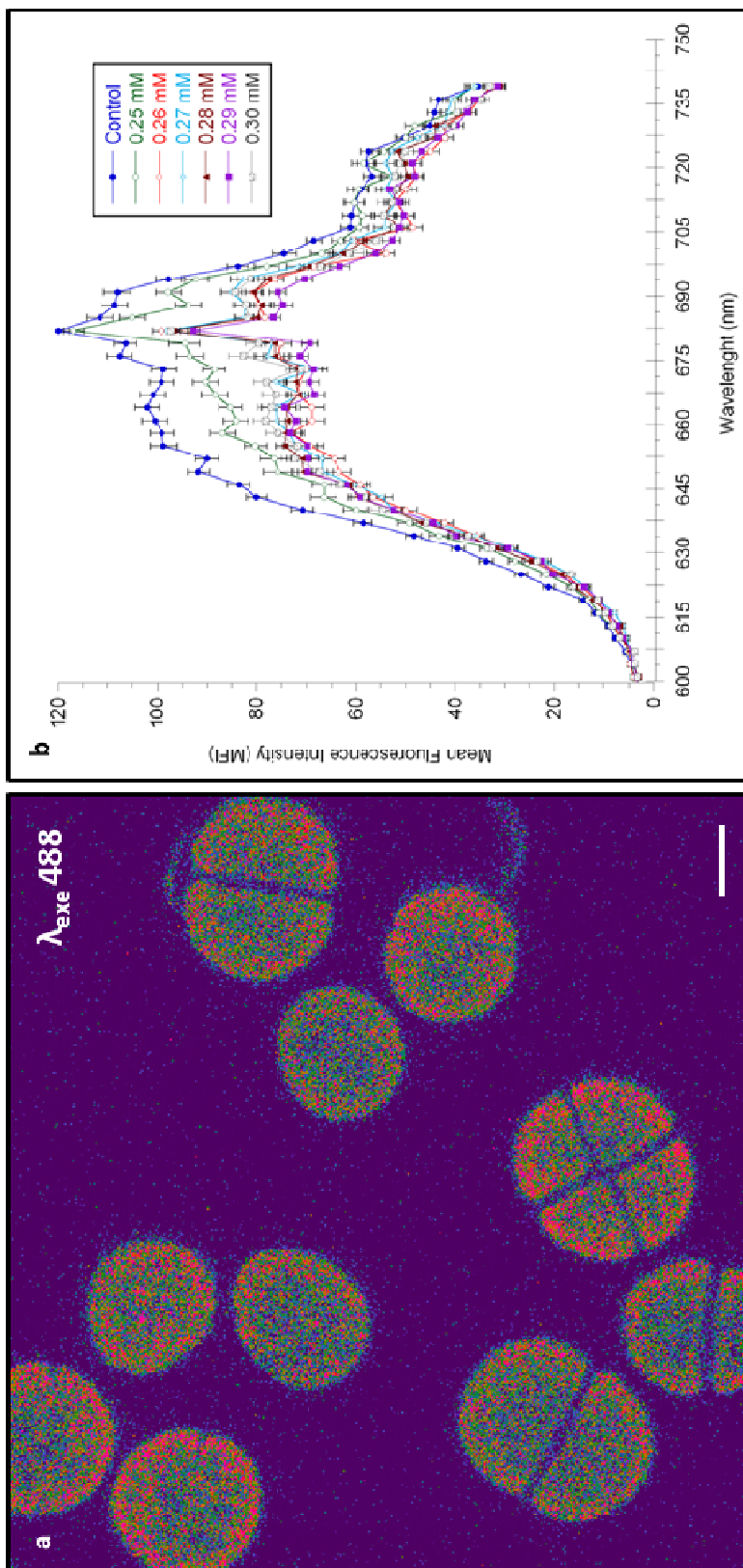
## Conclusions

*Chroococcus* sp. PCC 9106 is highly resistant to Cr (III), has a great ability to sequester this metal extra and intracellularly and has a high specific removal

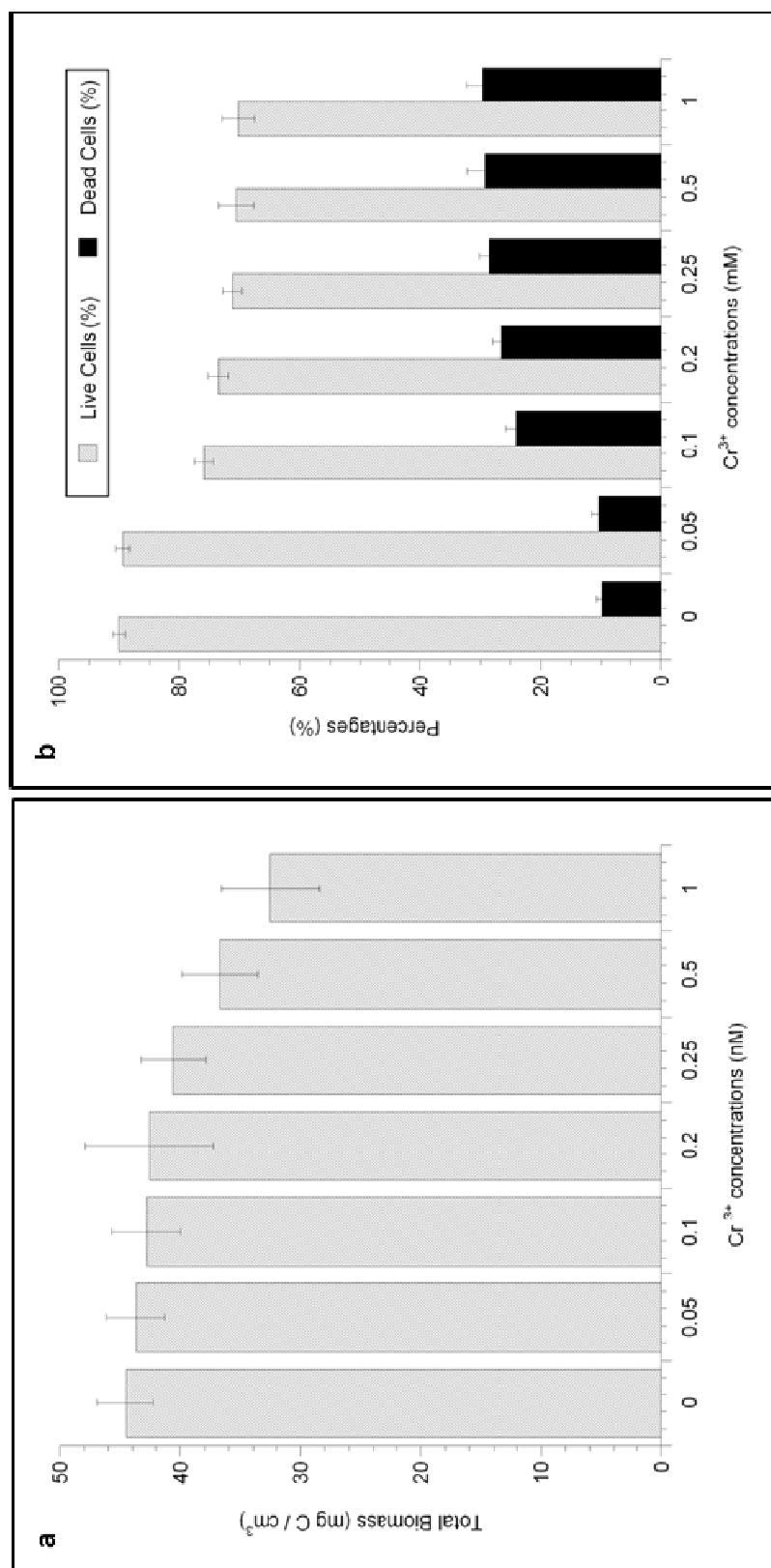
capacity for Cr (III). Bearing in mind that *Chroococcus* sp. is an indigenous and highly abundant cyanobacterium living in Ebro delta microbial mats, it can be concluded that this cyanobacterium holds great promise in helping to detoxify environments polluted by this metal.

