



UNAM IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EFECTO DE Ni⁺² EN LA FISIOLÓGÍA DE
Scenedesmus incrassatulus”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
HAIDE SALDAÑA ESQUIVEL

DIRECTOR DE TESIS:
DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA



Tlalnepantla, Estado. de México

Enero 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A Dios por guiarme, iluminarme, cuidarme y por poner en mi camino a las personas indicadas GRACIAS....

A mi familia por estar siempre conmigo a mi mami Nicolasa Esquivel, a mi Papá Dionicio Saldaña y a mis hermanas Erika Saldaña Esquivel y Sandra Saldaña Esquivel y mis cuatro sobrinos Ana, Luis, Ángela y Samuel gracias por acompañarme en este camino.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de formar parte de la mejor Universidad de México no sólo académicamente si no culturalmente no me queda más que decir GRACIAS. A Facultad de Estudios Superiores Iztacala, a la excelente plantilla de académicos que tuve la oportunidad de conocer en mi transcurso por la carrera de Biología; y a todo el personal que labora en la Facultad, GRACIAS.

A cada sinodal que tomo su tiempo para revisar este trabajo y darme su opinión al Dr. Sergio González Moreno por su apoyo en el Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfología y Función, Dra. Nandini Sarma, M. en C. Josefina Vázquez Medrano por las facilidades otorgadas en Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, al Dr. Manuel Mandujano Piña por la asesoría y ayuda en la construcción de los estadísticos de este trabajo.

Al Dr. Hugo Perales Vela por que sin su asesoría académica ni personal no se hubiera podido realizar este trabajo, por todo su apoyo y aquí nuevamente le agradezco a Dios haberlo puesto en mi camino muchas gracias. Por haber aceptado la dirección de este trabajo, por su tiempo, apoyo, paciencia y todos sus consejos. Que Dios lo bendiga siempre...

A la M en C Socorro Sánchez Correa por siempre apoyarme y darme animo de seguir adelante además de darme siempre las facilidades y asesoría en el Laboratorio de Biología Celular y Bioquímica.

A Sergio Chávez Silva porque siempre estuviste junto a mí recorriendo y cumpliendo cada día nuestro sueño de ser Biólogos GRACIAS.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
I. Introducción	2
1. El problema de las aguas residuales en México	2
II. Antecedentes	3
1. Los metales pesados	3
1.1 Fuentes de emisión y contaminación	4
1.2 Toxicidad general	5
2. Níquel	5
2.1 Características fisicoquímicas	5
2.2 Concentraciones naturales	5
2.3 Fuentes de Contaminación	6
2.4 Níquel en México	7
2.5 Importancia ambiental	8
2.6 Concentración de níquel en ambientes acuáticos de México	9
2.7 La Normatividad Mexicana	9
3. El Papel del níquel en organismos fotosintéticos	10
3.1 Función	10
3.2 Transporte	10
3.3 Toxicidad	11
3.4 Toxicidad en membranas celulares	11
4. Mecanismos de tolerancia en algas a metales pesados	12
4.1 Unión extracelular y precipitación por quelantes de origen orgánico	15
4.2 Impermeabilidad y exclusión	15
4.3 Bioadsorción a pared celular	16
4.4 Desintoxicación interna	17
4.5 Transformación del metal	18
4.6 Bioacumulación	18
III. Biología de las Algas	19
1. Definición	19
1.1 Clasificación	19
1.2 Biología	20
2. El Género <i>Scenedesmus</i>	21
2.2 Biología del Género	21
IV. Justificación	23
V. Objetivo General	23
VI. Objetivos Específicos	23
VII. Metodología	24
1. Cultivo madre	24
2. Cultivos experimentales	24
3. Protocolo experimental	24
4. Determinación de peso seco	24
5. Determinación de pigmentos fotosintéticos	25
6. Actividad metabólica (respiración y fotosíntesis)	25

7. Determinación de actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	26
7.1 Análisis de la cinética de fluorescencia por PSII: Prueba OJIP	26
7.2 Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II (Φ PSII)	26
8. Ultraestructura celular	27
9. Determinación de níquel	28
VIII. Resultados y Discusión	29
1. Crecimiento	29
2. Ultraestructura	33
3. Metabolismo	37
3.1 Pigmentos fotosintéticos	37
3.2 Fotosíntesis	41
3.2.1 Liberación de oxígeno	41
3.2.2 Eficiencia operacional del fotosistema II por emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	42
3.3 Respiración	50
3.3.1 Consumo respiración de oxígeno	50
4. Acumulación celular de Ni ⁺²	51
IX. Conclusiones	54
X. Apéndice	56
1. Parámetros cinéticos de la prueba OJIP	56
2. Estadísticos	57
XI. Bibliografía	59

CUADROS Y FIGURAS

		Página
Cuadro 1	Derrama económica de la industrialización de metales en México.	7
Cuadro 2	Total de importaciones y exportaciones de minerales en México.	7
Cuadro 3	Fuentes de emisión de algunos metales pesados observando las fuentes naturales así como las antropogénicas todos los flujos que se muestran son en Unidades 10^8 g. año ⁻¹ .	8
Cuadro 4	Concentración media de níquel ($\mu\text{g/l}$) en agua superficial de Lagunas Costeras y Ríos del Golfo de México. Todos los flujos observados son en Unidades 10^8 g. año ⁻¹ .	9
Figura 1	Procesos que contribuyen a la captación y desintoxicación de metales.	13
Figura 2	Comportamiento de los metales pesados en el ambiente acuático y celular, y mecanismos celulares de respuesta.	14
Figura 3	Efecto del Ni^{2+} sobre el crecimiento ($\text{células}\cdot\text{ml}^{-1}$) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48h.	29
Figura 4	Efecto del Ni^{2+} sobre el crecimiento (peso seco $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48h.	30
Figura 5	Efecto del Ni^{2+} en la velocidad relativa de crecimiento y el tiempo de duplicación de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48h.	31
Figura 6	Micrografía óptica (A-400X; B,-1000X) donde se muestra la estructura celular de <i>S. incrassatulus</i> .	33
Figura 7	Micrografía electrónica de transmisión de las células testigo de <i>S. incrassatulus</i> .	34
Figura 8	Micrografía electrónica de transmisión de <i>S. incrassatulus</i> expuesto a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} por 48 h.	35
Figura 9	Micrografía electrónica de transmisión de <i>S. incrassatulus</i> expuesto a $23.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} por 48 h.	36
Figura 10	Efecto del Ni^{2+} en el contenido volumétrico de pigmentos fotosintéticos de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	38
Figura 11	Efecto del Ni^{2+} sobre la cantidad por célula de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y clorofila total (<i>a+b</i>) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	38
Figura 12	Efecto del Ni^{2+} sobre la cantidad por célula de carotenoides totales de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	40
Figura 13	Efecto del Ni^{2+} sobre la actividad fotosintética (liberación de oxígeno) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	41
Figura 14	Efecto del Ni^{2+} el rendimiento cuántico operacional del PSII (ΦPSII) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	43

Figura 15	Efecto del Ni ²⁺ sobre la cinética emisión de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	44
Figura16	Efecto del Ni ²⁺ sobre el valor de la fluorescencia mínima (F _O), la Fluorescencia Máxima (F _M) y la Fluorescencia Variable (F _V) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	45
Figura 17	Efecto del Ni ²⁺ sobre la Fluorescencia Variable (V _t) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	46
Figura 18	Efecto del Ni ²⁺ sobre el valor de la Fluorescencia en la fase J (V _J), la Fluorescencia en la fase I (V _I) y la pendiente inicial de la fluorescencia variable entre los 50 y 300 μs (M _O) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	47
Figura 19	Modelo simplificado del flujo de energía a través del fotosistema II, según la prueba de OJIP.	48
Figura 20	Efecto del Ni ²⁺ sobre el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (φP _o); la probabilidad de que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q _A ⁻ (ψ _o); la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q _A ⁻ (φE _o) y la disipación térmica en PSII (φD _o) de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	49
Figura 21	Efecto del Ni ²⁺ en el consumo de oxígeno respiratorio de <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	50
Figura 22	Relación entre la remoción celular de Ni ²⁺ y la concentración Ni ²⁺ en el medio de cultivo en <i>S. incrassatulus</i> expuesto al metal durante 48 h.	51
Figura 23	Relación entre la concentración de Ni ²⁺ en el medio de cultivo y el porcentaje de Ni ²⁺ removido del medio de cultivo.	52

RESUMEN

El incremento de las actividades antropogénicas y la industrialización generan contaminantes como partículas de metales pesados que se depositan y transportan en el aire, agua y suelo; estas pueden influir en la composición y fisiología e interfieren en procesos metabólicos de los organismos fotosintéticos.

El Ni^{2+} es esencial para el crecimiento de muchos organismos, ya que es requerido en cantidades traza (pM) para el funcionamiento de varias enzimas, sin embargo, a concentraciones ligeramente por encima de las fisiológicas se vuelve tóxico.

El objetivo de la presente investigación fue describir el efecto del níquel durante una exposición corta (48 h), en la fisiología de una población en fase exponencial de *Scenedesmus incrassatulus*.

Los resultados muestran que el proceso fisiológico más afectado fue el crecimiento. La concentración efectiva media (CE_{50}) a la cual el crecimiento se inhibió en un 50 % fue $5.189 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo cual provocó un aumento en el tiempo de duplicación 1.18 d^{-1} a 2.5 d^{-1} . La exposición a concentraciones superiores a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} , inhibieron completamente la división celular.

Las concentraciones de níquel probadas no modificaron sustancialmente la ultraestructura celular, sin embargo concentraciones superiores a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, indujeron la formación de depósitos de polifosfatos, los cuales podrían estar funcionando como quelantes catiónicos intracelulares, con el propósito de reducir la concentración de metal libre disminuyendo así el efecto tóxico del metal.

Por otro lado, a esta misma concentración también se indujo la formación de gránulos de almidón en el cloroplasto, lo cual estuvo directamente relacionado con la disminución de la actividad fotosintética y respiratoria.

El contenido específico de clorofila *a* y *b* no se modificaron a ninguna de las concentraciones de níquel probadas, al contrario que el contenido de carotenoides totales, los cuales aumentaron un 60 % conforme aumentó el níquel en el medio de cultivo, comparado con los cultivos sin metal. Los carotenoides, en las condiciones de estrés por níquel pudieran participar en la eliminación de radicales libres de oxígeno y en la disipación de exceso de energía fotosintética en los centros de reacción cuando el metabolismo fotosintético ha sido afectado por la exposición al metal.

El análisis de transporte electrónico *in vivo* (ΦPSII) por la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*, mostró que el Ni^{2+} afectó ambos lados del fotosistema II (PSII). Por otro lado, la disipación térmica No-fotoquímica (ϕDlo) de la energía de excitación, se incrementó conforme se redujo la actividad fotosintética por efecto del metal. Así mismo, el metabolismo respiratorio fue afectado al disminuir hasta 45.73 %. En forma similar a la actividad fotosintética, la respiración solamente fue afectada a concentraciones superiores de $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} .

El contenido de níquel en la biomasa algal aumentó conforme se incrementó la concentración del metal en el medio de cultivo. La máxima remoción del metal fue de $10.5 \pm 2 \text{ mg}$ de Ni^{2+} por gramo de biomasa seca de células, siendo el factor de concentración ($\text{mg metal removido Kg}^{-1}\text{PS}/(\text{mg metal en solución}\cdot\text{L}^{-1})$) de 455 ± 84 .

Palabras Clave: *Scenedesmus incrassatulus*, Níquel, Metabolismo, Fotosíntesis Respiración, Fluorescencia

I. INTRODUCCION

1. El problema de las aguas residuales en México

El balance de aguas residuales urbanas, industriales y agrícolas en la República Mexicana arroja cifras considerables; en total se descargan anualmente 20 km³ (634 m³/s). La agricultura contribuye con el 62 % (337 m³/s), el sector doméstico aporta el 28 % (231 m³/s) y la industria, el 10 % (64.5 m³/s) (Sandoval de Ecurrída, 2000). La capacidad instalada para tratar las aguas residuales en el país es de 22 %, por lo cual 78 %, se vierte al medio ambiente sin tratar (López, 2003; Takguchi, 2003). No existen datos relativos a la carga contaminante derivada de actividades agrícolas, pero sin duda es significativa, por el uso intensivo de plaguicidas y fertilizantes químicos (Sandoval de Ecurrída, 2000; Cortinas de Nava, 2000).

Los metales pesados a diferencia de los compuestos orgánicos, como herbicidas, pesticidas y algunos derivados del petróleo, entre otros, no se pueden degradar biológicamente, por lo que permanecen en los suelos o sedimentos de donde se liberan lentamente al agua (Devars y Sánchez-Moreno, 1999).

En las últimas décadas se ha incrementado la contaminación por metales pesados en la biosfera, particularmente en las aguas residuales industriales y urbanas (Nriagu y Pacyna 1988). El impacto de dicha contaminación radica en el hecho de que esta agua no tratada o parcialmente tratada tiene su destino final en las lagunas, ríos y océanos del planeta. La contaminación de estos nichos ecológicos, afecta directamente a los productores primarios ya que son la puerta de entrada de los metales pesados a las redes tróficas, de las cuales forma parte el ser humano (Rai *et al.*, 1981).

El efecto de los metales pesados en la flora y fauna es un tema de importancia en la investigación en los últimos años, por esta razón se ha incrementado el interés por conocer detalladamente sus efectos en el desarrollo de los organismos, en particular los productores primarios con el fin de entender como afectan su fisiología cuando se acumulan en el medio ambiente (Díaz-Aguilar *et al.*, 2001).

Entre los metales pesados, el níquel es uno de los contaminantes presente en las descargas de aguas residuales de diferentes industrias. Su presencia,

tanto en las aguas utilizadas para riego como en lodos residuales adicionados a fertilizantes y mejoradores de suelo, son una de las causas de la contaminación del ambiente terrestre y acuático. El níquel es un micronutriente esencial en muchos organismos incluyendo las algas, sin embargo, a elevadas concentraciones es altamente tóxico (Rodríguez, 1991).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue contribuir al conocimiento del efecto del níquel sobre la fisiología del alga *Scenedesmus incrassatulus*.

II ANTECEDENTES

1. Los metales pesados

Los metales son componentes esenciales de los ciclos químicos de los ecosistemas, encontrándose presentes en la naturaleza con diferentes estados de oxidación y números de coordinación, aspectos que están relacionados con su toxicidad (Padua *et al.*, 2003).

Los metales se clasifican de manera general como: metales, metaloides y metales pesados. Los metales pesados por definición son elementos cuya gravedad específica es $\geq 5\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Los metales pesados son considerados como residuos peligrosos por la agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) y la Normatividad Mexicana (NOM-CRP-001-ECOL/93) (Cañizares-Villanueva, 2000^b; Pawlik-Skowrońska y Skowroński, 2001).

De acuerdo a su función y efecto biológico los metales en general se clasifican en: 1) esenciales con función biológica conocida, como: Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Mo^{6+} , 2) metales no esenciales, no tóxicos con función biológica desconocida: V^{3+} , Sn^{2+} , Co^{3+} , 3) tóxicos: Ag^+ , Cd^{2+} , Au^+ , Hg^{2+} , Ti^{4+} , Pb^{2+} y Al^{3+} . Algunos metales pesados que tienen funciones biológicas, como el Cu^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , V^{3+} , Ni^{2+} y Mo^{6+} , se vuelven tóxicos cuando se encuentran, en concentraciones superiores a las esenciales (Maier *et al.*, 2000; Pawlik-Skowrońska y Skowroński, 2001).

1.1 Fuentes de emisión y contaminación

Las fuentes de emisión de metales que ingresan al ambiente se dividen en dos categorías principales: las antropogénicas (por actividad humana) y las naturales. De los residuos peligrosos producidos como resultado de la actividad humana, los metales pesados se han convertido en los principales contaminantes ambientales, debido a la rápida industrialización y urbanización, por lo que su concentración ha ido en aumento en el aire, el suelo y el agua (Cañizares-Villanueva, 2000^b).

En la minería o refinamiento de metales y en los procesos de manufacturación industrial como la fabricación de baterías, aleaciones, componentes electrónicos y eléctricos, pinturas, conservadores e insecticidas

se liberan metales pesados como Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} y Ni^{2+} , que son depositados en el aire, suelo y agua. De los diferentes ambientes, el acuático ha recibido mayor atención puesto que en este medio los metales pesados se pueden solubilizar y depositar en los sedimentos o en la biota, de donde a través de procesos fisicoquímicos se liberan para después por adsorción o absorción ser incorporados a las redes tróficas y por el proceso de bioacumulación llegar al ser humano (Cañizares-Villanueva, 2000^b; Maier *et al.*, 2000).

El níquel es utilizado principalmente en la producción de aleaciones, incluido el acero inoxidable, además se usa en gran medida en la industria química, electrónica, en la fabricación de utensilios domésticos, acuñación, galvanoplastia, producción de pinturas o pigmentos, en la industria cerámica; también se utiliza en las áreas nuclear, aeroespacial, y como catalizador en procesos industriales y de refinación del petróleo. Del total del níquel usado en la industria alrededor del 50 % se utiliza en la producción de acero inoxidable y 22 % aproximadamente para la fabricación de otras aleaciones, correspondiendo cerca de 12 % a la galvanoplastia (Rodríguez, 1991).

En la actualidad y con el advenimiento de nuevas y modernas técnicas de extracción y procesamiento de los minerales, como consecuencia de la demanda mundial de ciertos metales y aleaciones, el hombre moviliza cada vez un mayor volumen de metales pesados, aumentando su concentración ya que estos no son biológicamente ni químicamente degradables y que una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. (Rodríguez, 1991).

1.2 Toxicidad general

La toxicidad de los metales pesados se puede dividir de manera general en tres mecanismos básicos: 1) desplazamiento de metales esenciales de sus sitios de unión a moléculas biológicas, por ejemplo, el arsénico y el cadmio compiten con el fosfato y el zinc respectivamente, 2) inhibición de la actividad enzimática y 3) afectación de la estructura de los ácidos nucleicos y proteínas (Rodríguez, 1991).