### **Acknowledgments**

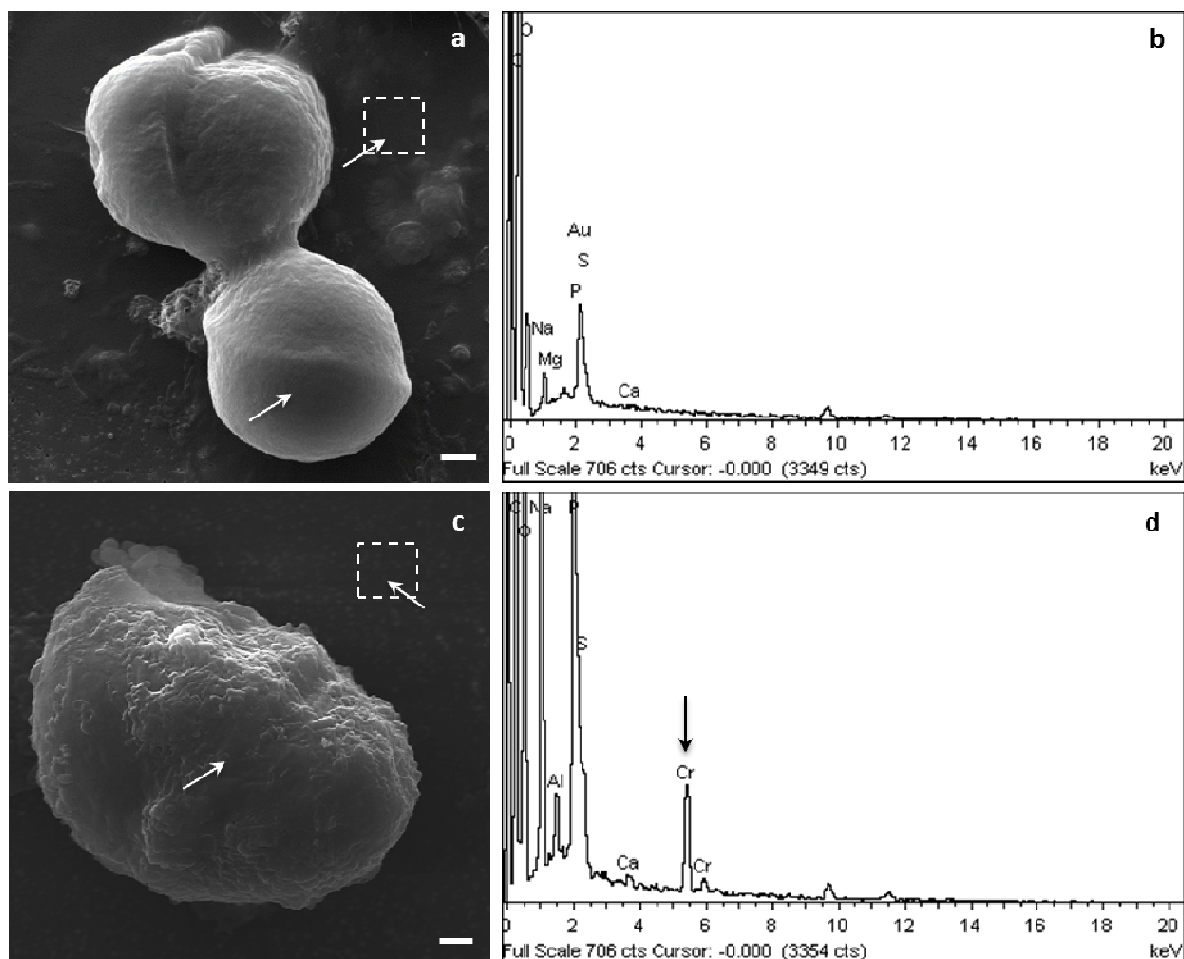
This research was supported by the following grants: DGICYT (CGL2008-01891/BOS) and a UAB postgraduate scholarship to Zully M. Puyen. We express our thanks to the staff of the Servei de Microscòpia at the Universitat Autònoma de Barcelona and of the Serveis Científicotècnics at the Universitat de Barcelona. We also thank Marc Alamany and Francesc Fornells from Ecología Portuaria S. L. (Spain), who provided valuable comments on the manuscript.



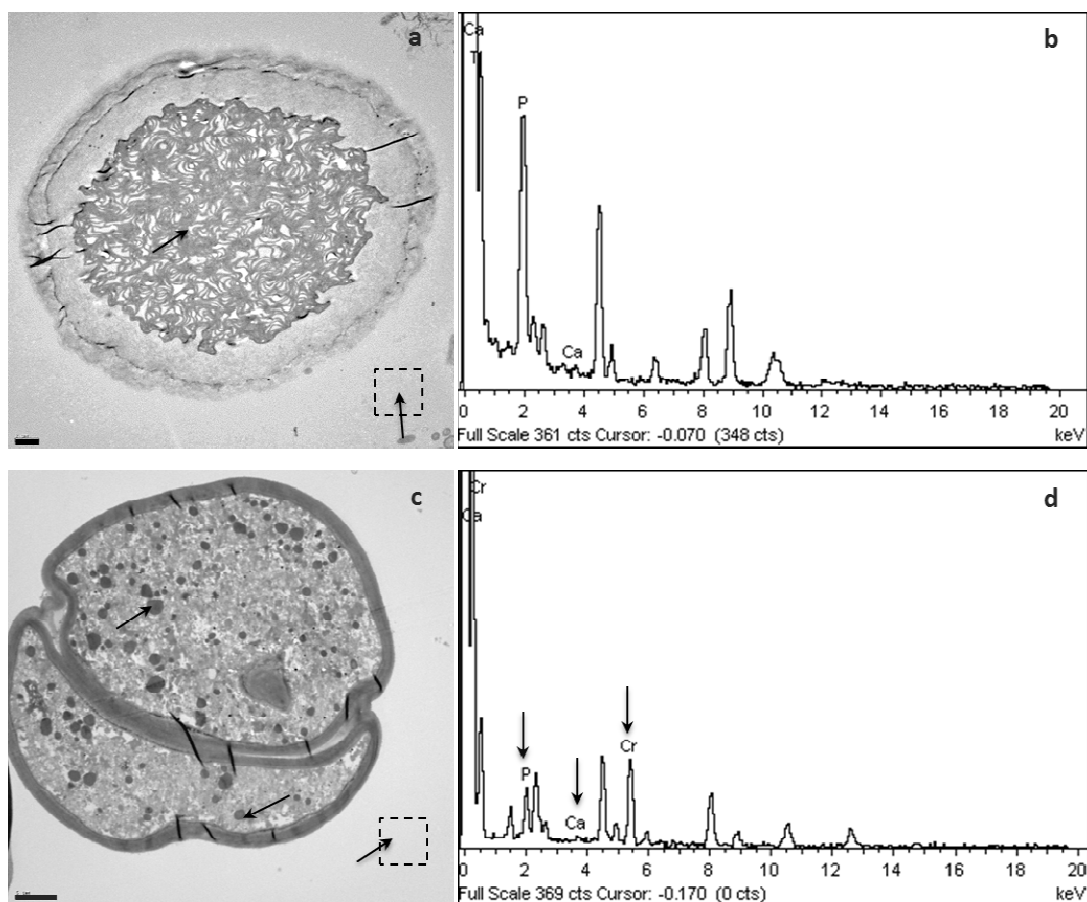
**Fig. 1.** CSLM image and  $\lambda$ scan plot of *Chroococcus* sp. PCC 9106 (a) CLSM image from a non-Cr treated culture (b)  $\lambda$ scan plot of cultures exposed to different Cr (III) concentrations.



**Fig. 2.** Changes in biomass and viability on *Chroococcus* sp. PCC 9106 at different Cr (III) concentrations. (a) Total Biomass (mgC/cm<sup>3</sup>). (b) Percentages of live and dead cells. The bars indicate the Standard Error of the Means (S.E.M.) (n=20).

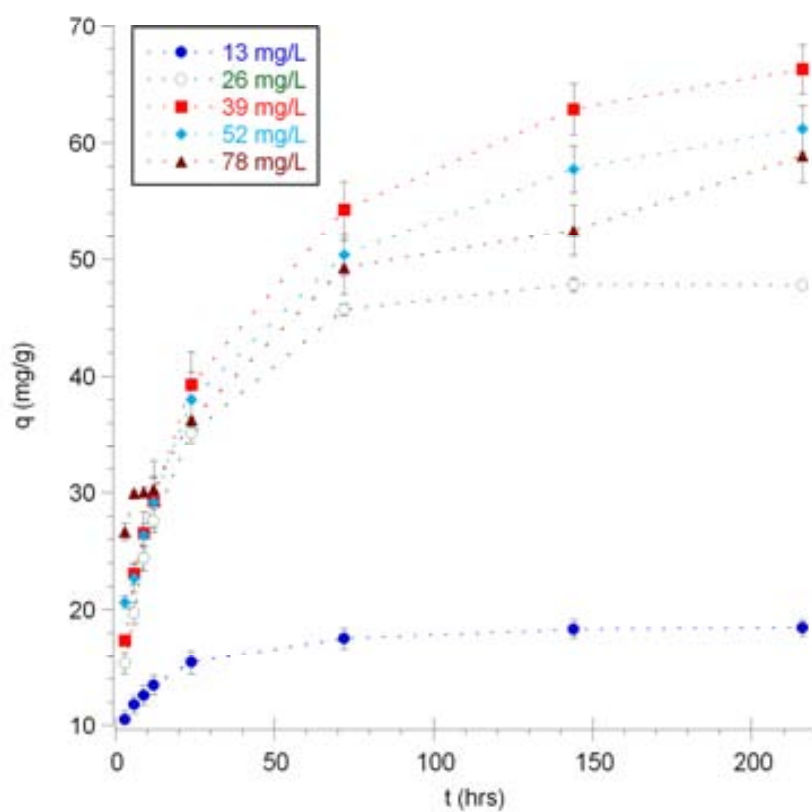


**Fig. 3.** SEM image and EDX spectra of *Chroococcus* sp. PCC 9106. Unpolluted culture (0 mM Cr) (a) and its EDX spectrum (b). Polluted culture (1.5 mM Cr) (c) and its EDX spectrum (d). In SEM images, the different analysis points are indicated by arrows. In EDX spectra from polluted cell, arrow indicates the main Cr peak at 5.5 KeV. Scale bar represents 2 $\mu$ m.