2. Níquel

2.1 Características fisicoquímicas

El níquel es un elemento metálico de color blanco plateado, brillante, duro, dúctil, maleable y ferromagnético. Pertenece al grupo VIII de la tabla periódica, con un número atómico de 28 y un peso atómico de 58.71, su punto de fusión metálica es de 1456 °C y el de ebullición es de 2732 °C, siendo un buen conductor del calor y electricidad (Rodríguez, 1991; Kasprzak *et al.*, 2003).

2.2 Concentraciones naturales

El níquel constituye aproximadamente entre un 0.008 % y 0.018 % de la corteza terrestre y se encuentra en una proporción de 58 a 94 mg.kg⁻¹, predominando en las rocas ígneas (Rodríguez, 1991; Kasprzak *et al.*, 2003). Las fuentes naturales de níquel en el medio ambiente derivan de los ciclos biológicos así como del intemperismo de suelos y rocas de origen ígneo. A nivel mundial son removidas cerca de 150,000 toneladas por año; a esta cantidad se le puede agregar las fuentes antropogénicas que suman aproximadamente 180,000 toneladas por año aproximadamente a causa de las emisiones de combustibles fósiles, producción industrial, uso de compuestos y aleaciones de níquel (Rodríguez, 1991; Kasprzak *et al.*, 2003).

2.3 Fuentes de contaminación

Las actividades mineras tanto para el níquel como para otros metales, son fuentes de contaminación. En la producción de níquel, la fase inicial es la extracción y la trituración de minerales conteniendo principalmente sulfuro y óxido de níquel. Se calcula que aproximadamente el 45 % del níquel que se produce en el mundo es extraído de los minerales con óxido (lateritas niquelíferas) y el 55 % de los minerales con sulfuro (pentlandita y pirrotita) (Rodríguez, 1991; Kasprzak *et al.*, 2003).

Las principales fuentes de emisión del níquel al aire son la combustión de los productos del petróleo (quema de carbón y aceite), la industria primaria (minería, fundición y refinación), la incineración de desechos, la industria intermedia (manufactura de acero, galvanoplastia) y la combustión de vehículos automotores. Otras fuentes son la manufactura de cemento, las minas de

asbesto, la producción de aleaciones, la combustión de carbón y las emisiones volcánicas (Rodríguez, 1991; Kasprzak *et al.*, 2003).

Las fuentes posibles de níquel en agua y en suelos incluyen las aguas de inundaciones, los suelos enriquecidos con lodos de aguas residuales, las aguas de tratamiento de residuos industriales, mineros, agrícolas y las aguas subterráneas cerca de los terrenos utilizados para rellenos sanitarios. Los niveles naturales en el agua son relativamente bajos, pudiendo haber aumentos locales o regionales a consecuencia de fuentes naturales o antropogénicas específicas. Los valores de 2-10 mg·L⁻¹ en agua potable son bastante comunes, sin embargo esta cifra puede aumentar hasta valores de 20 a 25 mg·L⁻¹ en sistemas públicos de abastecimiento de agua, donde exista una fuente directa de contaminación o un mal tratamiento al agua potable (Nriagu y Pacyna 1988, Rodríguez, 1991).

La concentración típica de níquel en los suelos agrícolas fluctúa en un intervalo de 5 a 500 µg·g⁻¹ con un nivel típico de 50 µg·g⁻¹. En tierras no agrícolas el rango fluctúa entre 4 y 80 µg·g⁻¹, sin embargo se han encontrado niveles tan altos como 24 000 µg·g⁻¹ en suelos cercanos a refinerías y a otras fuentes de contaminación (Nriagu y Pacyna 1988; Rodríguez, 1991; Kasprzak *et al.*, 2003).

2.4 Níquel en México

Los mayores depósitos de níquel se encuentran en Canadá, otros países importantes productores de níquel son Rusia, Australia e Indonesia. La producción mundial minera de níquel en el 2000 fue de 1.160 millones de toneladas. En América Latina se genera el 12.4 % de la producción mundial, siendo Cuba y Brasil los mayores productores. En 2008 México importó aproximadamente 200.908 toneladas de níquel y sus manufacturas que se usan principalmente en aleaciones que aportan dureza y resistencia a la corrosión en el acero para piezas de automóviles, repuestos de maquinaria, placas para blindajes, monedas de níquel y baterías de níquel-cadmio (Kasprzak *et al.*, 2003; INEGI, 2008).

Cuadro 1; Derrama económica de la industrialización metales en México (INEGI, 2008).

Metales	Cantidad	\$ Miles de dólares
Cobalto	2 324 Kg	167.696
Cobre	688 576 Kg	16.93209
Metales del grupo platino	14 522 g	22.2883
Mineral de Hierro	38 908 Tons	15.84146
Níquel	200 908 Kg	14.19418
Oro	166 089 g	23.22417
Plata	1 115 Kg	29.3488
Plomo	151 708 Kg	118.029
Zinc	987 361 Kg	1 4.86966

Cuadro 2; Total de importaciones y exportaciones de minerales en México, realizada en base a millones de pesos (INEGI, 2008).

Minerales	\$ Millones de pesos
Aluminio	7.137
Cobalto	464
Cobre	2.385
Hierro y Acero	9.606
Mineral de Hierro	1.286
Níquel	1.903
Total de Exportaciones de Metales	45.434

2.5 Importancia ambiental

El níquel es uno de los mayores constituyentes de la tierra. Es el quinto elemento más abundante, por peso, después del hierro, oxígeno, manganeso y sílice.

El níquel en su forma natural, como ocurre con otros metales, no presenta gran importancia como fuente de contaminación ambiental. Es decir, que la contaminación principal del ambiente, está vinculada a actividades humanas en la industria y, en menor escala en la minería (cuadro 3).

La utilización creciente del níquel y de los materiales que lo contienen ha estado incrementándose en los últimos años. Por lo que es probable que la concentración de este metal en el suelo, en las aguas superficiales y en la atmósfera continúe aumentando en la misma medida (Nriagu y Pacyna 1988; Rodríguez, 1991).

Cuadro 3; Fuentes de emisión de algunos metales pesados observando las fuentes naturales así como las antropogénicas todos los flujos que se muestran son en Unidades 10^8 g. año⁻¹ (Páez, 1996).

Elemento	Flujo de Polvo Continental	Flujo de Polvo Volcánico	Emisiones del Particulado Industrial	Flujo de los Combustibles Fósiles	Emisiones Totales. Flujo Industrial + Combustibles Fósiles	Factor de Interferencia Atmosférica
Al	356.500	132.750	40.000	32.000	72.000	15
Fe	190.000	87.750	75.000	32.000	107.000	39
Co	40	30	24	20	44	63
Cr	500	84	650	290	940	161
Ni	200	83	600	380	980	346
Cu	100	93	2.200	430	2.630	1.363
Cd	2.5	0.4	40	15	55	1.897
Zn	250	108	7.000	1.400	8.400	2.346
Hg	0.3	0.1	50	60	110	27.500
Pb	50	8.7	16.000	4.300	20.300	34.583

2.6 Concentración de níquel en ambientes acuáticos de México

Existen pocos estudios relacionados con la concentración de níquel en los ambientes acuáticos. El cuadro 4 muestra algunas concentraciones de níquel encontradas en las aguas superficiales de lagunas costeras y ríos del Golfo de México.

Cuadro 4; Concentración media de níquel ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en agua superficial de Lagunas Costeras y Ríos del Golfo de México. Todos los flujos observados son en Unidades $10^8 \text{ g}\cdot\text{año}^{-1}$ (Páez, 1996).

Laguna	Intervalo	Media	Des. Std.	Fracción
Madre, Tam.		10.8	0.9	Disuelta
Términos, Camp.	0.3-0.37	<0.1- 0.2	2.4	Disuelta Particulada
Limite Máximo Permissible para agua costera: 8.0				
Ríos				
Papaloapan, Ver.	0.01-0.04	0.03	0.01	Total
Jamapa, Ver.	0.01-0.04	0.04	0.01	Total
Actopan, Ver.	0.01-0.05	0.03	0.01	Total
Palizada, Camp.	2.00-3.30	2.60	0.70	Disuelta
	5.70-71.00	30.50	35.40	Particulada
Candelaria, Camp.	1.30-3.20	2.30	1.00	Disuelta
	0.20-1.50	0.80	0.60	Particulada
Puerto de Veracruz	0.37-2.09	0.98	0.41	Total
Costa Nor-Occidental del Golfo de México		<2.00		Disuelta
Parte Central del Golfo de México		<0.1		Disuelta
Limite Máximo Permissible para agua costera: 8.0				

2.7 La Normatividad Mexicana

La Norma Oficial Mexicana contra la contaminación ambiental (NOM-CCA-031-ECOL/1993), establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicios y el tratamiento de aguas residuales, a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal. Los promedios máximos para algunos de los metales pesados son: Cadmio $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Cobre $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Cromo hexavalente $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Mercurio $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Níquel $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y Plomo $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por mencionar solo algunos (Sandoval de Escurrida, 2000).

3 El papel del níquel en organismos fotosintéticos

3.1 Función

En 1988, el níquel se incluyó en la lista de los elementos esenciales para los organismos fotosintéticos. Su concentración en algunas plantas va desde 0.01 a 5 mg·g PS⁻¹ y en bajas concentraciones estimula el crecimiento de especies como algodón, tomate, paprika y papa (Marshchner, 1986).

El níquel es un nutriente esencial para varios microorganismos y participa en diversos procesos celulares, por ejemplo se incorpora a enzimas dependientes del metal y en los procesos de síntesis de proteínas, así también forma parte de algunos complejos no proteicos, y en algunos casos acompaña la hidrólisis de nucleótidos trifosfato. Se conoce que el níquel forma parte de enzimas como: Ureasa, Ni-Fe hidrogenasa, monóxido del carbón deshidrogenasa, acetil-CoA descarboxilasa/sintetasa, metil coenzima M reductasa, ciertas superoxidasas reductasas, algunas glicoxilasas, acil-reductor dioxigenasa, y metildiurasa (Marshchner, 1986; Salisbury y Ross, 1994; Taiz y Zeiger, 1998).

3.2 Transporte

En plantas superiores, el níquel se absorbe como catión Ni²⁺ y es transportado a los sitios metabólicamente activos por vía simplástica a través de las paredes celulares desde la raíz hasta el vástago (Marshchner, 1986).

En *Anabaena cylindrica* se ha reconocido un transporte activo para Ni²⁺ con una afinidad de 17 μM, el cual concentra el ión dentro de la célula hasta en un factor de 2700 veces. Sin embargo, éste proceso es totalmente inhibido por la oscuridad e inhibidores metabólicos, indicando una clara relación con la fotosíntesis y la respiración (Campbell y Semith 1986).

3.3 Toxicidad

El exceso de níquel afecta diferentes procesos celulares en los organismos fotosintéticos. De manera particular el proceso más sensible es la fotosíntesis, puesto que el incremento de Ni²⁺ por encima de los requerimientos fisiológicos, altera la concentración de pigmentos, el transporte electrónico y la fijación de bióxido de carbono. Por otro lado, el níquel afecta la estabilidad de las membranas y provoca una disminución de los niveles intracelulares de Ca²⁺,

Mg²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ (Rai *et al.*, 1981; Pawlik-Skowrońska y Skowroński 2001; Rannhdhawa *et al.*, 2001).

3.4 Toxicidad en membranas celulares

A excepción de algunos grupos, todas las algas poseen pared celular (Davis *et al.*, 2003), lo cual significa que la segunda línea de defensa de las algas al ser expuestas a elevadas concentraciones de metales pesados es la membrana plasmática. La función primaria de la membrana plasmática es el transporte selectivo de moléculas dentro y fuera de la célula, por lo tanto, el mantenimiento de su integridad en condiciones de estrés por metales es determinante en la sobrevivencia de los organismos.

En condiciones de estrés por metales pesados, las membranas son afectadas en sus componentes de manera cuantitativa y cualitativa. Es bien reconocido que algunos metales pesados afectan la cantidad de algunos lípidos, el grado de saturación, además de provocar peroxidaciones en los mismos (Devi y Prasad, 1999).

Se ha observado que existe una reducción en la instauración en las cadenas del ácido graso fosfatidilcolina en la membrana en presencia de Cd²⁺ y Ni²⁺ afectando la estructura de la membrana así como la fluidez y por lo tanto su función (Ros *et al.*, 1990; Devi y Prasad, 1999).

El Ni²⁺ también reduce la actividad de enzimas que se encuentran en la membrana plasmática, en particular las ATPasas, al modificar la permeabilidad de la membrana lo que provoca una entrada o salida descontrolada de calcio y potasio, lo que reduce la eficiencia de esta enzima al despolarizar la membrana (Ros *et al.*, 1992).

4 Mecanismos de tolerancia en algas a metales pesados

Algunos metales pesados son esenciales, por lo cual son requeridos por sistemas biológicos como componentes estructurales y catalíticos de proteínas y enzimas; así como cofactores esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos fotosintéticos; sin embargo, en exceso pueden ser extremadamente tóxicos para las células (Rai *et al.*, 1981; Cañizares-Villanueva, 2000^a).

Entre los posibles mecanismos de tolerancia que algunos organismos acuáticos han podido desarrollar para enfrentar el exceso de metales pesados se encuentran: (1) unión del metal a la pared celular impidiendo su entrada al interior de la célula; (2) reducción del transporte a través de la membrana celular; (3) incremento en la salida o eflujo de metales hacia el exterior celular; (4) compartimentalización del metal una vez que entra en la célula, almacenándolo en estructuras vacuolares, eliminándolo así del resto de las actividades celulares; (5) formación de complejos con proteínas y polipéptidos (metalotioninas), compuestos orgánicos (citrato, malato, aminoácidos) o inorgánicos (sulfuros), a manera de atrapar el metal disminuyendo su concentración en forma libre en la célula; (6) síntesis de proteínas o metabolitos de estrés, protectoras o reparadoras de los daños celulares producidos por el metal y (7) formación de precipitados insolubles en forma de gránulos de Ca/Mg o Ca/S. Por otro lado, las modificaciones fisiológicas expresadas por la célula al ser expuesta al metal pesado como son la síntesis de quelantes metálicos intracelulares o extracelulares (polisacáridos y fitoquelatinas), adsorción intracelular a polifosfatos, síntesis de moléculas o activación de enzimas para la eliminación de especies reactivas de oxígeno entre otras, deben también ser consideradas como factores que influyen en la tolerancia de metales pesados cuando se utiliza biomasa activa (figura 1 y 2) (Reed y Gadd, 1990; Nalewajko y Olaveson, 1994; Cañizares-Villanueva, 2000^a; Hall, 2000; Rannadhawa *et al.*, 2001).

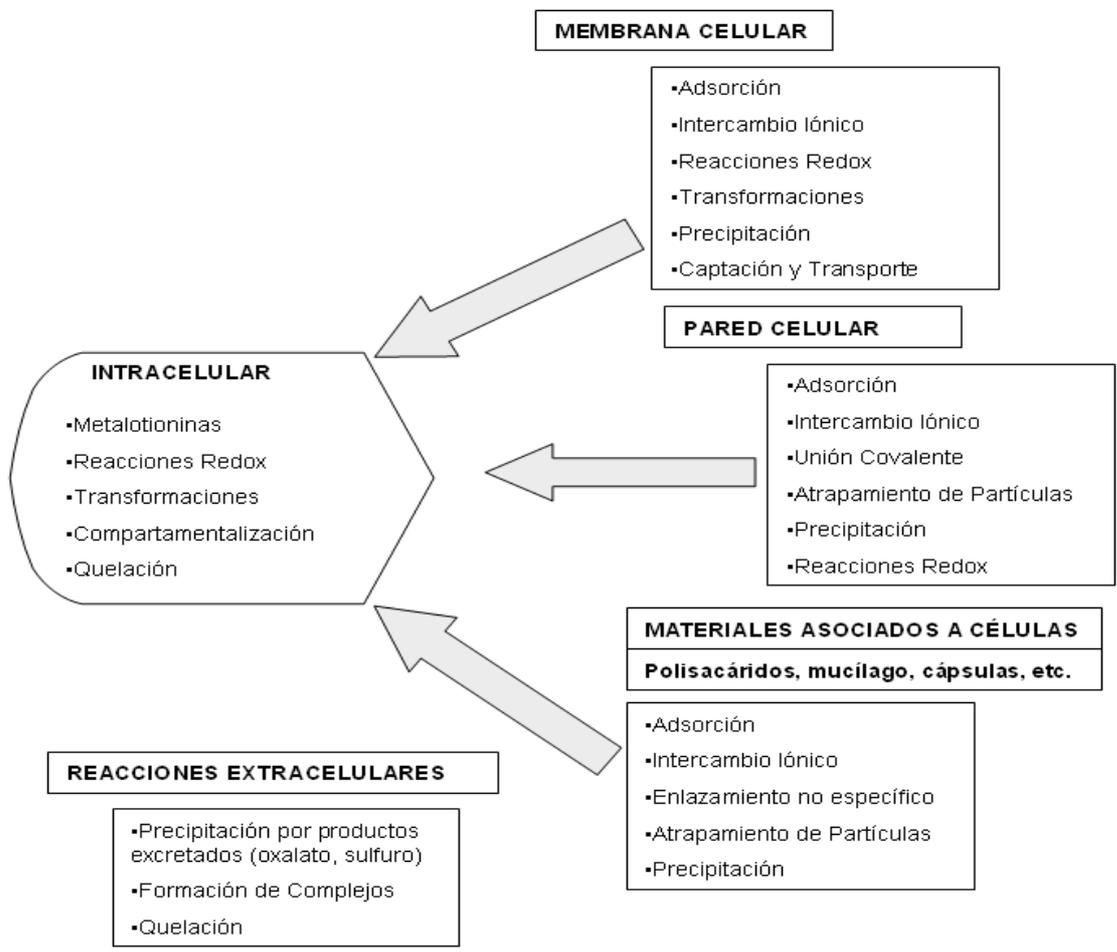


Figura 1. Procesos que contribuyen a la captación y desintoxicación de metales (tomado de Cañizares-Villanueva, 2000^a).