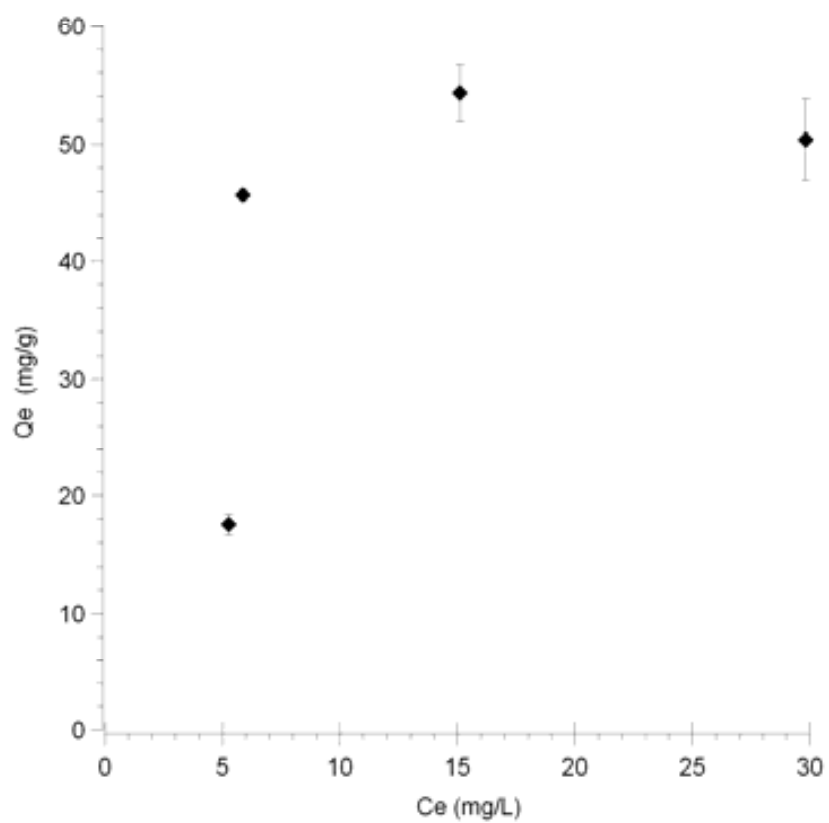


**Fig. 4.** TEM image and EDX spectra of *Chroococcus* sp. PCC 9106.

Unpolluted culture (0 mM) (a) and its EDX spectrum(b). Polluted culture (1.5 mM Cr) (c) and its EDX spectrum (d). In TEM images, the scale bars represent 2 μm (a) and 5 μm (b) and different analysis points are indicated by arrows. In EDX spectra from polluted culture, arrows indicate the Cr, Ca and P peaks from high electron-dense inclusions (Cr main peak is at 5.6 KeV).



**Fig. 5.** Adsorption kinetics of Cr (III) at different initial concentrations by *Chroococcus* sp. PCC 9106 (pH=6.5; T=25°C).



**Fig. 6.** Isotherm of Cr (III) uptake by *Chroococcus* sp. PCC 9106 (pH: 6.5, time: 72 h, temperature: 25°C).



**Table 1.** Biomass of live cells (mgC/cm<sup>3</sup>) of *Chroococcus* sp. PC 9106 at different Cr (III) concentrations.

---

<b>Heavy metal concentration (mM)</b>	<b>Biomass of live cells (mgC/cm<sup>3</sup>)</b>
<b>0</b>	40.22
<b>0.05</b>	38.37
<b>0.1</b>	30.36
<b>0.2</b>	31.27
<b>0.25</b>	30.87
<b>0.5</b>	25.65
<b>1.0</b>	23.39

---

**Table 2.** Removal capacity of Cr (III) at equilibrium by *Chroococcus* sp. PC 9106.

Heavy metal	Initial metal concentration (mg/L)	Equilibrium metal concentration (mg/L)	Metal adsorbed (mg/L)	Specific metal removal at equilibrium ( $q_e$ )*
Cr (III)	13 (~0.25 mM)	5.27	7.7	17.56
	26 (~0.5 mM)	5.88	20.1	45.72
	39 (~0.75 mM)	15.11	23.9	54.29
	52 (~1.0 mM)	29.82	22.2	50.40
	78 (~1.5 mM)	56.31	21.7	49.30

\*Specific metal removal at equilibrium ( $q_e$ ) expressed as (mg metal removed).(g dry biomass)<sup>-1</sup>

## References

- Anjana K., Anubha K., Kiran B., Nisha R.** (2007) Biosorption of Cr(VI) by immobilized biomass of two indigenous strains of cyanobacteria isolated from metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 148, 383–386.
- Bishnoi N.R., Kumar R., Kumar S., Rani S.** (2007) Biosorption of Cr(III) from aqueous solution using algal biomass *spirogyra* spp. *Journal of Hazardous Materials* 145, 142–147.
- Bouza-Deaño R., Ternero-Rodríguez M., Fernández-Espinosa A.J.** (2008) Trend study and assessment of surface water quality in the Ebro River (Spain). *Journal of Hydrology* 361, 227– 239
- Buljan J.** (1996) Pollution limits for discharge of tanning effluents into water bodies and sewers. *World Leath* 9, 65–68.
- 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84, 55-60.
- Cheung K.H., Gu J.D.** (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59, 8–15.
- Davis T.A., Volesky B., Mucci A.** (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research* 37, 4311–4330

**Decho A.W.** (1994) Exopolymers in microbial mats: assessing their adaptative roles, in: Stal, L.J., Caumette. P. (Eds.), *Microbial Mats. Structure, Development and Environmental Significance*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 215–219

**Environmental Protection Agency (EPA).** (1998) Human Health Fact Sheet: Chromium, available from URL: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/chromium.html>

**Evangelou V. P.** (1998) *Environmental Soil and Water Chemistry: Principles and Applications*. John Wiley&Sons, NewYork, pp 476-498.

**Gadd G.M.** (1988) Accumulation of metal by microorganisms and algae. In: Rehm, H. (Ed.), *Biotechnology: A Complete Treatise*, vol. 6B. *Special Microbial Processes*, vol. 4. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 401–430.

**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 STEM EDX. *Microbios* 106, 177-188.

**Han 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.

**Herdman M., Iteman I., Rippka R.** (2005) *Catalogue of Cyanobacterial strains*, second ed. Institut Pasteur, Paris.

**Jagiello M., Minta E., Chojnacka K., Kafarski P.** (2006) Mode of biosorption of chromium(III) by *Spirulina* species cells from aqueous solutions. *Water Environment Research* 78(7), 740-743.