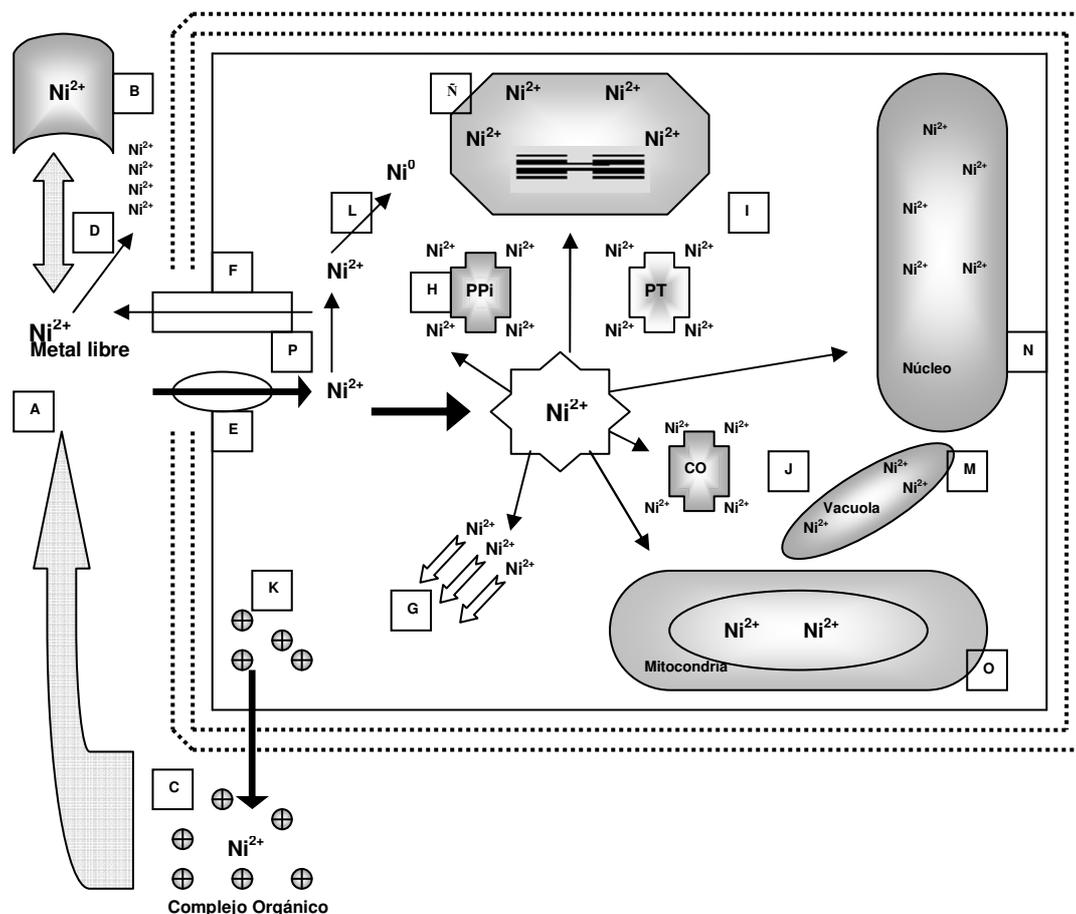


Figura 2. Comportamiento de los metales pesados en el ambiente acuático y celular y mecanismos celulares de respuesta en organismos fotosintéticos (A) Ion libre, potencialmente tóxico; (B) Complejo metálico-inorgánico; (C) Complejo metálico-orgánico; (D) Adsorción a pared celular; (E) Absorción a través de membrana celular; (F) Adsorción a membrana plasmática; (G) Adsorción a fitoquelatinas; (H) Adsorción a polifosfatos; (I) Precipitación inorgánica (carbonatos, hidróxidos, etc.); (J) Complejos con biomoléculas citoplasmáticas (Proteínas, polisacáridos, glutatión, etc); (K) Producción y exocitosis de quelantes orgánicos (Polisacáridos); (L) Transformación química; (M) Compartimentalización en vacuola; (N) Compartimentalización en núcleo; (Ñ) Compartimentalización en cloroplasto; (O) Compartimentalización en mitocondria; (P) Transporte de metal hacia el exterior (Modificado de Perales-Vela, 2008).

4.1 Unión extracelular y precipitación por quelantes de origen orgánico

El intercambio iónico que se da en la pared celular del alga no es un simple evento pasivo, muchos de los compuestos sintetizados intracelularmente y depositados en la pared celular para unir los metales dependen de la energía metabólica para su síntesis. Se ha reportado, que organismos tolerantes secretan mayor cantidad de polímeros quelantes que los organismos sensibles (Rai *et al.*, 1981).

En diferentes algas y cianobacterias se ha reportado la adsorción intracelular de los metales pesados a través de la formación de complejos con ortofosfatos. Los gránulos de polifosfato, son polímeros lineales de residuos de ortofosfatos (Pi) con enlaces fosfoanhidro ricos en energía, los cuales se reconocen como reservas de fósforo en la célula. Estos polímeros se fraccionan en pequeñas porciones y funcionan como quelantes de metales como Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , y Pb^{2+} , transformándolos en una forma inocua para la actividad citoplasmática (Pawlik-Skowrońska y Skowroński, 2001; Nishikawa *et al.*, 2003).

4.2 Impermeabilidad y exclusión

Es bien reconocido, al menos en vegetales, que la pared no es simplemente una barrera inerte de moléculas de celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, sino más bien una estructura dinámica que es parte de la matriz extracelular, la cual está asociada a múltiples procesos fisiológicos de la planta que dependen del metabolismo celular (Pawlik-Skowrońska y Skowroński, 2001).

En algas, estudios de la dinámica de la pared celular y del metabolismo prácticamente no existen, sin embargo se sabe que la pared celular de estos organismos es tan compleja y dinámica como la de una planta superior. El género *Scenedesmus* posee una pared celular compuesta de dos capas. La interna compuesta de celulosa embebida en una matriz de hemicelulosa y la externa constituida de un polímero llamado esporopolenina, sintetizado a partir de politerpenos.

La unión de iones metálicos con polímeros extracelulares y con la pared celular es un importante mecanismo de tolerancia al metal en algas y otros microorganismos. Una considerable parte, cerca del 80-90 % en algunos casos, del metal acumulado en algas y cianobacterias se localiza en una superficie de la pared celular de estos microorganismos (Nalewajko y Olaveson, 1994; Reed y Gadd, 1990; Hall, 2000; Rannadhawa *et al.*, 2001).

4.3 Bioadsorción a pared celular

Por “bioadsorción” debemos entender todo aquel proceso relacionado con la adsorción del metal pesado por medio de una estructura o molécula de origen celular. La pared celular del alga puede funcionar como quelante de metales pesados a manera de un intercambiador iónico. La superficie de las algas, es decir la pared y la membrana celular, poseen varios grupos funcionales como: carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), fosfato (-PO₃O₂), hidroxilo (-OH), y sulfhidrilo (-SH) capaces de unir metales catiónicos. El proceso de unión del metal pesado a la pared celular del alga puede ser físico (electrostático o por fuerzas de London-van der Waals) o por unión química (iónica o covalente). En el proceso de adsorción, los cationes del metal pesado se unen a los aniones formando un complejo coordinado. (Crist *et al.*, 1981; Pawlik-Skowrońska y Skowroński, 2001).

El metal pesado usualmente se une a los sitios aniónicos por desplazamiento de protones de los grupos ácidos o desplazando metales (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺) unidos a sitios aniónicos. Algunos metales y metaloides pueden existir en una forma aniónica, los cuales también pueden ser adsorbidos por sitios catiónicos como aminas e imidazoles (Pawlik-Skowrońska y Skowroński, 2001).

La adsorción de los metales a la pared de las algas depende al menos de tres aspectos según Darnall *et al.*, 1986, Kratochvil y Volesky, 1998 y Eccles, 1999: 1) tipo de intercambiador, esto depende del organismo ya que es específico, 2) la concentración de otros metales pesados o metales ligeros (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺), 3) el pH del efluente o la fase acuosa.

La capacidad de adsorción, área de absorción y especificidad por uno u otro metal varía entre especies y grupos taxonómicos de las algas. Las variaciones químicas y estructurales de la superficie de la pared celular, así como las

diferentes morfologías pudieran ser las responsables de las diferencias encontradas entre las especies (Pawlik-Skowrońska y Skowroński, 2001). Davis *et al.*, (2003) describen que la pared de las algas de los grupos de las Phaeophytas (Algas pardas o cafés), Rhodophytas (Algas rojas) y Chlorophytas (Algas verdes), poseen un esqueleto fibrilar compuesto de celulosa, en el cual se encuentra embebida una matriz amorfa compuesta de polisacáridos, proteínas y lípidos complejos. En las Phaeophytas, la matriz está constituida de alginato o ácido alginico, con pequeñas porciones de polisacáridos sulfurados, mientras que en las Rodophytas los polisacáridos pueden poseer galactanos sulfurados. En el caso de las Chlorophytas la matriz está compuesta de pectinas con polisacáridos con terminales de ácido galacturónico, xilanos, mananos y proteínas.

4.4 Desintoxicación interna

Una respuesta común de muchas algas al ser expuestas a metales pesados es la síntesis intracelular de polipéptidos con la capacidad de quelar los metales, llamados fitoquelatinas o metalotioninas de tipo III. Estas biomoléculas no son de origen ribosomal, sino son sintetizadas citoplasmáticamente por la enzima fitoquelatin sintasa (E.C. 2.3.2.15), que es una γ -glutamil-cisteina sintasa (Perales-Vela *et al.*, 2006).

Las fitoquelatinas son unidades peptídicas repetidas de los aminoácidos Glutámico-Cisteina_(n=2-9)-Glicina. Estas moléculas son sintetizadas por las algas al ser expuestas a Cd^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Au^+ , tanto *in vivo* como *in vitro* (Robinson, 1997).

Cuando los metales pesados son transportados dentro de la célula, las fitoquelatinas a través de las cargas negativas de las cisteínas se asocian a éstos, formando un enlace coordinado con los cationes metálicos. Los complejos fitoquelatina-metal pueden permanecer en el citoplasma o ser compartamentalizados dentro de la vacuola, cloroplasto o mitocondria (Heuillet *et al.*, 1986; Avilés *et al.*, 2003; Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2005).

La desintoxicación interna depende de la síntesis de compuestos orgánicos que permiten la inactivación del metal. Las fitoquelatinas dependen de la energía celular para su síntesis, se ha encontrado que estos complejos metal-fitoquelatina se acumulan en la vacuola y el núcleo. Según algunos estudios

todos los miembros de la clase Phycophyta utilizan un mecanismo de bioadsorción por fitoquelatinas semejante al de plantas superiores. Estos autores encontraron que *Scenedesmus acutiformis* expuesta a cadmio y níquel sintetiza una fitoquelatina de 15 residuos de (γ -Glu-Cys) (Gekeler *et al.*, 1988; Nalewajko y Olaveson, 1994).

4.5 Transformación del metal

Este proceso ha sido ampliamente estudiado en bacterias, sin embargo también sucede en las algas y consiste en transformar químicamente los metales pesados a especies inocuas. Estas transformaciones involucran reducciones, oxidaciones y la adición o eliminación de radicales alquilo, siendo las más comunes las metilaciones por ejemplo *Chlorella* es capaz de volatilizar mercurio, a través de un proceso enzimático estimulado por luz. Algunos otros organismos incluyendo algas pueden llevar a cabo una bio-metilación de metales pesados como arsénico, cadmio, mercurio y plomo, etc. (Reed y Gadd, 1990).

4.6 Bioacumulación

El níquel puede ser acumulado en organismos terrestres y acuáticos. El ingreso del compuesto en las plantas terrestres depende de las características fisicoquímicas del suelo. Generalmente los niveles de níquel sobre $20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco son tóxicos para las plantas. Se han observado efectos acumulativos en vegetales cultivados en suelos tratados con sedimentos y en la vegetación cercana a fuentes emisoras. También se han encontrado altas concentraciones en plantas acuáticas, peces y algunas algas de ríos altamente contaminados ($42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). En el caso de especies marinas los moluscos tienden a acumular níquel, ya que este metal se encuentra disponible en los sedimentos de lagunas costeras, aunque su presencia mínima se debe a que está relacionado con las necesidades fisiológicas de los moluscos ya que es requerido en sistemas enzimáticos como la arginasa y carboxilasa. En el caso de los crustáceos como *Callinectes bocoirti* tiende a acumular níquel ya que en la laguna del Ostión, Veracruz se encontró 30 a $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ considerándose un intervalo fuera del intervalo permitido. Estos registros pueden considerarse como evidencias de la biomagnificación del níquel en la cadena alimenticia, por

lo que se deben considerar métodos efectivos para el tratamiento de aguas y suelos contaminados con níquel (Rodríguez, 1991; Páez, 1996; Krämer *et al.*, 1997).

III. Biología de las algas

1. Definición

El término alga no tiene una notación taxonómica formal, se usa rutinariamente para indicar un grupo artificial de organismos fotosintéticos oxigénicos de origen polifilético, es decir sin un mismo origen, que han seguido múltiples e independientes líneas de evolución (Barsanti y Gualtieri, 2006).

Las algas varían en tamaño desde células individuales de micrómetros hasta organismos pluricelulares que crecen más de 50 metros. La mayoría son fotoautótrofas, también pueden desarrollarse de manera heterotrófica o mixotrófica. Por lo general las algas se desarrollan en ambientes acuáticos marinos o dulces, sin embargo es posible encontrarlas en zonas termales, bancos de nieve, en concavidades húmedas de rocas en los desiertos, bosques y selvas tropicales. Algunas especies viven simbióticamente con animales, hongos u otras plantas (Darley, 1991; Weir *et al.*, 1991).

1.1 Clasificación

Para clasificar a las algas, existen varios criterios que toman en cuenta algunas características de cada alga. Uno de ellos es el tipo de clorofila que poseen, otro criterio es el de la composición de la pared celular, es decir, los componentes que le dan el color característico a los diferentes tipos de algas (verdes, rojas, cafés, etc.), otro criterio que se considera es la sustancia de reserva alimentaria que el alga posea, es decir, el tipo de sustancias que guardan para nutrirse cuando no existen posibilidades favorables de realizar la fotosíntesis. Con base en estos elementos y otros, cada alga se agrupa en una división, en una clase, orden, familia, género y finalmente especie (Darley, 1991).

Las investigaciones actuales sugieren que existen, al menos, 16 líneas filogenéticas (grupos de organismos con un antepasado común). La siguiente clasificación es una de las muchas que se encuentran en los textos y que tratan

de unificar esta diversidad que existe en el grupo de las algas (Darley, 1991; Encarta[®], 2007).

1. División Cyanophyta: Algas verdeazuladas
2. División Euglenophyta: Euglenoides
3. División Chlorophyta: Algas verdes
4. División Pyrrophyta: Dinoflagelados
5. División Rhodophyta: Algas rojas
6. División Pheophyta: Algas pardas
7. División Bacilloriophyta: Algas Diatomeas
8. Division Chrysophyta: Algas doradas-pardas

1.2 Biología

Las algas son eucarióticas, con excepción de las cianobacterias, que también han recibido el nombre de algas verdeazules, que son organismos procariotas.

En el caso de las algas eucariontes, un importante organelo que las caracteriza es el cloroplasto, que contiene los pigmentos necesarios para la optimización de la energía lumínica durante el proceso fotosintético. En la mayoría de las algas el principal pigmento es la clorofila, sin embargo muchas de ellas contienen otros pigmentos secundarios, como; carotenoides, que son pardos o amarillos, y las ficobilinas, que son rojas o azules, pigmentos secundarios que proporcionan a las algas sus colores característicos.

La mayoría de las algas tienen paredes celulares rígidas compuestas principalmente por celulosa. Una excepción son las diatomeas, cuyas paredes se componen principalmente de sílice. Algunas algas presentan estructuras similares a látigos, llamados flagelos, unidos a sus paredes, con las cuales adquieren la capacidad de desplazarse a través de la columna de agua. Unas pocas especies que carecen de paredes celulares rígidas son capaces de extender hacia fuera una parte de su cuerpo para arrastrarse sobre superficies sólidas, de forma parecida a como hacen las amebas (Darley, 1991; Barsanti y Gualtieri, 2006; Encarta[®], 2007).

Las algas se reproducen sexual o asexualmente y muchas de ellas de las dos formas. En la reproducción asexual un individuo da lugar a otros dos sin

combinar su material genético con el del otro individuo. La forma más simple de reproducción asexual es la fisión binaria. Existe un proceso similar, llamado gemación o brotación, donde una yema se despega del alga pluricelular y origina un nuevo organismo. Muchas algas producen también células especiales, llamadas esporas, capaces de desarrollarse en nuevos organismos. Si estas esporas se mueven mediante flagelos se llaman zoosporas (Darley, 1991; Encarta[®], 2007).

En la reproducción sexual, se combina el material genético de dos individuos. La forma más simple de reproducción sexual es la conjugación, cuando dos organismos similares se unen e intercambian su material genético. Otras algas pluricelulares llevan a cabo una reproducción sexual más compleja que implica la unión de células reproductoras especiales, llamadas gametos, para formar el cigoto y dar lugar a dos células hijas (Darley, 1991; Encarta[®], 2007).

2. El Género *Scenedesmus*

Scenedesmus es un género de microalgas verdes eucariotas de la familia *Chlorophyceae*, caracterizado por crecer en colonias de 2-16 células siendo las más comunes aquellas de dos y de cuatro células (Peña-Castro, 2002). El género se distribuye en todo el mundo en cuerpos de agua dulce y se ha encontrado en cuerpos contaminados por metales pesados (Trainor, 1998).

2.1 Biología del Género

Scenedesmus es un género de clorofíceas ampliamente distribuido a nivel mundial, y se reporta en diferentes ambientes en las aguas continentales mexicanas (Ortega, 1984; Dzhambazov *et al.*, 2003). Según Bold *et al.*, (1980) el género se ubica jerárquicamente de la siguiente forma:

Reino: *Plantae*

División: *Chlorophycophyta*

Clase: *Chlorophyceae*

Orden: *Chlorococcales*

Familia: *Scenedesmaceae*

Género: *Scenedesmus*

La descripción del género *Scenedesmus* es la siguiente: Células de forma elipsoidal o fusiforme; según Trainor (1978) es el grupo formador de colonias mejor conocido; se agrupan en cenobios de 2, 4, 8 ó 16 células en series lineales para formar una colonia plana; las células están dispuestas lado con lado, sus ejes mayores son paralelos. Los cenobios de 6 células están frecuentemente ornamentados con espinas o prolongaciones más o menos largas. En ocasiones las células marginales del cenobio presentan prolongaciones o crestas, diferentes a las de las células internas; Edwar (1989), Trainor (1978) y Round (1981) indican que las especies difieren ampliamente en el número y tipo de espinas en sus células y en la textura de la pared; éstas están compuestas de agregados proteínicos y probablemente auxilian en la flotación de las colonias. Cada célula tiene un cloroplasto parietal con un pirenoide usualmente fácilmente visible.