**Juarez A.B., Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V., Vesentini N., Conforti V., Gualtieri P.** (2008) In vivo microspectroscopy monitoring of

chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorina unicocca* and *Chlorella kessleri*. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1313–1318

**Kumar M.S., Muralitharan G., Thajuddin N.** (2009) Screening of a hypersaline cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnology Letters* 31, 1863-1866

**Kumar M.S., Rajeshwari K., Johnson S., Thajuddin N., Gunasekaran M.** (2011) Removal of Pb (II) by immobilized and free filaments of marine *Oscillatoria* sp. NTMS01 and *Phormidium* sp. NTMS02. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 87, 254–259

**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.

**Mañosa S., Mateo R., Guitart R.** (2001) A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment* 71, 187-205

**Mateo R., Martinez-Vilalta A., Guitart R.** (1997) Lead shot pellets in the Ebro delta, Spain: densities in sediments and prevalence of exposure in waterflow. *Environmental Pollution* 96, 335-341.

**Michalak I., Zielinska A., Chojnacka K., Matula J.** (2007) Biosorption of Cr(III) by microalgae and macroalgae: Equilibrium of the process. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2 (4), 284-290.

**Milloning G.** (1961) A modified procedure for lead staining of thin sections. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 11, 736–739.

- Nogales B., Lanfranconi M.P., Piña-Villalonga J.M., Bosch R.** (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Review* 35, 275–298.
- Ozturk S., Aslim B.** (2008) Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates. *Environmental Science and Pollution Research* 15 (6), 478–480.
- Pandi M., Shashirekha V., Swamy M.** (2009). Bioabsorption of chromium from retan chrome liquor by cyanobacteria. *Microbiological Research* 164, 420-428.
- Pereira M.J., Resende P., Azeiteiro U.M., Oliveira J., De Figueiredo D.R.** (2005) Differences in the effects of metals on growth of two freshwater green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak and *Gonium pectorale* Müller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75, 515–522.
- Puyen Z.M., Villagrasa E., Maldonado J., Esteve I., Sole A.**(2012) Viability and biomass of *Micrococcus luteus* DE2008 at different salinity concentrations determined by specific fluorochromes and CLSM-image analysis. *Current Microbiology* 64, 75–80.
- Rajeshwari K., Kumar M.S., Thajuddin N.** (2011) Adsorption isotherms for Cr(VI) by two immobilized marine cyanobacteria. *Annals of Microbiology* . doi:10.1007/s13213-011-0252-3
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y.** (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of general microbiology* 111, 1-61.

**Roy D., Greenlaw P.N., Shane B.S.** (1993) Adsorption of heavy metals by green algae and ground rice hulls. *Journal of Environmental Science and Health* 28, 37–50.

**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. *Environmental Pollution* 145, 7-14.

**Sethunathan N., Megharaj M., Smith L., Kamaludeen S.P.B., Avudainayagam S.R., Naidu R.** (2005) Microbial role in the failure of natural attenuation of chromium (VI) in long-term tannery waste contaminated soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 105, 57–661

**Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S.** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31, 739-753.

**Someda H.H., El-Shazly E.A., Sheha R.R.** (2005) The role of some compounds on extraction of chromium (VI) by amine extractants. *Journal of Hazardous Materials B117*, 213–219.

**Srivastava S., Ahmad A.H., Thakur I.S.** (2007) Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery effluents. *Bioresource Technology* 98, 1128–1132.

**Stevens Jr. S.E., Nierzwicki-Bauer S.A., Balkwill D.L.** (1985) Effect of nitrogen starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, *Journal of Bacteriology* 161, 1215–1218.

**Stratton G.W., Corke C.T.** (1979) The effect of Ni on the growth, photosynthesis and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 1094-1099.

**Subramanian G., Sekar S., Sampooram, S.** (1994) Biodegradation and utilization of organophosphorus pesticides by cyanobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 33, 129–143

**Thajuddin N., Subramanian G.** (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science* 89(1), 47–57

**Thompson S.L., Manning F. C. R., McColl S. M.** (2002) Comparison of the toxicity of chromium III and chromium VI to cyanobacteria. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 69, 286–293

**Vajpayee P., Tripathi R.D., Rai U.N., Ali M.B., Singh S.N.** (2000) Chromium accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of *Nymphaea alba*. *Chemosphere* 41, 1075–82.

**Vignati D.A.L., Dominik J., Beye M., Pettine M., Ferrari B.** (2010) Chromium(VI) is more toxic than chromium (III) to freshwater algae: A paradigm to revise?. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 743–749

**Volesky B., May-Phillips H.A.** (1995) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42 (5), 797-806.

**Warsaw P.W.N., Sahin K., Küçük O., Sahin N., Ozbey,O.** (2001) Effects of dietary chromium picolinate supplementation on egg production, egg quality and serum concentrations of insulin, corticosterone, and some metabolites of Japanese quails . *Nutrition Research* 21(9), 1315–1321.

**Yongnian N., Shouhui C., Serge K.** (2002) Spectrophotometric determination of metal ions in electroplating solutions in the presence of EDTA with the aid of multivariate calibration and artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta* 463, 305-316.



**Yun Y.S., Park D., Park J.M., Volesky B.** (2001) Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. *Environmental Science & Technology* 35, 4353-4358.



---

**ANEXO II: Medios de cultivo.****Medio LB**

---

<b>Ingredientes</b>	<b>Composición (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
NaCl	10
Agua destilada	1

---

**Medio BG11**

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

pH después de autoclavar 7.4 , dejar enfriar.

**Medio ASNIII**

<b>Ingredientes</b>	<b>Composición (g.L<sup>-1</sup>)</b>
NaCl	25
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2
KCl	0.5
NaNO <sub>3</sub>	0.75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.02
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5
Acido cítrico	0.03
Citrato de amonio férrico	0.003
EDTA	0.0005
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	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**

<b>Ingredientes</b>	<b>Composición (g.L<sup>-1</sup>)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.222
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.390
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.079
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0494
Agua desionizada	hasta 1 L



---

**Referencias**

**Abed R.M.M., Kohls K., De Beer D.** (2007) Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environ Microbiol*9(6):1384–1392.

**Adav S.S., Lee D.J.** (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J. Hazard. Mater.*154, 1120–1126.

**Aksua Z., Ertugrulb S., Donmez Gonul.** (2009) Single and binary chromium (VI) and Remazol Black B biosorption properties of *Phormidium* sp. *J. Hazard. Mater.* 168, 310–318.