Las investigaciones a microscopia electrónica han mostrado que la pared celular de *Scenedesmus* tiene una compleja estructura. En el lado interno de la pared esta soportado por una capa robusta, que contiene una sustancia similar a la esporopolenina. En el lado externo se encuentra la siguiente capa total, la cual es soportada por una serie de pequeñas barras (columnela) y abren paso a intervalos de cerdas, las cuales tienen su propia sub-estructura compleja. Las células estas rodeadas por un gran número de cerdas, las cuales son largas y delicadas (100-200 μm x 25-40 nm) (Nilshammar y Walles, 1974).

Scenedesmus se reproduce por medio de si mismas para la producción de autocolonias. Algunas de estas colonias hijas (Cenobios), los cuales son formados por una de las células de la colonia parietal. Se ha mostrado que posiblemente muchas morfologías de *Scenedesmus*, de unicelular a colonia, son causadas por cambios del medio en el que se encuentran creciendo (Edwar, 1989).

El contenido de las células parietales se divide en un número de células hijas no flageladas, las cuales subsecuentemente se reagrupan en forma de una nueva colonia hija: una autocolonia. En ciertas circunstancias, a razón de las condiciones de deficiencia de nitrógeno, *Scenedesmus* quizá pueda formar zooides, los cuales pueden recombinarse sexualmente (Edwar, 1989).

Las especies de *Scenedesmus* son comunes en aguas dulces y salobres, especialmente en condiciones bastante ricas en nutrientes. Mas de 100

especies y variedades han sido descritas (van den Hoek, 1995); aunque la determinación de las categorías taxonómicas de especies, subespecie, variedad y forma no resulta sencilla pues el género muestra una fuerte tendencia a desarrollar variaciones morfológicas (Flores, 1999. *Scenedesmus* es un género usado en investigaciones de fisiología y bioquímica (van den Hoek, 1995), en estudios de genética y en el análisis de las respuestas de sus células a sustancias químicas (Flores, 1999).

IV. JUSTIFICACIÓN

En el ecosistema acuático existe una función integral del ciclo biogénico del níquel, sin embargo, el incremento desproporcionado de este debido directamente a las actividades antropogénicas exige el conocimiento del impacto en los organismos fotosintéticos debido a que son la base de la cadena alimentaria. Este conocimiento no sólo debe involucrar el efecto en el crecimiento, sino en la fisiología completa de los organismos a fin de establecer las concentraciones permisibles en las aguas residuales que se liberan al ambiente acuático.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterización fisiológica de *Scenedesmus incrassatulus* en respuesta a la exposición a níquel.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el crecimiento poblacional en presencia de níquel
2. Caracterizar la morfología y ultraestructura celular en respuesta a la exposición a níquel.
3. Cuantificar la actividad fotosintética y respiratoria en respuesta a la exposición a níquel.

VII. METODOLOGÍA

1. Cultivo madre

Cultivos axénicos de *Scenedesmus incrassatulus* (CLHE-Si01, Laboratorio de Hidrobiología Experimental ENCB-IPN, México). Las condiciones de cultivo para todos los experimentos fueron: Medio de cultivo “Perales-Cañizares-González” (PCG), libre de EDTA, pH 6.4 (Perales-Vela *et al.*, 2007) [ver apéndice], temperatura 20-25 °C, densidad de flujo fotónico (DFF) 200 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$, volumen de aire-volumen de medio⁻¹m⁻¹ (vvm) 0.5, fotoperíodo 14:10 (luz/oscuridad), volumen de trabajo 900 ml. Los cultivos que se utilizaron para la experimentación fueron resebrados por lo menos 4 veces para sincronizar la división celular, antes de ser usados en los ensayos experimentales.

2. Cultivos experimentales

Los cultivos semilla (inóculo) se cultivaron en botellas cuadradas de 1 litro, a las cuales se les inocularon células hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 - 0.5 a 680 nm, aproximadamente de 0.6 a 0.8 $\times 10^6$ células·ml⁻¹.

3. Protocolo experimental

Los cultivos semilla creciendo por 96 a 120 h, (mitad de la fase exponencial), se mezclaron en un matraz de 3 litros para homogenizar la población. Los lotes experimentales se realizaron en botellas cuadradas de vidrio de 500 ml. El volumen de trabajo fue de 250 ml, por lo cual utilizando un matraz aforado se agregó suficiente níquel y medio “PCG” para alcanzar las siguientes concentraciones de Ni²⁺: 0, 4.6, 9.2, 13.8, 18.4, 23 mg·L⁻¹. Los cultivos se mantuvieron en las condiciones de cultivo antes mencionadas por 48 h, para después determinar los siguientes parámetros fisiológicos:

4. Determinación de peso seco

Se filtraron por vacío, alícuotas de volumen conocido de cada lote experimental, en membranas Millipore® de 5.0 μm de poro, previamente secadas

hasta peso constante; las muestras fueron secadas por 72 h a 80 °C para determinar su peso mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PSB} = [\text{Pf} - \text{Pi} / \text{V}(\text{ml})] * 1000$$

Donde: PSB= Peso seco de la biomasa

Pf= Peso final (biomasa+membrana)

Pi= Peso Inicial (membrana)

V(ml)= Volumen tomado del cultivo experimental

5. Determinación de pigmentos fotosintéticos

La concentración de pigmentos (Clorofila total, *a* y *b*) y carotenoides se obtuvo utilizando las fórmulas descritas por Wellburn (1994). El paquete celular obtenido por centrifugación de 5 ml del cultivo, fue resuspendido en 2 ml de metanol 100 % para después calentarlo por 1 minuto a 90 °C (Strasser, 1997). Las muestras calentadas se centrifugaron y el extracto metanólico se aforó al volumen original y se midió a 470, 653, y 666 nanómetros de longitud de onda, para después cuantificar el contenido de pigmentos según las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila } a = 15.65 (A_{666}) - 7.34 (A_{653})$$

$$\text{Clorofila } b = 27.05 (A_{653}) - 11.21 (A_{666})$$

$$\text{Carotenoides totales} = [1000(A_{470}) - 2.86 (\text{Clorofila } a) - 97.64 (\text{Clorofila } b)] / 221$$

6. Actividad metabólica (respiración y fotosíntesis)

Transcurrido el tiempo de exposición al níquel, se tomaron alícuotas de 5 ml de cada lote experimental por triplicado. Estas se centrifugaron (3,000 rpm x 10 min) y se lavaron dos veces con un amortiguador de K₂HPO₄ 100 mM pH 7.0 para eliminar el Ni²⁺ no removido por las células (Perales-Vela *et al.*, 2007). La pastilla del último lavado se resuspendió en 1 ml de K₂HPO₄ el cual estaba a 30 °C y saturado con aire.

Las mediciones de liberación y consumo de oxígeno se realizaron en un oxímetro (YSI, USA) con baño regulado a 30°C. La actividad fotosintética se midió por la liberación de oxígeno fotosintético en presencia de luz y la respiración por el consumo de oxígeno a la oscuridad. Para medir la tasa fotosintética, las muestras

fueron iluminadas con luz blanca actínica de $800 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$ por un minuto e inmediatamente después de apagada la luz, se registró el consumo de oxígeno respiratorio por 2 minutos. El origen fotosintético de la liberación de oxígeno y el respiratorio del consumo se comprobó utilizando inhibidores específicos, 3-(3,4 diclorofenil)-1 (DCMU) para el caso de la fotosíntesis y cianuro de potasio (KCN) para la respiración.

7. Determinación de actividad fotosintética por emisión de fluorescencia de la clorofila *a*

7.1 Análisis de la cinética de emisión de fluorescencia por PSII: Prueba OJIP

La emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II fue medida utilizando una fluorómetro portátil HANDY-PEA (Hansatech, UK). Las muestras de cada tratamiento ($n=5$) fueron ajustadas a una misma absorbancia (0.4) a 680 nm. Se tomaron 0.6 ml de células de cada tratamiento y se depositaron por vacío en filtros de 5.0 μm de poro (Millipore®). La emisión de fluorescencia se midió directamente del tapete celular formado en los filtros. Las muestras fueron preincubadas a la oscuridad por 5 minutos, tiempo suficiente para estabilizar el valor de la fluorescencia mínima (F_0), para después ser irradiadas con una luz roja saturante de 660 nm de longitud de onda, con una intensidad de $3000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$. La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm. Los valores de la Fluorescencia mínima, (F_0) a los 50 μseg y la fluorescencia máxima, (F_M) a los 200 mseg y la fluorescencia variable ($F_V = F_M - F_0$) fueron registrados automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma compañía (Hansatech, U.K.) y el programa Biolizer-HP3, diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra en Suiza. (van Heerden *et al*; 2003).

7.2 Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II (ΦPSII)

El rendimiento cuántico operacional del fotosistema II (ΦPSII) se registró por la técnica de pulsos modulados (PAM por sus siglas en inglés), utilizando un equipo

de fluorescencia FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, U.K). El valor de F_O a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ($0.1 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$), después de 60 segundos se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$ por 0.8 seg para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia F_M . La fluorescencia estacionaria F_S , se obtuvo utilizando una luz actínica blanca de $900 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$. El valor de fluorescencia máxima en estado estacionario F_M' se obtuvo sobreponiendo un pulso de luz blanca saturante de $10,000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$ por 0.8 seg. La fluorescencia mínima F_O' en estado estacionario se obtuvo apagando la luz roja e irradiando con luz infrarroja de 750 nm a baja intensidad $5 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{seg}^{-1}$. En base a la cinética y valores de fluorescencia puntuales se obtuvieron los siguientes valores: El rendimiento máximo para la fotoquímica primaria ($F_V F_M$) y la eficiencia cuántica operacional para PSII ($\Phi_{PSII} = F_M' - F_S / F_M$) (Maxwell y Johnson, 2000).

8. Ultraestructura celular

Las muestras fueron procesadas en la unidad de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, según el siguiente método: Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de fosfato de sodio por 2 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 4 000 rpm en tubos Eppendorf de 1.5 ml, hasta formar un paquete. El paquete se lavó 3 veces cambiando el medio de fosfatos cada 15 min. Se realizó una postfijación con tetraóxido de osmio al 1 % en amortiguador de fosfato de sodio por 2 horas, lavando las muestras 3 veces cambiando el medio cada 15 min. Las muestras fijadas, fueron deshidratadas durante 15 min c/u a 4 °C con etanol-agua v/v a 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % de etanol, finalmente se realizaron 2 cambios más con etanol al 100 % de 15 min c/u. Las muestras deshidratadas se incubaron dos veces por 15 min en óxido de propileno al 100 %. Finalmente las muestras se dejaron en óxido de propileno-resina epon (1:1) por 48 horas en un desecador a temperatura ambiente. Se realizó un cambio con resina epon al 100 % en rotación por 4 h. Se permitió la polimerización de la resina durante 48 horas a 60 °C. Se

realizaron cortes de 90 nm en un ultramicrotomo Reichert-Jung. Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 2 % durante 30 minutos y posteriormente con citrato de plomo al 2 % durante 10 minutos. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200CXII a diferentes aumentos

9. Determinación de Níquel

En membranas de nitrocelulosa de 5.0 μm de diámetro (Millipore[®]) previamente secadas y pesadas, se filtraron al vacío 30 ml de células de cada tratamiento (n=3). Los filtros con las células se digirieron utilizando 5 ml de una mezcla de ácido perclórico, nítrico y sulfúrico (5:1:1 v/v). La mezcla digerida conteniendo los iones absorbidos y adsorbidos, se aforó a 25 ml con agua desionizada y se almacenó a 4 °C. El medio obtenido de la filtración de las células conteniendo los metales residuales no removidos fueron separados según su tratamiento (n=3), y se acidificaron utilizando 100 μl de ácido nítrico concentrado, para después almacenarse a 4 °C. La concentración de iones se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (PyUNICAM[®]) utilizando una curva patrón de níquel.

Todos los experimentos mencionados en cada parte de este protocolo se realizaron por duplicado y triplicado (n=2 a 3) y de cada tratamiento se hicieron de 3 a 5 repeticiones (n=3 a 5).

Las diferencias estadísticas entre las muestras se analizaron a través de una prueba de "t" de student, Anova y agrupando los datos con la prueba de Tukey y graficando con el programa SIGMA-plot[®] (STAT) [ver apéndice].

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Crecimiento

El efecto a la exposición a níquel en el crecimiento y la división celular de *Scenedesmus incrassatulus* se muestra en las figuras 3, 4 y 5. Como se puede observar en la figura 3, el número de células disminuyó conforme aumentó la concentración de níquel en el medio de cultivo. En la misma forma, el crecimiento medido por la acumulación de peso seco por volumen del medio, disminuyó conforme aumentó la concentración de Ni^{2+} en el medio de cultivo comparado con el control (Figura 4).

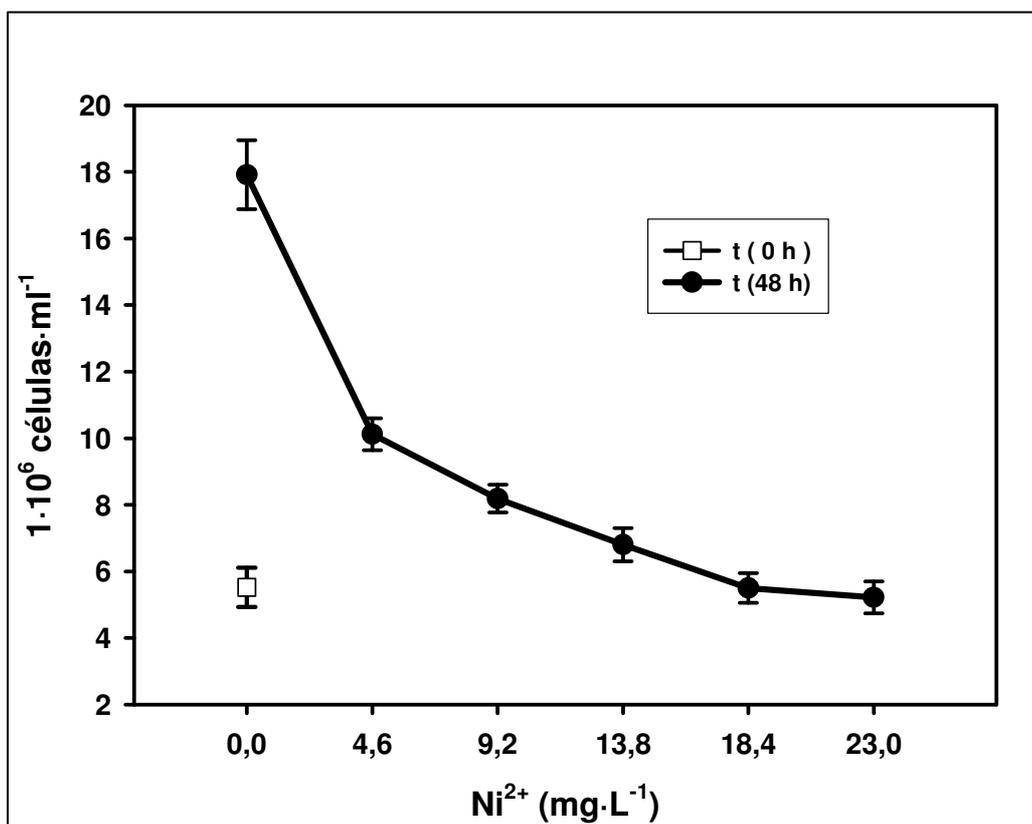


Figura 3. Efecto del Ni^{2+} sobre el crecimiento (células·ml⁻¹) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

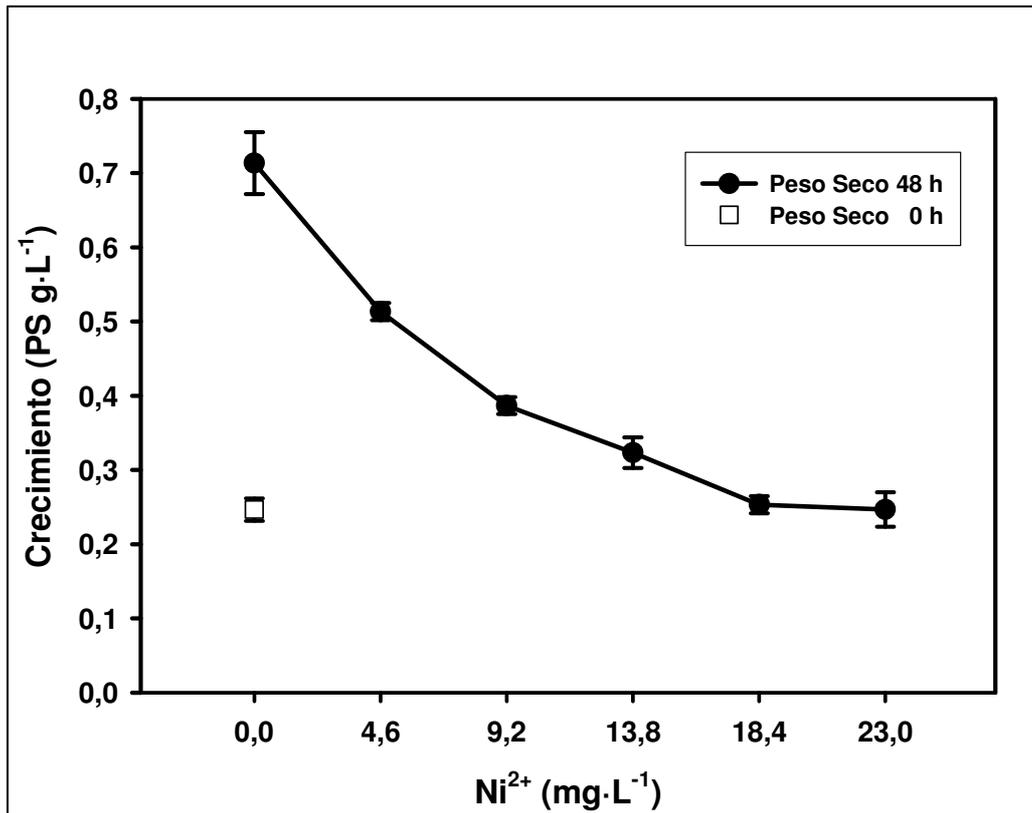


Figura 4. Efecto del Ni²⁺ sobre el crecimiento (peso seco g·L⁻¹) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

En la figura 5 se observa que conforme aumentó la concentración de Ni²⁺ en el medio de cultivo disminuyó la velocidad relativa de crecimiento y por ende el tiempo necesario para duplicar la población. La tasa de duplicación después de la exposición a Ni²⁺ aumentó de 1.18 d⁻¹ en las células control a 7.18 d⁻¹ en las células expuestas a 13.8 mg·L⁻¹ de Ni²⁺. Concentraciones superiores inhiben completamente la división celular (figura 5).

Utilizando los valores de crecimiento de la figura 3 se calculó la concentración efectiva de Ni²⁺ necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento (CE₅₀) de acuerdo al protocolo 121 para sustancias tóxicas de la OECD (OECD, 1984), encontrándose una CE₅₀ de 5.189 mg·L⁻¹.

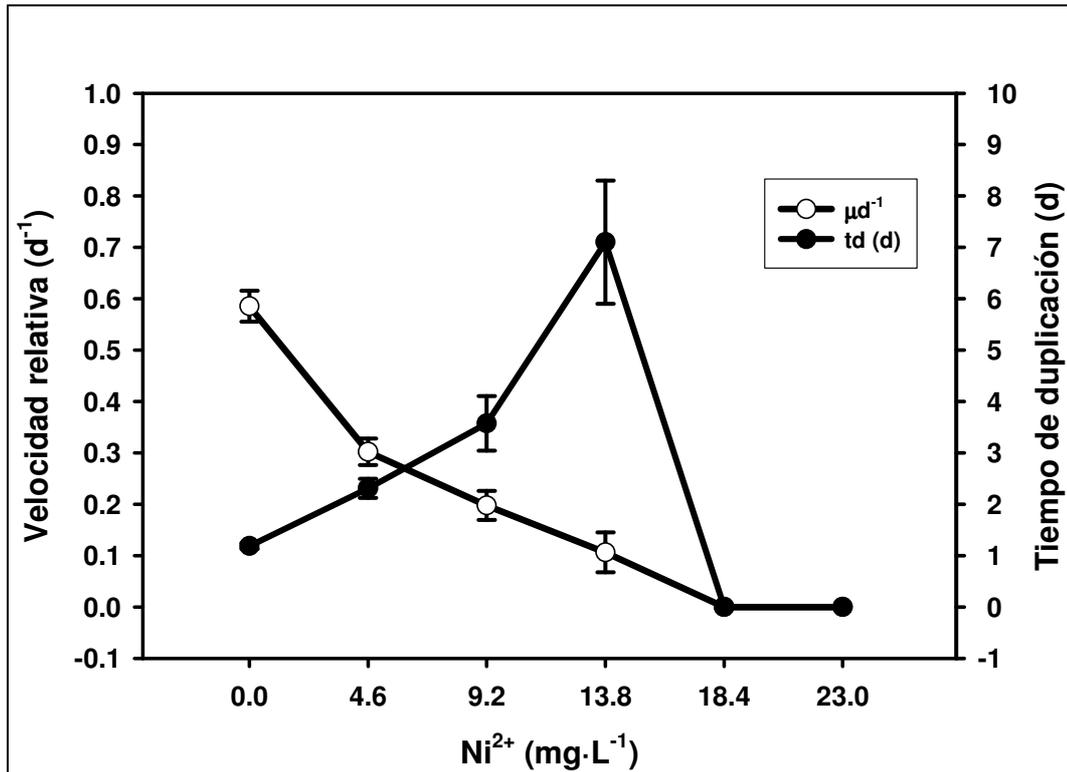


Figura 5. Efecto del Ni²⁺ en la velocidad relativa de crecimiento y el tiempo de duplicación de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

El Ni²⁺ es esencial para el crecimiento de muchos organismos, ya que es requerido en cantidades traza (pM) para el funcionamiento de varias enzimas, sin embargo, a concentraciones ligeramente por encima de las fisiológicas se vuelve tóxico (Mulrooney y Hausinger, 2003). La sensibilidad al metal es diferente en cada grupo taxonómico, así por ejemplo el crecimiento en microalgas es más sensible que el crecimiento en algunas eubacterias y hongos filamentosos. La división en *Saccharomyces cerevisiae* se reduce en 50 % a 330 μ M de Ni²⁺ y 170 μ M extiende la fase *lag* de crecimiento en *Escherichia coli* (Mulrooney y Hausinger, 2003). En contraste 47 nM inhiben el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* y 1 μ M inhibe el crecimiento de *Tabellaria flocculosa* (Spencer y Nichols, 1983). La sensibilidad a Ni²⁺ en el crecimiento difiere entre las especies de algas, por ejemplo, 1.7 μ M de Ni²⁺ es tóxico para *Scenedesmus acuminatus*, sin embargo 5 μ M de Ni²⁺ no afecta el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus capensis* y *Chlamydomonas eugametos* (Spencer y Nichols, 1983).

La inhibición o completa supresión del crecimiento por el Ni²⁺, es sólo una manifestación de la suma de los efectos del metal a nivel subcelular (Feng, *et al.*, 2004). El Ni²⁺ puede inhibir la replicación, transcripción y traducción en *E. coli* en solo 5 minutos de exposición, lo cual se correlaciona con la inhibición de algunas enzimas como glutamato, succinato, α -ketoglutarato e isocitrato deshidrogenasa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El Ni²⁺ también inhibe la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa en *Saccharomyces cerevisiae* (Mulrooney y Hausinger, 2003; Feng, *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha encontrado que el níquel reduce la división celular al afectar la estructura del DNA y los cromosomas, ya que modifica las proteínas vinculadas con el DNA. El efecto del metal aparentemente no es directo, sino que cataliza la formación de enlaces covalentes cruzados en las proteínas y los aminoácidos, así como por la formación de radicales de oxígeno los cuales pueden atacar directamente a la maquinaria de expresión genética y de división celular (Jin, 1998).

En resultados similares, Jin *et al.* (1996) encontraron una disminución del 95 % en el número de células de *Scenedesmus acutus f. alternans* y un 54 % en la biomasa, al exponerlas a una concentración de 50 μ M de Ni²⁺ durante 3 días. Por otro lado, Fargašová (1999 y 2001) encontró que el Ni²⁺ impacta negativamente en el crecimiento y división celular de *Scenedesmus quadricauda*. En sus investigaciones, encontró que al exponer las células a de 2 mg·L⁻¹ de Ni²⁺ durante 12 h, el crecimiento se redujo en 95 %. Por consiguiente al verse afectado el proceso de división celular el tiempo de duplicación aumenta mientras que la velocidad relativa de crecimiento disminuye. Tam *et al.* (2001) al exponer *Chlorella vulgaris* a 30 μ g·L⁻¹ de Ni²⁺, encontraron que el metal acumulado en las células causa un efecto tóxico en el crecimiento, disminuyendo la tasa de división celular. Salwa y Sabah (1980) reportaron que la exposición a 2 mg·L⁻¹ inhibe completamente el crecimiento de *Scenedesmus sp.*, además de que las células expuestas presentan cambios en la anatomía celular, así como en la estructura del cloroplasto.

2. Ultraestructura

Se analizó la estructura celular de las células expuestas a níquel durante 48 horas. Las células de los tratamientos testigo de *S. incrassatulus* de 5 a 7 días de cultivo miden aproximadamente entre 10 y 15 μm de largo y alrededor de 5 μm de ancho (Figura 6). Utilizando microscopía óptica no se logró observar cambios entre los diferentes tratamientos, por lo que se analizó el efecto del metal a través de microscopía de transmisión.

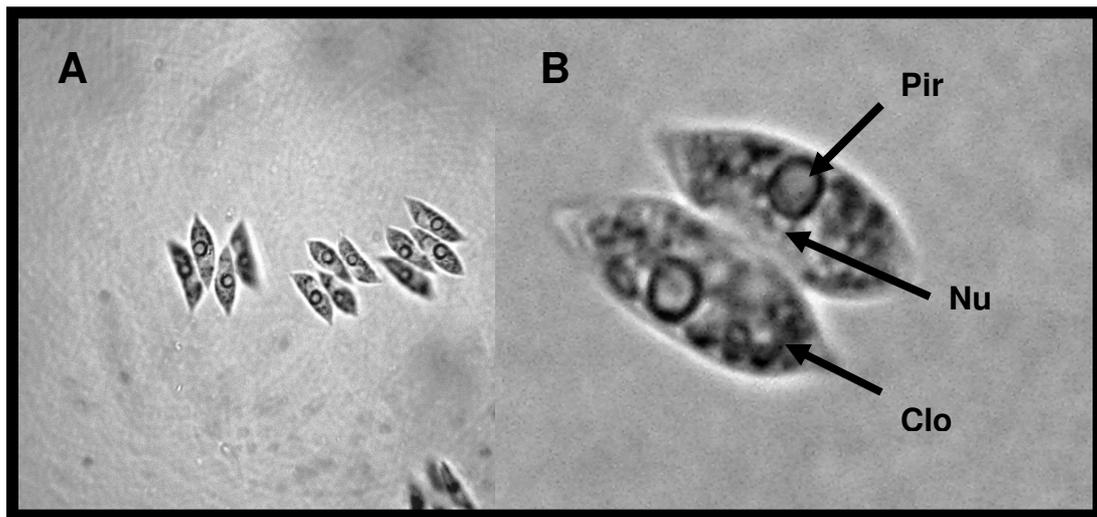


Figura 6. Micrografía óptica (A-400X; B,-1000X) donde se muestra la estructura celular de *S. incrassatulus*. (Las flechas indican: Núcleo (Nu); Cloroplasto (Clo); Pirenoide (Pir).

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células testigo se muestran en la figura 7. Se pudo observar claramente las estructuras celulares típicas de un cenobio de organismos pertenecientes al género *Scendesmus*. Se puede distinguir el cloroplasto en forma de copa con abundantes membranas tilacoidales. Dentro del cloroplasto, asociado a depósitos de almidón, se pudo observar una estructura de gran tamaño denominada pirenoide, el cual contiene la enzima fijadora de CO_2 del ciclo de reductivo de las pentosas, la Ribulosa, 1,5, bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RubisCO). La figura 7 muestra una pared celular trilaminar, la cual se asocia estrechamente a la membrana plasmática (Vega, 2006).

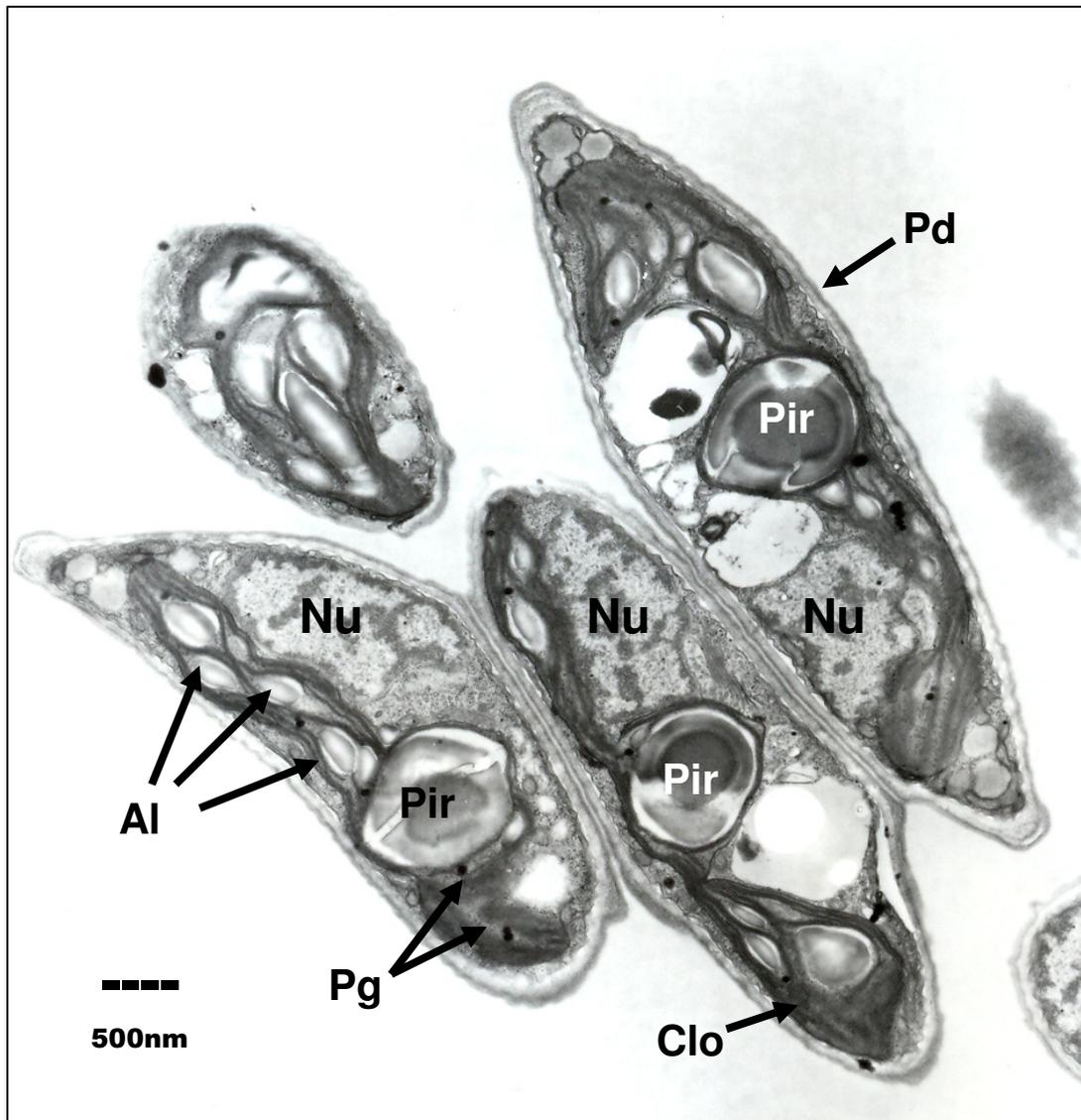


Figura 7. Micrografía electrónica de transmisión de las células testigo de *S. incrassatulus*. Núcleo (Nu); Cloroplasto (Clo); Pirenoide (Pir); Pared celular (Pd); Gránulo de almidón (Al); Plastoglóbulo (Pg).

Las figuras 8 y 9 muestran el efecto del Ni^{2+} sobre la estructura celular de *S. incrassatulus*. Comparado con las células testigo, la incubación por 48 h con níquel aún a la máxima concentración probada ($23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), no modificó sustancialmente la ultraestructura celular, sin embargo es de notar la aparición de acumulaciones electrondensas, las cuales pudieran ser depósitos de polifosfatos, así como una mayor acumulación de gránulos de almidón.

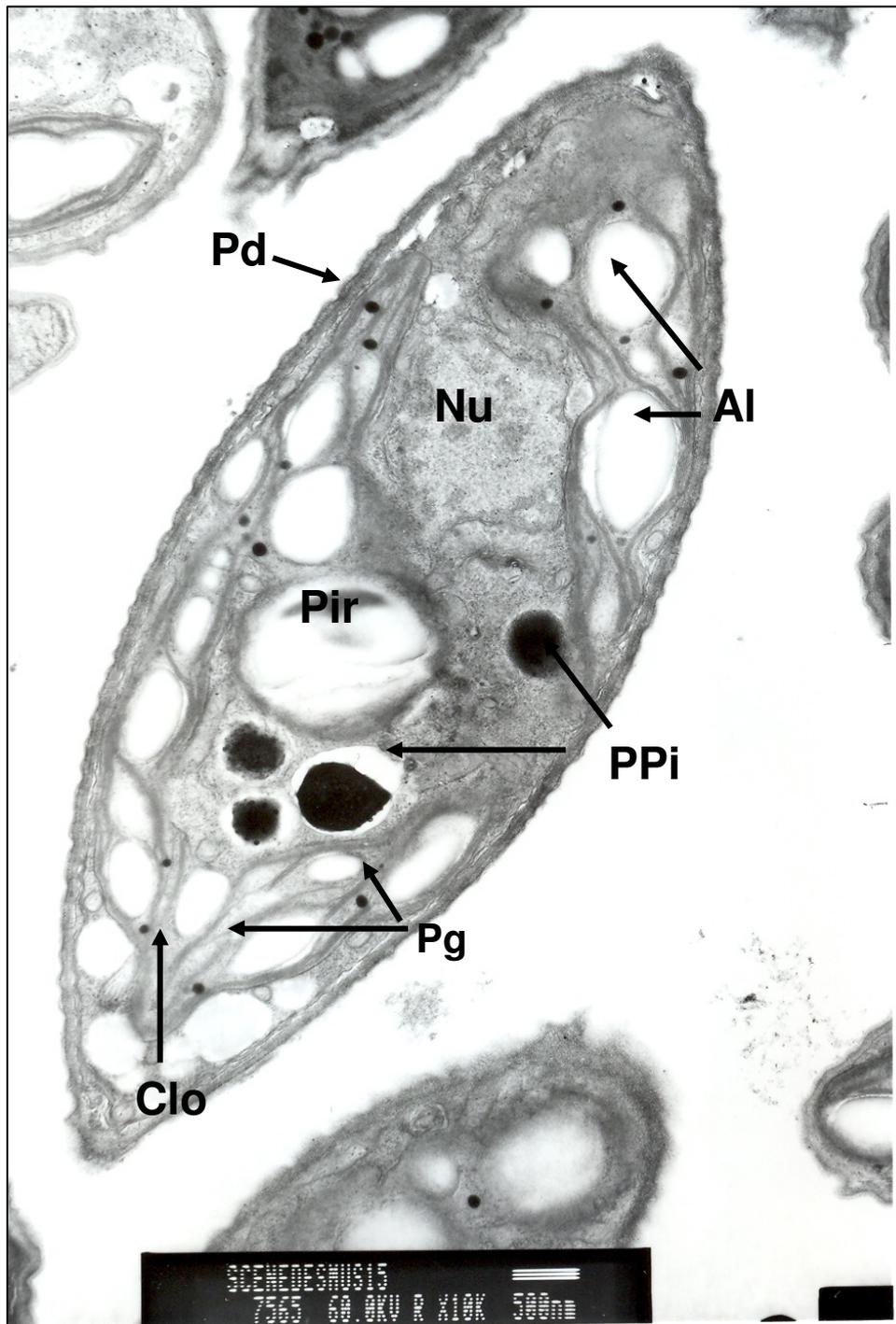


Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión de *S. incrassatulus* expuesto a 13.8 mg.L^{-1} de Ni^{2+} por 48 h. Núcleo (Nu); Cloroplasto (Clo); Pared celular (Pd); Gránulo de almidón (Al); Pirenoide (Pir); Depósitos de polifosfato (PPI); Plastoglóbulo (Pg).