**Anjana K., Anubha K., Kiran B., Nisha R.** (2007) Biosorption of Cr(VI) by immobilized biomass of two indigenous strains of cyanobacteria isolated from metal contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 148, 383–386.

**Bahadir T., Bakan G., Altas L., Buykgungar H.** (2007) The investigation of lead removal by biosorption. An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme Microbiol. Technol.* 41, 98–102.

**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.

**Baratelli M., Maldonado J., Esteve I., Solé A., Diestra E.** (2011) Electron microscopic techniques and energy dispersive X-Ray applied to determine the sorption of lead in *Paracoccus* sp. DE 2007. In: *Current Research Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.*

---

Microbiology Book Series – Number 2 Vol. 2. Méndez-Vilas, A. (Ed.)  
FORMATEX. pp. 1601-1608.

**Barranguet C., Van Beusekom S.A.M., Veuger B., Neu T.R., Manders E.M.M., Sinke J.J., Admiraal W.** (2004) Studying undisturbed autotrophic biofilms: still a technical challenge. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 34, 1–9.

**Benka-Coker M.O., Ekundayo J.A.** (1998) Effects of heavy metals on growth of species of *Micrococcus* and *Pseudomonas* in a crude oil/mineral salts medium. *Bioresour. Technol.* 66, 241-245.

**Bishnoi N.R., Kumar R., Kumar S., Rani S.** (2007) Biosorption of Cr(III) from aqueous solution using algal biomass *Spirogyra* spp. *J. Hazard. Mater.* 145, 142–147.

**Blanes P., Sala L., García S., González J., Frascaroli M., Harada M., Cong C., Niwa Y., Matulewicz C., Prado H., Cortadi A., Gattuso M.** (2011) Biosorption of Trivalent Chromium from Aqueous Solution by Red Seaweed *Polysiphonia nigrescens*. *J. Water Resource Protect.* 3, 832-843.

**Bloem J., Veninga M., Shepherd J.** (1995) Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 926-936.

**Bouza-Deaño R., Ternero-Rodríguez M., Fernández-Espinosa A.J.** (2008) Trend study and assessment of surface water quality in the Ebro River (Spain). *J. Hydrol.* 361, 227– 239.

**Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.



- Breeuwer P., Abee T.** (2000) Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int.J. Food Microbiol.* 55,193 – 200.
- Buljan J.** (1996) Pollution limits for discharge of tanning effluents into water bodies and sewers. *World Leath* 9, 65–68.
- 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. In current microscopy contribution to advances in science and technology. Microscopy book series (Chapter code:158)
- 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.
- Burton K.** (1956) A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochem J.* 62(2), 315–323.
- Chazotte B.** (2010) Labeling Nuclear DNA using DAPI. Adapted from *Imaging: A Laboratory Manual* (ed. Yuste). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Chen, A.H., Liu, S.C., Chen, C.Y., Chen, C.Y.** (2008) Comparative adsorption of Cu(II), Zn(II), and Pb(II) ions in aqueous solution on the crosslinked chitosan with epichlorohydrin. *J. Hazard. Mater.* 154, 184-191.

- Cheung K.H., Gu J.D.** (2007) Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. In. *Biodeterior. Biodegrad.* 59, 8–15.
- Chojnacka K., Chojnacki A., Górecka H.** (2005) Biosorption of  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions by blue green algae *Spirulina* sp.: Kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere* 59, 75-84.
- 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.
- 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.
- Davis T.A., Volesky B., Mucci A.** (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research* 37, 4311–4330.
- 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.
- Diestra E., Solé A. and Esteve I.** (2004) A comparative study of cyanobacterial diversity in polluted and unpolluted microbial mats by means of CLSM. *Ophelia*. 58, 151-156.
- Diestra E., Sole A., Marti M., García 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.

**Doshi H., Seth Ch., Ray A., Kothari I.L.** (2008) Bioaccumulation of Heavy Metal by Green Algae. *Curr. Microbiol.* 56, 246 – 255.

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.

**Environmental Protection Agency (EPA).** (1998) Human Health Fact Sheet: Chromium, available from URL:  
<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/chromium.html>.

**Esteve I., Ceballos D., Martínez-Alonso M., Gaju N. and Guerrero R.** (1994) Development of versicolored microbial mats: succession of microbial communities. *Microbial mats: structure, development and environmental significance*, In: Stal L.J. and Caumette P. (Eds.), NATO ASI Series G: Ecological Sciences, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 4165–4420.

**Esteve I., Martínez-alonso M., Mir J., Guerrero R.** (1992) Distribution, typology and structure of microbial mat communities in Spain: a preliminary study. *Limnética* 8, 185-195.

**Estrada M., Henriksen P., Gasol J.M., Casamayor E.O., Pedrós-Alió C.** (2004) Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 281-293.

**Evangelou V.P.** (1998) *Environmental Soil and Water Chemistry: Principles and Applications*. John Wiley&Sons, NewYork, pp 476-498.

**Farhadian M., Vachelard C., Duchez D., Larroche C.** (2008) In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresour. Technol.* 99, 5296–5308.

- Fourçans A., García de Oteyza, T., Wieland A., Solé A., Diestra E., van Bleijswijk J., Grimalt J.O., Kuhl M., Esteve I., Muyzer G., Caumette P. and 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.
- Fry J.C.** (1990) Direct methods and biomass estimation. *Meth. Microbiol.* 22, 441-485.
- Gadd G.M.** (1988) Accumulation of metal by microorganisms and algae. In: Rehm, H. (Ed.), *Biotechnology: A Complete Treatise*, vol. 6B. Special Microbial Processes, vol. 4. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 401–430.
- Gadd, G. M., White C.** (1993) Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology?. *Trends Biotechnol.* 11, 352-359.
- Gadd G.M.** (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *Phytologist* 124, 25–60.
- Gadd G.M.** (2000) Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 271-279.
- 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 STEM EDX. *Microbios* 106, 177-188.
- Greenblatt C.L., Baum J., Klein B.Y., Nachshon S., Koltunov V., Cano R.J.** (2004) *Micrococcus luteus* -survival in amber. *Microb Ecol* 48:120-127
- Guerrero R., Piqueras M. and Berlanga M.** (2002) Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *Int. Microbiol.* 5, 177-188.
- 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. *Biores. Technol.* 101, 8599–8605.

**Han 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.

**Harris C.M., Kell D.B.** (1985) The estimation of microbial biomass. *Biosensors* 1:17-84

**Herdman M., Itean I., Rippka R.** (2005) *Catalogue of Cyanobacterial strains*, second ed. Institut Pasteur, Paris.

**Ilhan S., Nourbakhsh M.N., Kiliçarslan S., Ozdag H.** (2004) Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste water by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology* 2, 50-57.

**Jagiello M., Minta E., Chojnacka K., Kafarski P.** (2006) Mode of biosorption of chromium(III) by *Spirulina* species cells from aqueous solutions. *Water Environ. Res.* 78(7), 740-743.

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

**Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R.** (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:169-187

Kell, D.B., Kaprelyants, A.S., Weichart, D.H.

- Kintner P.K., Van Buren J.P.** (1982) Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using m-hydroxydiphenyl method. *J. Food Science.* 47, 756-760.
- Kocur M., Smid B., Martinec T.** (1972) The fine structure of extreme halophilic cocci. *Microbios* 5, 101-107
- Koltunov V., Greenblatt C.L., Goncharenko A.V., Demina G.R., Klein B.Y., Young M., Kaprelyants A.S.** (2010) Structural changes and cellular localization of resuscitation-promoting factor in environmental isolates of *Micrococcus luteus*. *Microb. Ecol.* 59, 296-310.
- Kumar M.S., Muralitharan G., Thajuddin N.** (2009) Screening of a hypersaline cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnology Letters* 31,1863-1866.
- Kumar M.S., Rajeshwari K., Johnson S., Thajuddin N., Gunasekaran M.** (2011) Removal of Pb (II) by immobilized and free filaments of marine *Oscillatoria* sp. NTMS01 and *Phormidium* sp. NTMS02. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 254–259.
- Lawrence J.R., Neu T.R.** (1999) Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. *Methods Enzymol.* 310:131-144.
- Madern D., Ebel C., Zaccai G.** (2000) Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* 4, 91–98.
- Lee Y.Ch., Chang Sh.** (2011) The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *Cladophora* filamentous macroalgae. *Bioresour. 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.
- Lim P.E., Mak K.Y., Mohamed N., Noor A.M.** (2003) Removal and speciation of heavy metals along the treatment path of wastewater in subsurface-flow constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 48(5), 307-313.
- Liu Y., Fang H.P.** (2003) Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 33, 237–273.
- Lovley D.R. (ed.)** (2000) *Environmental Microbe-Metal Interactions*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Maldonado J., Diestra E., Huang L., Doménech A.M., Villagrasa E., Puyen Z.M., Duran R., Esteve I., Solé A.** (2010a) Isolation 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. and 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. *Aquat. Toxicol.* 104, 135-144.
- Malik A.** (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261–278.

- Malik A., Jaiswal R.** (2000) Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 177-182.
- 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
- Martinez-Alonso M., Mir J., Caumette P., Gaju N., Guerrero R., Esteve I.** (2004) Distribution of phototrophic populations and primary production in a microbial mat from the Ebro Delta, Spain. *Int. Microbiol.* 7, 19-25
- 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.
- Mateo R., Martinez-Vilalta A., Guitart R.** (1997) Lead shot pellets in the Ebro delta, Spain: densities in sediments and prevalence of exposure in waterflow. *Environ. Pollut.* 96, 335-341.
- Michalak I., Zielinska A., Chojnacka K., Matula J.** (2007) Biosorption of Cr(III) by microalgae and macroalgae: Equilibrium of the process. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2 (4), 284-290.
- Moriguchi M., Sakai K., Tateyama R., Furuta Y., Wakayama M.** (1994) Isolation and characterization of salttolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. *J. Ferment. Bioeng.* 77,621–625.
- Milloning G.** (1961) A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 11, 736–739.
- Nagata S., Wang Y., Zhang H., Sasaki H., Oshima A., Ishida A.** (2009) Effect of moderate salinity stress treatment on the stimulation of proline uptake and



growth in *Escherichia coli* CSH4 and its mutants under high salinity. J. Biosci. Bioeng. 108, 205-210.

**Nakajima A. and Tsuruta T.** (2004) Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*. J. Radioanal. Nucl. Chem. 260, 13-18.

**Naja G.M., Volesky B.** (2009) Metales in the Environment: Toxicity and Sources. Chapter 2 in: Handbook of Heavy Metals in the Environment. Wang L.K., Chen J.P., Hung Y.T., Shammass N.K. eds. Taylor & Francis and CRC Press, Boca Raton. FL. Pgs. 13-61.

**Neu T.R., Woelfl S., Lawrence J.R.** (2004) Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). J. Microbiol. Methods. 56, 161-172.

**Nogales B., Lanfranconi M.P., Piña-Villalonga J.M., Bosch R.** (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. FEMS Microbiology Review 35, 275–298.

**Oh K.B., Matsuoka H.** (2002) Rapid viability assessment of yeast cells using vital staining with 2-NBDG, a fluorescent derivative of glucose. Int. J. Food Microbiol. 76, 47-53.

**Oren A.** (1999) Bioenergetic Aspects of Halophilism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63(2), 334-348.

**Ozturk S., Aslim B.** (2008) Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial isolates. Environ. Sci. Pollut. R. 15 (6), 478–480.

**Pandi M., Shashirekha V., Swamy M.** (2009). Bioabsorption of chromium from retan chrome liquor by cyanobacteria. Microbiol. Res. 164, 420-428.

- 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?. *Microbiology* 157, 451- 458.
- Pereira M.J., Resende P., Azeiteiro U.M., Oliveira J., De Figueiredo D.R.** (2005) Differences in the effects of metals on growth of two freshwater green algae (*Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak and *Gonium pectorale* Müller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 515–522.
- Pérez-Marín A.B., Ballester A., González F., Blázquez M.L., Muñoz J.A., Sáez J., Meseguer Zapata V.** (2008) Study of cadmium, zinc and lead biosorption by orange wastes using the subsequent addition method. *Bioresour. Technol.* 99, 8101–8106.
- 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
- Radhika V., Subramanian S., Natarajan K.A.** (2006) Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. *Water Res.* 40, 3628–3636.