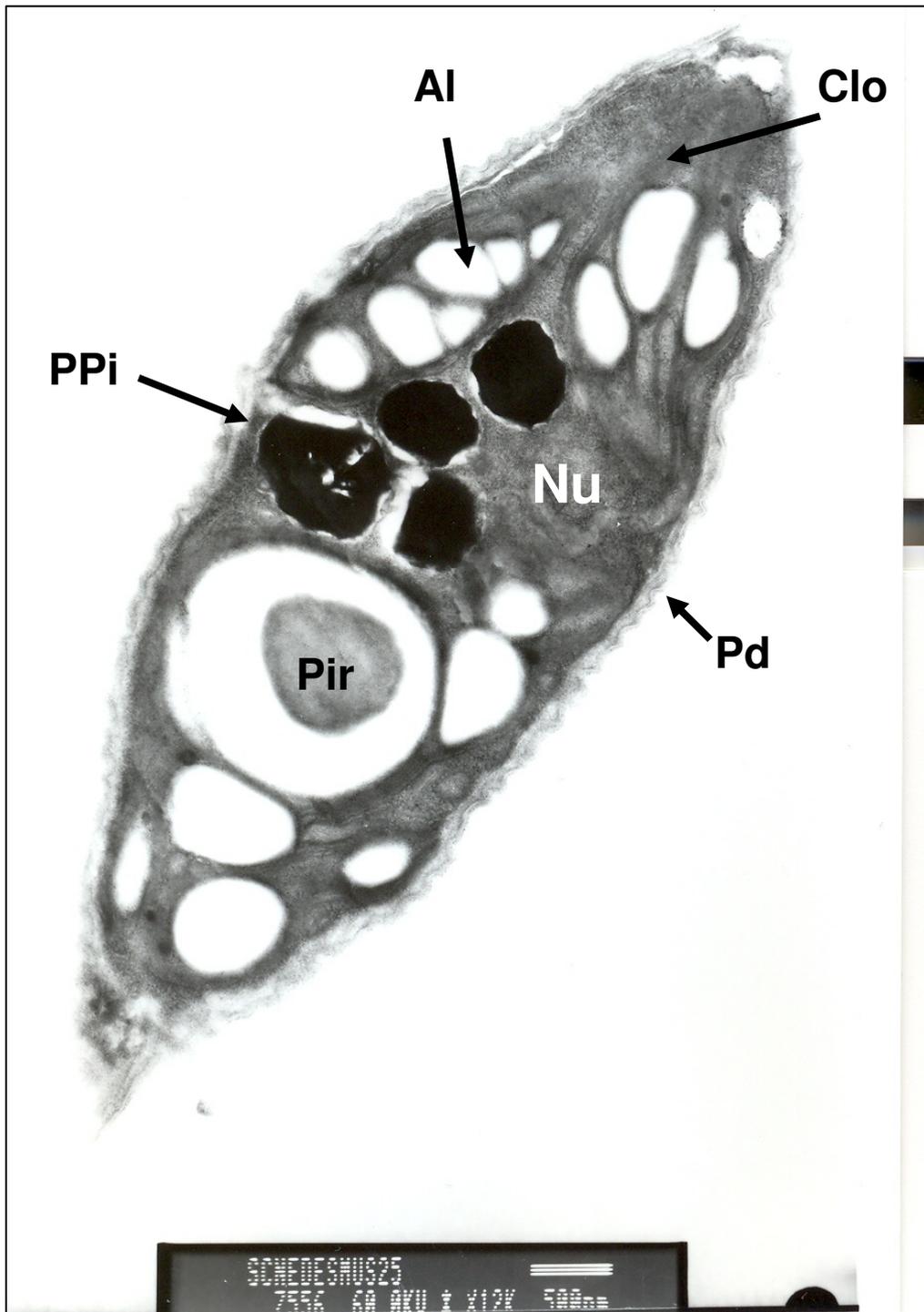


Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión de *S. incrassatulus* expuesto a 23.0 mg.L^{-1} de Ni^{2+} por 48 h. Núcleo (Nu); Cloroplasto (Clo); Pared celular (Pd); Gránulo de almidón (AI); Pirenoide (Pir); Depósitos de polifosfato (PPI).

Los depósitos de polifosfatos están formados por cadenas de ortofosfatos esterificados. Estos depósitos citoplasmáticos son comunes en las algas verdes (Clorofitas) y se piensa sirven no sólo como reserva de fosfato para las células, sino también como reservas de energía, ya que al romperse los

enlaces ésteres, la energía liberada puede ser acoplada a otros procesos celulares (Pawlik-Skowróńska y Skowróński, 2001; Seregin y Kozhevnikova, 2006).

Por otro lado, como se ha mencionado, uno de los mecanismos de tolerancia a los metales pesados que utilizan las microalgas, y en particular las del género *Scenedesmus*, es el formar precipitados de polifosfatos con el ion metálico, en donde los polifosfatos funcionan como quelantes catiónicos. De esta manera, la toxicidad de los iones libres en el citoplasma, es inactivada al formarse estos precipitados de metales, los cuales son inocuos para los procesos celulares (Nishikawa *et al.*, 2003). Jin (1998), trabajando con *Scenedesmus acutus*, no observó modificaciones estructurales en células expuestas a 100, 200, y 500 μM de Ni^{2+} , sin embargo, concentraciones superiores causaban numerosas precipitaciones de polifosfatos dispersos en el citoplasma, núcleo y entre las membranas tilacoidales, mostrando un deterioro significativo del cloroplasto y de la estructura del grana.

Molas (2002), encontró que la exposición a 85 μM de Ni^{2+} , modifica la ultraestructura del cloroplasto, disminuyendo la cantidad de granas, provocando una hinchazón en las membranas tilacoidales, así como la acumulación de gránulos de almidón, lo que se correlacionó con la disminución de la actividad fotosintética. La acumulación de gránulos de almidón, esta relacionada a una disminución en la exportación de fotosintetatos del cloroplasto al citoplasma, posiblemente por una disminución en su utilización, lo que resulta en una acumulación de los mismos dentro del cloroplasto en forma de almidón.

3. Metabolismo

3.1 Pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofilas en las células ha sido usado muchas veces como parámetro de crecimiento de los cultivos algales (Fargašová, 2001), sin embargo, no siempre guarda una relación directa (Perales-Vela *et al.*, 2007).

La figura 10 muestra que el efecto del níquel sobre el contenido volumétrico de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) es afectado de la misma manera que el crecimiento (figura 3). Lo anterior es congruente con el hecho de

que hay menos células por volumen y por lo tanto menos pigmentos en la misma relación. Sin embargo, el efecto del níquel en el contenido de pigmentos fotosintéticos en términos específicos, como número de células (figura 11), no guarda relación con la cinética de crecimiento (figura 3 y 4).

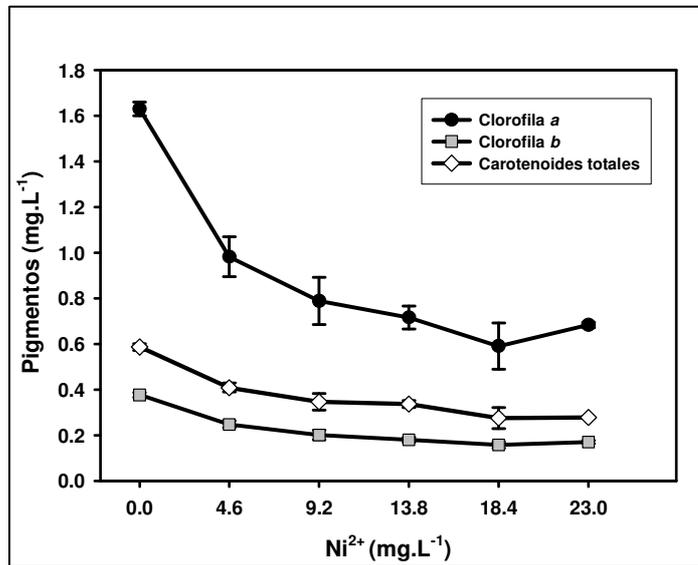


Figura 10. Efecto del Ni²⁺ en el contenido volumétrico de pigmentos fotosintéticos de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones ± desviación estándar.

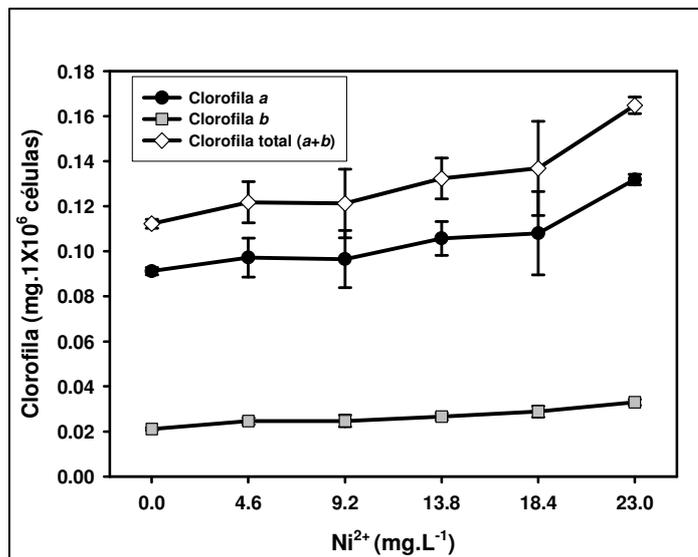


Figura 11 Efecto del Ni²⁺ sobre la cantidad por célula de clorofila a, b y clorofila total (a+b) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Aún cuando se ha reportado ampliamente que la exposición a elevadas concentraciones de níquel disminuye el contenido de clorofilas en plantas y algas, en el presente trabajo, la concentración de los pigmentos no disminuyó. La inconstancia entre el efecto del níquel en el crecimiento (Figura 3 y 4) y el contenido específico de pigmentos por número de células (Figura 11), pudiera indicar que la sensibilidad al metal por el proceso de crecimiento es diferente al del proceso de síntesis de clorofila. Por otro lado, también puede indicar que la concentración de níquel acumulado en el espacio intracelular donde se realiza el proceso de la división celular fue superior que la concentración del metal encontrado en el espacio donde se realiza el proceso de síntesis de pigmentos fotosintéticos.

El efecto del Ni^{2+} en el contenido de pigmentos fotosintéticos varía según el organismo. Wong y Chang (1991), reportaron que concentraciones de 0.1 a 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de níquel, inducen un incremento en el contenido de clorofila *a* en el cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*. Manankina *et al.*, (2003), reportaron que al exponer *Euglena gracilis* durante 7 días a 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M de Ni^{2+} , la concentración más baja no causa efecto, la intermedia induce una acumulación del 23 % de clorofila total (*a+b*) y la más elevada reduce el contenido de estos pigmentos. En plantas de *Helianthus annuus*, Zornosa *et al.*, (1999), reportaron una disminución del 40 % en el crecimiento de las hojas, 70 % del tallo y 92 % de la raíz al ser tratadas con Ni^{2+} , sin embargo, en cuanto a la concentración de clorofila no obtuvieron variaciones estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos.

La figura 12 muestra el efecto del Ni^{2+} en el contenido de carotenoides totales por célula. Como se puede observar el contenido de carotenoides totales aumentó en un 60 % a la concentración más elevada de Ni^{2+} ($23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) comparada con el testigo sin Ni^{2+} . Sin embargo, la relación Clorofila total/Carotenoides totales no se modificó entre las células expuestas por 48 h a $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ comparadas con el testigo sin Ni^{2+} .

Maninka *et al.*, (2003), trabajando con *Euglena gracilis* encontraron que la exposición a 10 y 100 μM de Ni^{2+} no causa diferencias en la relación clorofila *a/b* comparadas con el testigo sin metal, sin embargo, el contenido de carotenoides totales se incrementó en 15 %.

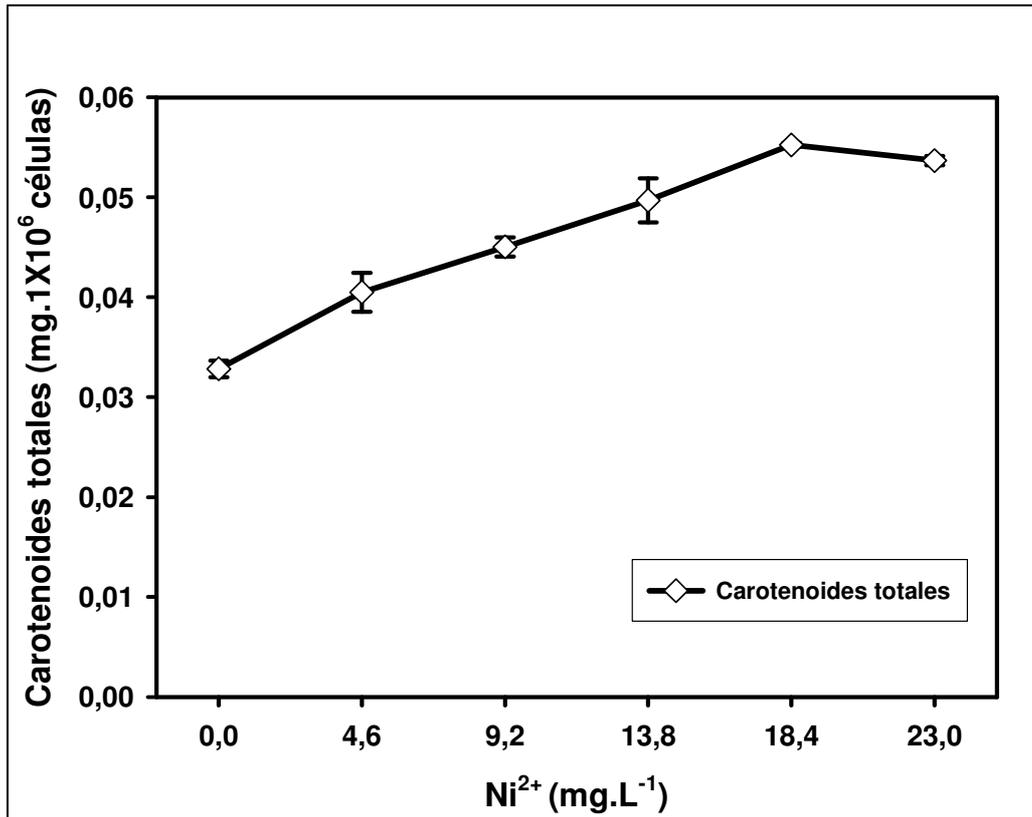


Figura 12 Efecto del Ni²⁺ sobre la cantidad por célula de carotenoides totales de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Los carotenoides juegan un papel estructural y funcional en ambos fotosistemas (PSII y PSI). En particular, los carotenoides participan como pigmentos accesorios en los complejos cosechadores de luz y también como protectores del aparato fotosintético, evitando que éste se inactive irreversiblemente cuando la energía de excitación que llega al PSII está en exceso. Este proceso lo realiza el β -Caroteno, el cual puede “apagar” o llevar a un estado basal a las clorofilas en estado de triplete (³Chl*) y el oxígeno en estado de singlete (¹O₂*) y también a través del ciclo de las xantofilas, las cuales disminuyen la formación de ³Chl* al apagar el estado excitado en singlete de la clorofila (¹Chl*) (Choudhury y Behera, 2001). Por otro lado, también se conoce que los carotenoides participan en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (Mimuro y Akimoto, 2003; Pinto *et al.*, 2003; Fiedor *et al.*, 2005).

3.2 Fotosíntesis

3.2.1 Liberación oxígeno

El efecto del Ni^{2+} en la actividad fotosintética medida como liberación de oxígeno, se muestra en la figura 13. Como se puede observar, la actividad fotosintética se modificó cuando la concentración del metal en el medio de cultivo fue superior a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La actividad se inhibió 58 % a la máxima concentración probada ($23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), comparada con el testigo sin Ni^{2+} .