- Rajeshwari K., Kumar M.S., Thajuddin N.** (2011) Adsorption isotherms for Cr(VI) by two immobilized marine cyanobacteria. *Annals of Microbiology* . doi:10.1007/s13213-011-0252-3
- Rasband W.S.** (1997-2012) ImageJ. US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. HYPERLINK "<http://rsb.info.nih.gov/ij/>"t "\_blank"
- 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.
- Roszak D.B., Colwell R.R.** (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51, 365-379
- Roth B., Poot M., Yue S.T., Millard P.J.** (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2421–2431.
- Roy D., Greenlaw P.N., Shane B.S.** (1993) Adsorption of heavy metals by green algae and ground rice hulls. *J. Environ. Sci. Health.* 28, 37–50.
- Sahoo D.K., Kar R.N., Das R.P.** (1992) Bioaccumulation of Heavy Metal Ions by *Bacillus circulans*. *Bioresour. Technol.* 41, 177-179.
- 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
- 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.

**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. Ecotoxicology 22, 199–205

**Sethunathan N., Megharaj M., Smith L., Kamaludeen S.P.B., Avudainayagam S.R., Naidu R.** (2005) Microbial role in the failure of natural attenuation of chromium (VI) in long-term tannery waste contaminated soil. Agriculture, Ecosystems & Environment 105, 57–661

**Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S.** (2005) Chromium toxicity in plants. Environment International 31, 739-753.

**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

**Shukla D., Padma S.V., Srivastava S.K.** (2012) Bioremediation of hexavalent chromium by a cyanobacterial mat. Appl. Water Sci. DOI 10.1007/s13201-012-0044-3.

**Silver S., Misra T.** (1988) Plamid-mediated Heavy Metals Resistances. Annu. Rev. Microbiol. 42, 717-743.

**Sole A., Gaju N., Mendez-Alvarez S., Esteve I.** (2001) Confocal laser scanning microscopy as a tool to determine cyanobacteria biomass in microbial mats. J. Microsc. 204, 258-262.

**Solé A., Mas J., Esteve I.** (2007) A new method based on image analysis for determining cyanobacterial biomass by CLSM in stratified benthic sediments.

---

Ultramicroscopy 107:669-673.

**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.

**Someda H.H., El-Shazly E.A., Sheha R.R.** (2005) The role of some compounds on extraction of chromium (VI) by amine extractants. *J. Hazard. Mater.* B117, 213–219.

**Sonnleitner B., Locher G., Fiechter A.** (1992) Biomass determination. *J. Biotechnol.* 25, 5-22.

**Srivastava S., Ahmad A.H., Thakur I.S.** (2007) Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery effluents. *Bioresour. Technol.* 98, 1128–1132.

**Stevens Jr. S.E., Nierzwicki-Bauer S.A., Balkwill D.L.** (1985) Effect of nitrogen starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J. Bacteriol.* 161, 1215–1218.

**Stratton G.W., Corke C.T.** (1979) The effect of Ni on the growth, photosynthesis and nitrogenase activity of *Anabaena inaequalis*. *Can. J. Microbiol.* 25, 1094-1099.

**Subramanian G., Sekar S., Sampooram, S.** (1994) Biodegradation and utilization of organophosphorus pesticides by cyanobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 33, 129–143.

**Surosz W. and Palinska K.A.** (2004) Effects of heavy-metal stress on cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 40-48.

**Sutherland I.W.** (1997) Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. *Pure Appl. Chem.* 69, 1911–1917.

- Tang, L., Zeng, G.M., Shen, G.L., Li, Y.P., Zhang, Y., Huang, D.L.** (2008) Rapid detection of picloram in agricultural field samples using a disposable immunomembrane-based electrochemical sensor. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1207–1212.
- Teitzel G.M., Matthew R.P.** (2003) Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (4), 2313–2320.
- Thajuddin N., Subramanian G.** (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.* 89(1), 47–57.
- Thompson S.L., Manning F. C. R., McColl S. M.** (2002) Comparison of the toxicity of chromium III and chromium VI to cyanobacteria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 286–293.
- Vajpayee P., Tripathi R.D., Rai U.N., Ali M.B., Singh S.N.** (2000) Chromium accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of *Nymphaea alba*. *Chemosphere* 41, 1075–82.
- Vignati D.A.L., Dominik J., Beye M., Pettine M., Ferrari B.** (2010) Chromium(VI) is more toxic than chromium (III) to freshwater algae: A paradigm to revise?. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 743–749.
- Vijayaraghavan K. and Yun YS.** (2008) Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* 26, 266–291.
- Volesky B.** (2001) Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59:203–16.
- Volesky B., May-Phillips H.A.** (1995) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42(5), 797-806.
- Votyakova T.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B.** (1994) Influence of Viable Cells

---

on the Resuscitation of Dormant Cells in *Micrococcus luteus* Cultures Held in an Extended Stationary Phase: the Population Effect. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3284-3291.

**Wang J., Chen C.** (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27,195–226.

**Wang Y.C.** (2005) Study on kinetics of alcohol fermentation on the basis of the biomass specific growth rate. *Liq. Sci. Technol.* 9, 48-51.

**Warsaw P.W.N., Sahin K., Küçük O., Sahin N., Ozbey,O.** (2001) Effects of dietary chromium picolinate supplementation on egg production, egg quality and serum concentrations of insulin, corticosterone, and some metabolites of Japanese quails . *Nutrition Research* 21(9), 1315–1321.

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

**Yamamoto H., Hashimoto Y., Ezaki T.** (1996) Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple nutrient starvation. *FEMS Microbiol.Ecol.* 20,149-154.

**Yilmaz E.I.** (2003) Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Res. Microbiol.* 54, 409–415.

**Yongnian N., Shouhui C., Serge K.** (2002) Spectrophotometric determination of metal ions in electroplating solutions in the presence of EDTA with the aid of multivariate calibration and artificial neural networks. *Anal. Chim. Acta* 463, 305-316.





An aerial photograph of a coastal region, likely the Costa Brava in Catalonia, Spain. The image shows a rugged coastline with several prominent mountain peaks and a bay. The foreground is dominated by a large, light-colored, rocky or sandy area, possibly a beach or a large rock formation. The water in the bay is a deep blue-green color. The sky is a clear, bright blue. The overall scene is serene and scenic.

**UAB**

Universitat Autònoma  
de Barcelona