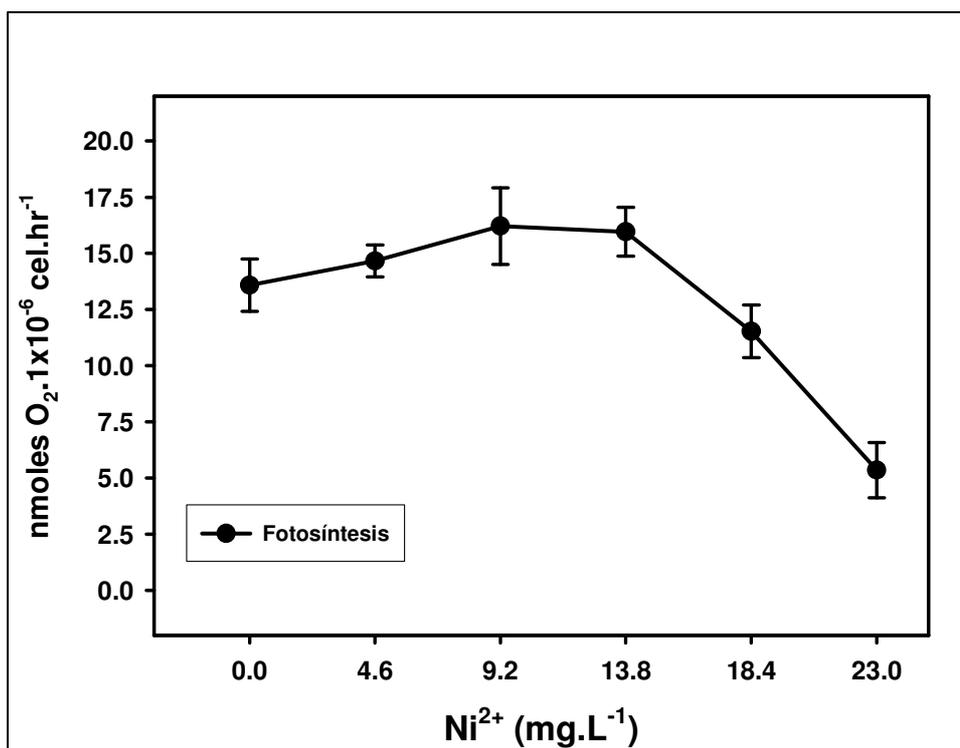


Figura 13. Efecto del Ni^{2+} sobre la actividad fotosintética (liberación de oxígeno) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

En las algas, elevadas concentraciones de Ni^{2+} pueden inhibir muchos procesos fisiológicos, incluyendo la absorción de NO_3^- , NH_4^- y de fosfatos, afectando indirectamente los procesos de crecimiento, fotosíntesis y respiración (Osman *et al.*, 2004). En cuanto al proceso fotosintético, los sitios de acción del Ni^{2+} incluyen el complejo liberador de oxígeno, la fijación de CO_2 y la estructura del cloroplasto (Boisvert *et al.*, 2007). El níquel como otros metales pesados inhibe el transporte electrónico en el Fotosistema II (PSII) en

cloroplastos aislados de algunas plantas superiores, afectando directamente la actividad de Quinona B (Q_B) (Boisvert *et al.*, 2007). Sin embargo la actividad del Ni²⁺ puede variar según las especies de algas, por ejemplo *Cylindrospermum* es más sensible en el Fotosistema I (PSI) a la acción de Níquel que en el PSII. Por otro lado, se ha observado que el Ni²⁺ puede inactivar PSII en *Nostoc muscorum* y a *Scenedesmus obliquus* por alteración y destrucción de las membranas fotosintéticas (El-Sheekh, 1993).

3.2.2 Eficiencia operacional del fotosistema II por emisión de fluorescencia de la clorofila a

La caracterización fotosintética de *S. incrassatulus* durante la exposición a Ni²⁺ se realizó utilizando la liberación de oxígeno fotosintético como evidencia global de este proceso metabólico, ya que en términos teóricos, por cada molécula de oxígeno liberado, se sintetizan tres moléculas de ATP y dos moléculas de NADPH, las cuales se utilizan para fijar una molécula de CO₂ (Salisbury y Ross, 1994). Sin embargo, la producción de oxígeno fotosintético es también un proceso que está directamente relacionado con la absorción de la energía electromagnética y el transporte electrónico en la membrana tilacoidal del cloroplasto, por lo cual puede ser monitoreado a través de la emisión de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (Perales-Vela *et al.*, 2007 y Perales-Vela, 2008).

La relación entre la emisión de fluorescencia de la clorofila y el proceso fotosintético es directa. La energía luminosa absorbida por las moléculas de clorofila puede liberarse por tres vías: (1) Puede ser usada para impulsar el proceso fotosintético (fotoquímico), (2) Puede ser disipada como calor, (3) Puede ser remitida como energía luminosa (fluorescencia) de menor energía. Estos tres procesos ocurren simultáneamente y por lo tanto “compiten” entre sí, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos (Maxwell y Johnson, 2000; Müller *et al.*, 2001). La medición de la emisión de la clorofila a en algas intactas, provee información de la absorción, distribución y utilización de la energía electromagnética para llevar a cabo el proceso fotosintético (Cid *et al.*, 1995).

La figura 14 muestra el efecto del Ni²⁺ en el rendimiento cuántico operacional (Φ PSII), el cual representa el transporte electrónico fotosintético *in*

vivo medido por la emisión de fluorescencia. Este parámetro se relaciona con la eficiencia del PSII cuando el flujo de electrones entre PSII y PSI está en equilibrio con la fijación de CO₂, de esta manera, cualquier evento que modifique el transporte o equilibrio de electrones en toda la cadena fotosintética, modificará este parámetro de manera directa.

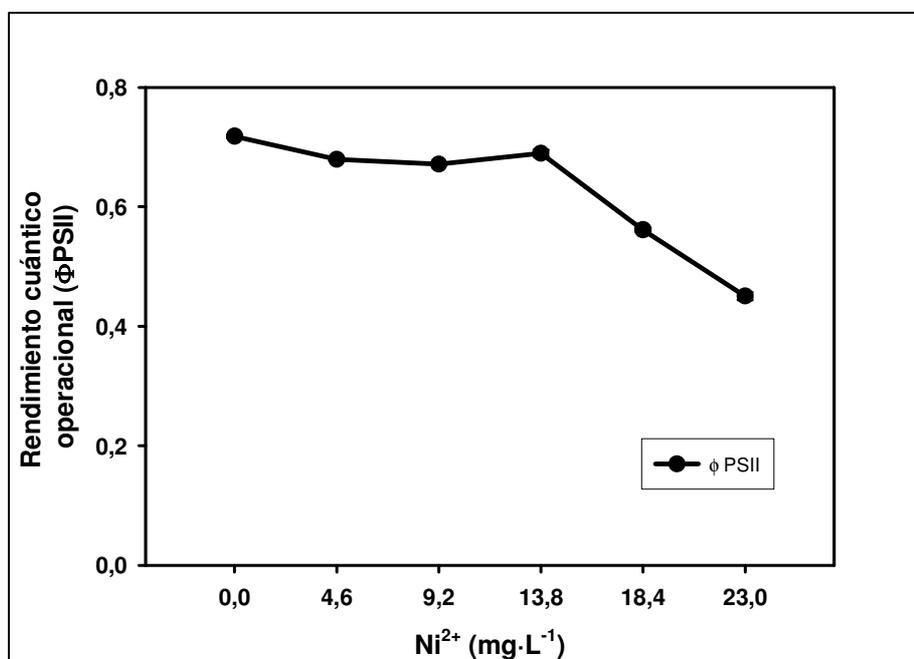


Figura 14. Efecto del Ni²⁺ el rendimiento cuántico operacional del PSII (Φ PSII) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 6 repeticiones.

Como se puede observar en la figura 14, de igual manera que la liberación de oxígeno (Figura 13), en las concentraciones máximas probadas de níquel (18.4 y 23.0 mg·L⁻¹), el transporte electrónico *in vivo* (Φ PSII) se redujo. La actividad se inhibió 37.2 % a la máxima concentración de Ni²⁺ probada (23 mg·L⁻¹), comparada con el testigo sin Ni²⁺.

El efecto del Ni²⁺ en el transporte electrónico fotosintético *in vivo* a través del fotosistema II, se registró mediante la emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* en muestras preacondicionadas a la oscuridad. La Figura 15 muestra el efecto de la exposición a Ni²⁺ sobre el desarrollo de la cinética de fluorescencia variable de la clorofila *a* al exponer las células durante 48 h al metal.

Es importante puntualizar que cuando una muestra preincubada a la oscuridad se ilumina, el incremento de la fluorescencia de la clorofila *a* es un

reflejo del cierre (“reducción”) de los centros de reacción del PSII y por lo tanto provee información de la actividad fotoquímica del PSII y la reducción de la poza de plastoquinonas (Mallick y Mohn, 2003).

La cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* (conocida como “cinética de Kautsky” en honor a su descriptor) tiene una figura compuesta de cuatro inflexiones nombradas O, J, I y P. La inflexión “O”, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_O), aparece alrededor de los 50 μ s y en ese momento todos los centros de reacción están abiertos (oxidados). La inflexión “J”, se desarrolla a los 2 ms (F_J) y está relacionada con la reducción parcial de la Q_A . La inflexión “I”, se desarrolla a los 20 ms (F_I) y está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B . La inflexión “P”, es el valor máximo de la fluorescencia (F_M), el tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental, sin embargo, en este momento todos los centros de reacción están cerrados (reducidos) (Strasser y Strasser, 1995).

Como se puede observar, conforme aumentó la concentración de níquel en el medio, el valor de la fluorescencia mínima (F_O) y la fluorescencia máxima (F_M) disminuyeron, en consecuencia se obtuvo que la fluorescencia variable (F_V), que es la diferencia entre $F_M - F_O$, también disminuyó (Figura 16).

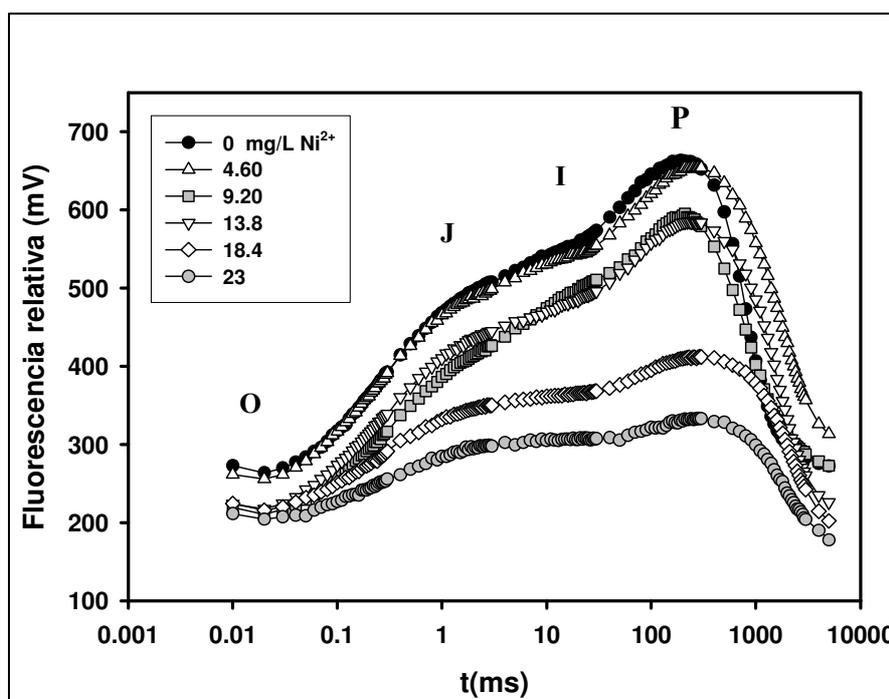


Figura 15. Efecto del Ni²⁺ sobre la cinética emisión de fluorescencia de la clorofila *a* de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 6 repeticiones.

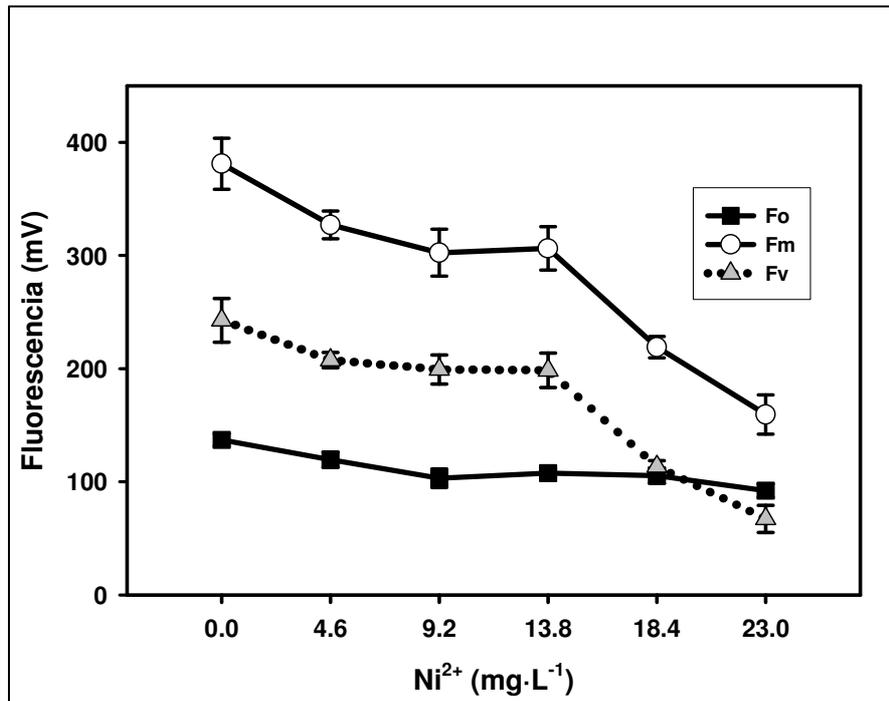


Figura 16. Efecto del Ni²⁺ sobre el valor de la fluorescencia mínima (F_O), la fluorescencia máxima (F_M) y la fluorescencia variable (F_V) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 6 repeticiones ± desviación estándar.

La disminución de el valor mínimo y máximo de fluorescencia indican que la exposición al metal afectó directamente el funcionamiento del centro de reacción y por lo tanto produjo una reducción de la eficiencia fotoquímica primaria del fotosistema II (F_V/F_M).

Con el propósito de visualizar el efecto del Ni²⁺ en cada inflexión de la cinética de la emisión de fluorescencia, los resultados fueron graficados (Fig. 16) como la fluorescencia relativa variable (V_t) a cualquier tiempo (F_t), según la siguiente ecuación $V_t = [(F_t - F_O) / (F_M - F_O)]$. Esta expresión experimental se toma como una medida de la fracción reducida del primer aceptor del fotosistema II, la quinona A (Q_A). En este sentido, el gráfico permite la comparación de muestras considerando sólo la acumulación dinámica de Q_A en su forma reducida Q_A⁻ (Haldimann y Strasser, 1999).

La figura 16 muestra que la reducción de Q_A fue afectada a las concentraciones más elevadas de Ni²⁺ (18.4 y 23.0 mg·L⁻¹), lo cual se puede apreciar por el incremento en la pendiente inicial de la cinética de fluorescencia denominada *Mo*, medida entre los tiempos de 50 y 300 μs (Figura 17)

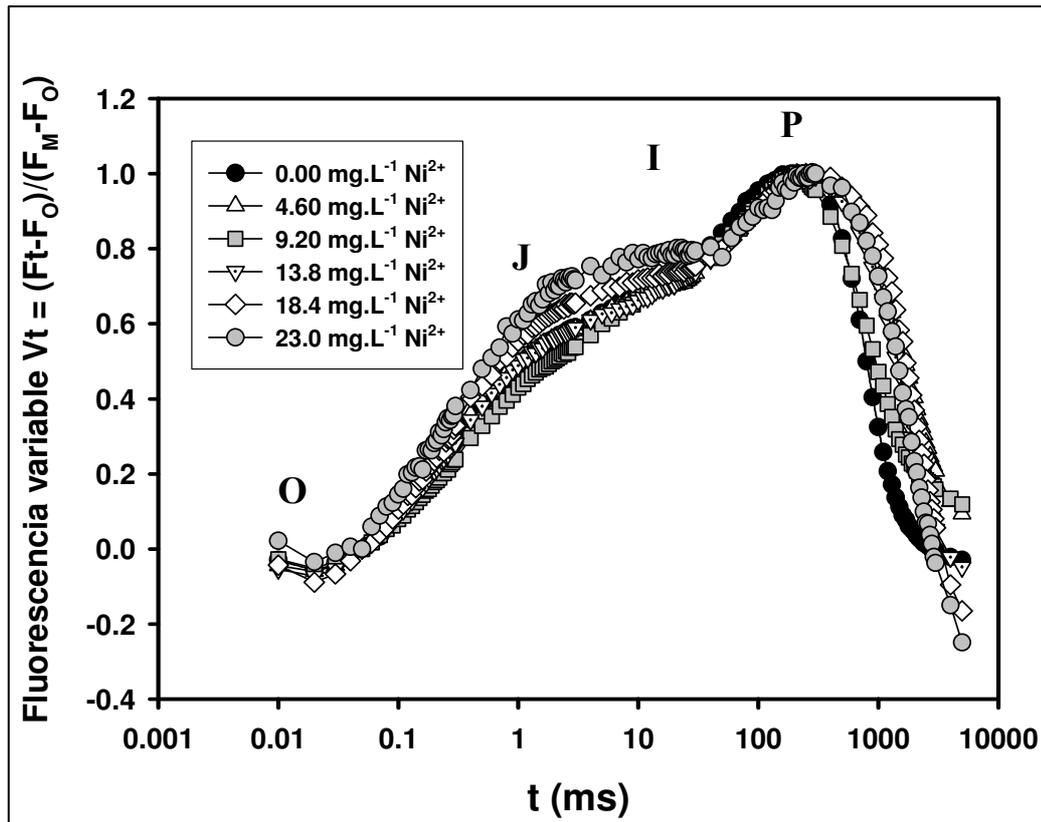


Figura 17. Efecto del Ni^{2+} sobre la fluorescencia variable (V_t) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 6 repeticiones.

M_o es la velocidad con la cual los centros de reacción se cierran o se reducen (Haldimann y Strasser, 1999). Lo anterior indica que los centros de reacción se cierran más rápido por efecto de la exposición a níquel. A las máximas concentraciones de Ni^{2+} utilizadas (18.4 y 23 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), el incremento de M_o fue de 10 y 67.4 % respectivamente con respecto al testigo (Figura 17).

Por otro lado, a estas concentraciones de níquel (18.4 y 23 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), el valor de la fluorescencia en la fase J (V_J) se modificó 14.85 y 23.3 % respectivamente con respecto al testigo, sin embargo, el valor de I (V_I) no se modifica a ninguna de las concentraciones de níquel probadas (Figura 17).

Tóth *et al.*, (2005), mencionan que el bloqueo del transporte electrónico entre Q_A y Q_B está asociado a un incremento del valor de M_o y el de la fluorescencia a nivel de la fase J (V_J). El valor de M_o también puede incrementarse por una inhibición de la separación de cargas a nivel del PSII, sin embargo, cuando es el caso, el valor de la fluorescencia en la fase J (V_J) no

se modifica. Lo anterior indica que a las concentraciones más elevadas de Ni^{2+} probadas (18.4 y $23.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) el efecto involucra ambos lados del PSII, el lado aceptor, es decir el movimiento de electrones después de Q_A y el lado donador, o lo que es la separación de cargas desde el complejo liberador de oxígeno (CLO) hasta el primer aceptor estable (Q_A) (Tóth *et al.*, 2005) (Figura 18).

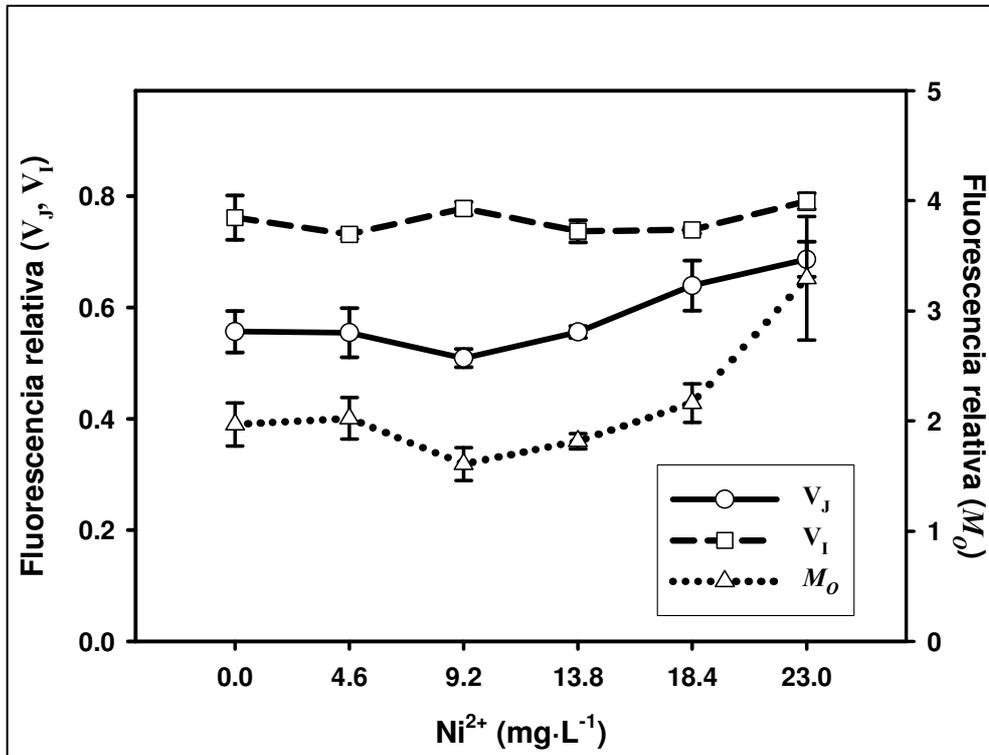


Figura 18. Efecto del Ni^{2+} sobre el valor de la fluorescencia en la fase J (V_j), la fluorescencia en la fase I (V_i) y la pendiente inicial de la fluorescencia variable entre los 50 y $300 \mu\text{s}$ (M_o) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de $6 \pm$ desviación estándar.

Los resultados anteriores, así como la interpretación de los mismos, se corroboraron a través del análisis de la prueba de OJIP (Strasser y Strasser, 1995), la cual plantea que se puede establecer el destino del flujo de energía luminosa atravesando el PSII como: Flujo absorbido (ABS), flujo atrapado (TRo), flujo utilizado para el transporte electrónico (ETo) y flujo disipado como calor (Dio) (Figura 19).

Los flujos de energía se pueden calcular en base a los centros de reacción (RC), los cuales se calculan considerando el inicio de la emisión de la fluorescencia en el tiempo cero, esto es, la pendiente inicial de la cinética de la fluorescencia (M_o) y el valor de la fluorescencia variable a los 2 ms (V_j). Cuando

estos flujos específicos son expresados no sólo considerando la velocidad inicial de la fluorescencia (M_0) y el valor de la fluorescencia variable, sino además los valores de la fluorescencia variable ($F_V = F_0 - F_M$) y máxima (F_M) de acuerdo con el modelo de flujo de energía (Strasser y Strasser, 1995; Force *et al.*, 2003; van Heerden *et al.*, 2003 y 2004), se obtienen los rendimientos cuánticos máximos para cada uno de los procesos, siendo estos: El producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕ_{Po}), la probabilidad de que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q_A^- (ψ_0), la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- (ϕ_{Eo}) y el producto máximo de disipación energética como calor (ϕ_{Dlo}) (Fig. 19).

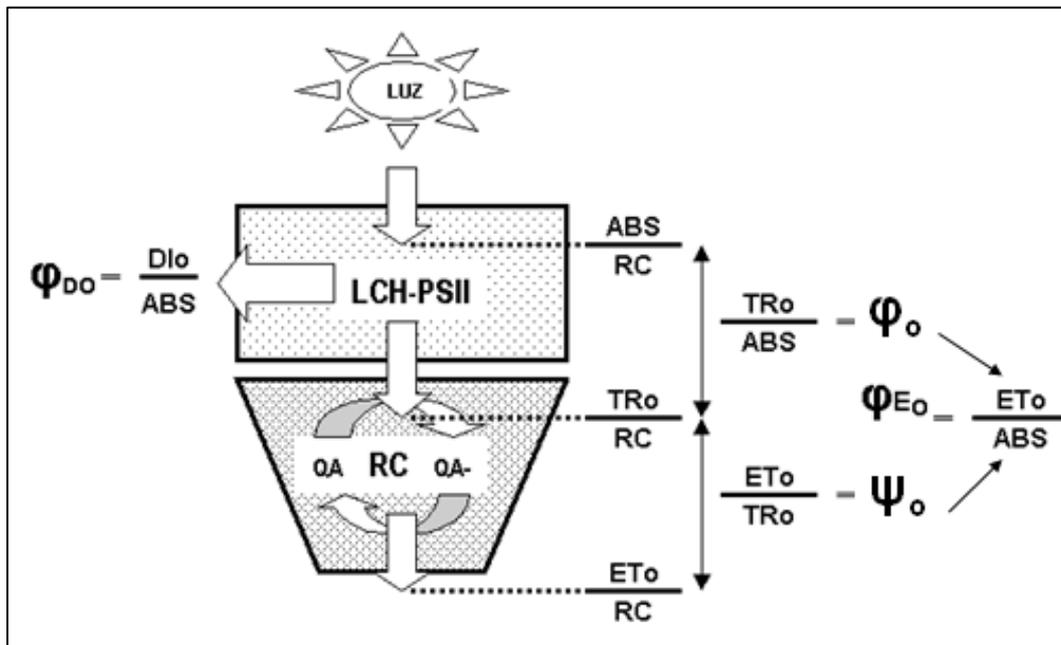


Figura 19. Modelo simplificado del flujo de energía a través del fotosistema II, según la prueba de OJIP (Strasser y Strasser, 1995).

La figura 20 muestra que con respecto al testigo, solamente las máximas concentraciones probadas de níquel (18.4 y $23.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) modificaron los flujos de energía en el PSII. A estas concentraciones, el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕ_{Po}) disminuyó 20.3 y 34.7% respectivamente con respecto a su testigo. La probabilidad de que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q_A^- (ψ_0) disminuyó 18.7 y 29.3% , y la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- (ϕ_{Eo}) disminuyó 38.10 y 62.16% respectivamente con respecto a su testigo.

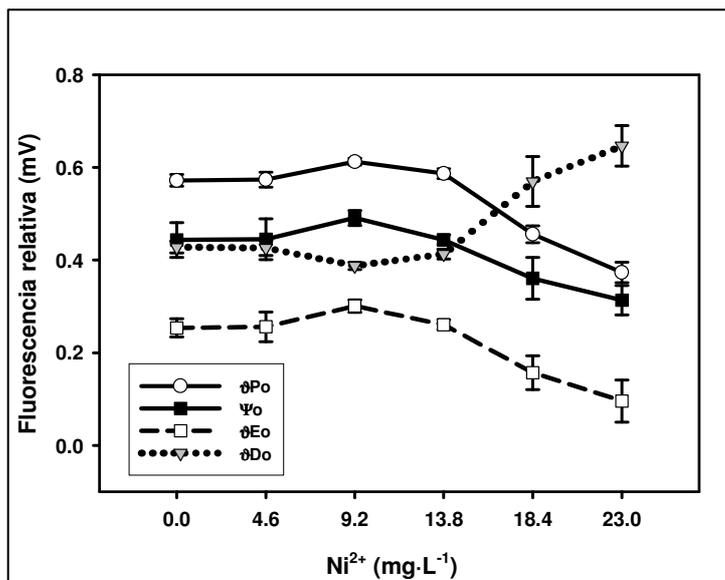


Figura 20. Efecto del Ni²⁺ sobre el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (ϕP_o); la probabilidad de que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q_A^- (ψ_o); la probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de Q_A^- (ϕE_o) y la disipación térmica en PSII (ϕD_o) de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 6 repeticiones \pm desviación estándar.

Los resultados anteriores corroboran lo descrito en las figuras 14 y 15, demostrando que a las máximas concentraciones de Ni²⁺ probadas (18.4 y 23.0 mg·L⁻¹), la inhibición del transporte electrónico a través del fotosistema II ($\phi E_o = \phi P_o \cdot \psi_o$), se debió a una inhibición tanto de las reacciones luminosas relacionadas con la separación de carga primaria en el PSII, representada por el valor de " ϕP_o ", y las reacciones "oscuras" no dependientes de luz, relacionadas con el transporte de electrones después de Q_A , representadas por ψ_o .

Por otro lado, en condiciones de inhibición parcial del proceso fotosintético primario (como el encontrado por efectos del Ni²⁺), y a fin de evitar una foto-oxidación, es necesario regular la energía de excitación que se captura por los complejos antena. Es decir, se debe balancear la cantidad de energía absorbida por los complejos antena con la cantidad de energía usada para el transporte electrónico, la síntesis de ATP-NADPH y la fijación CO₂, a fin de minimizar un daño potencial del PSII por un exceso de excitación no canalizado (Müller *et al.*, 2001). Uno de los mecanismos para liberar el exceso de energía es a través del proceso de disipación térmica, conocido como decaimiento o

disipación No-fotoquímica (NPQ por sus siglas en inglés). La Figura 20 muestra que la disipación térmica No-fotoquímica (Φ_{Dlo}) se incrementó 33.16 y 51.06 % solamente en las muestras tratadas a las máximas concentraciones de Ni^{2+} (18.4 y 23.0 $mg \cdot L^{-1}$) respectivamente, lo cual está inversamente correlacionado con el efecto del metal sobre el transporte electrónico en el PSII (Φ_{PSII}) (Fig 12).

3.3 Respiración

3.3.1 Consumo respiratorio de oxígeno

El efecto tóxico primario de los metales pesados es sobre las biomoléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos) al asociarse a éstas y modificar su estructura y función (van Assche y Clijsters, 1990). Altas concentraciones de níquel se han reportado que inhiben el proceso respiratorio (Lösch y Köhl, 1999). La Figura 21 muestra que de manera similar al efecto sobre el proceso fotosintético, solamente a las máximas concentraciones probadas de níquel (18.4 y 23.0 $mg \cdot L^{-1}$) afectan el proceso respiratorio, siendo la reducción de 32.17 y 45.73 % respectivamente.

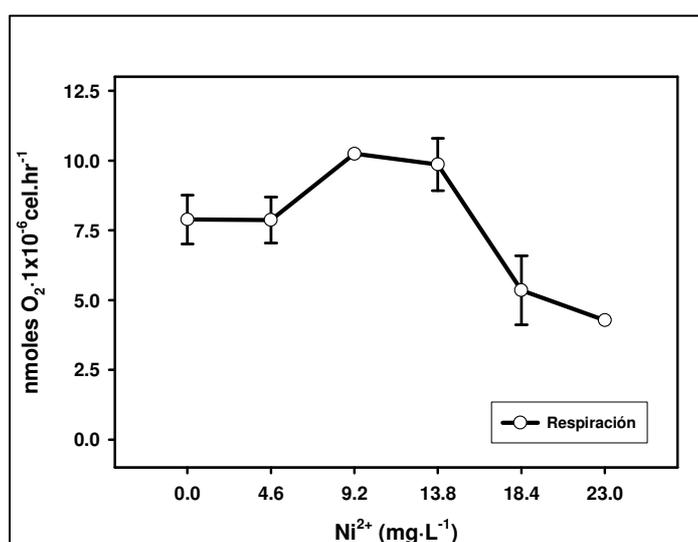


Figura 21. Efecto del Ni^{2+} en el consumo de oxígeno respiratorio de *Scenedesmus incrassatulus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

En la célula, la actividad mitocondrial y la cloroplástica, no suceden como procesos metabólicos separados, sino integrados como un todo, de tal forma que los efectos de cualquier condición que modifique la actividad de cualquiera de los organelos, tiene repercusiones en el otro (van Lis y Atteia,

2004). La actividad del proceso fotosintético es similar a la respiratoria cuando las células son expuestas a níquel por 48 h, lo que pudiera estar relacionado no sólo a una sensibilidad similar al metal por ambos procesos, sino también al efecto de la inhibición de la fotosíntesis sobre el proceso de respiración, ya que los cultivos fueron mantenidos en condiciones autotróficas, de tal forma que los sustratos que son oxidados en la mitocondria provienen exclusivamente de la actividad fotosintética (Perales-Vela *et al.*, 2007; Perales-Vela, 2008).

4. Acumulación celular de Ni²⁺

La figura 22 muestra la remoción de Ni²⁺ por gramo de biomasa seca en relación a la concentración del metal en el medio de cultivo. Como se puede observar, a medida que aumentó la concentración de níquel metal aumentó la cantidad de Ni²⁺ removido por gramo de biomasa seca de manera lineal ($r^2= 0.89$). Como se ha mencionado, la capacidad de las algas de remover metales pesados de la fase acuosa, es la suma de dos mecanismos: El primero, es un proceso fisicoquímico de adsorción del metal a la pared celular y el segundo es un proceso de absorción a través de la membrana plasmática de la célula. Los valores presentados en la figura 22 es la suma de ambos procesos, adsorción y absorción.

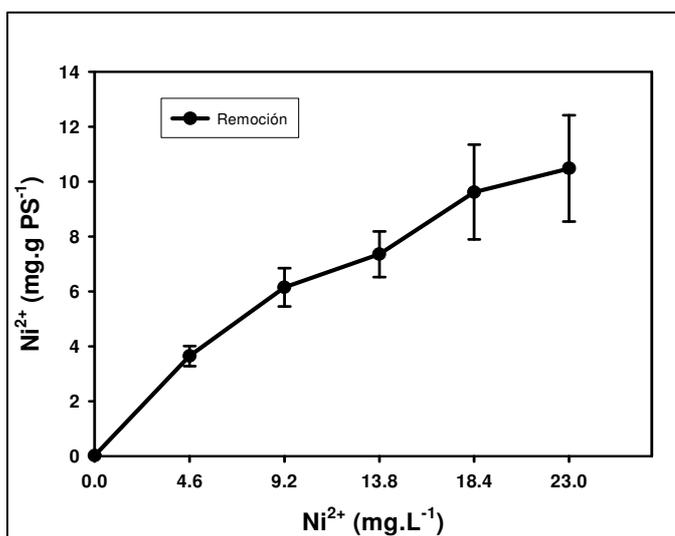


Figura 22. Relación entre la remoción celular de Ni²⁺ y la concentración Ni²⁺ en el medio de cultivo en *S. incrassatus* expuesto al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Aún cuando en la presente investigación no podemos distinguir la cantidad de metal adsorbida a la pared celular y la cantidad absorbida intracelularmente,

es evidente que el crecimiento medido como división celular (Figura 3 y 5) o acumulación de biomasa seca (Figura 4), fue afectado a partir de que se acumuló 3.64 ± 0.369 mg de Ni^{2+} por gramo de biomasa seca de células, sin embargo, el metabolismo fotosintético y respiratorio solamente fue afectado cuando la cantidad de níquel acumulado por gramo de biomasa seca fue superior a 7.35 ± 0.832 . Por otro lado, la división celular se detiene completamente cuando la cantidad de níquel acumulada por gramo de biomasa alcanza valores superiores a $8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PS (Figura 5).

En el caso de los pigmentos fotosintéticos, la acumulación de níquel no modifica el contenido de los mismos, sin embargo de manera inversa al crecimiento, el contenido de carotenoides totales se incrementó a partir de que se acumuló 3.64 ± 0.369 mg de Ni^{2+} por gramo de biomasa seca de células.

La figura 23 muestra que el porcentaje de remoción sigue un comportamiento similar a la acumulación del metal en la biomasa, fluctuando entre 60 a 89 % del total del metal agregado al medio de cultivo. Los resultados de las figuras 22 y 23 indican que el sistema alcanza una saturación aparente de alrededor de 10.5 ± 2 mg de Ni^{2+} por gramo de biomasa seca de células.

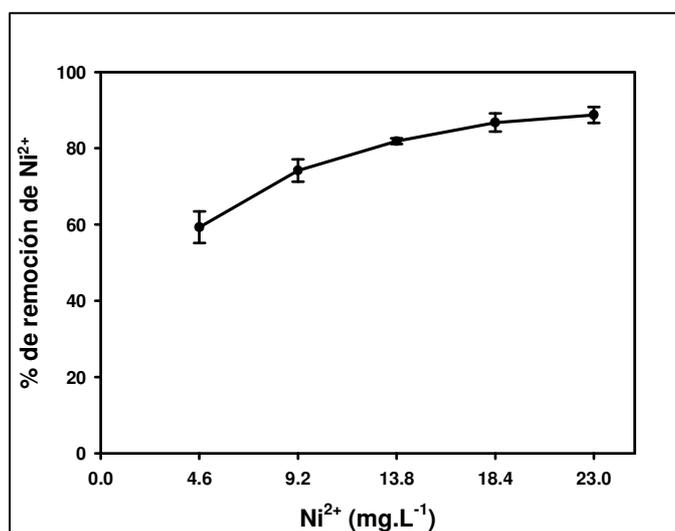


Figura 23. Relación entre la concentración de Ni^{2+} en el medio de cultivo y el porcentaje de Ni^{2+} removido del medio de cultivo. Cultivos de *S. incrassatus* fueron expuestos al metal durante 48 h. Cada punto representa la media de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

El factor de concentración (FC) es la relación de la concentración del metal removido en la biomasa y el metal en la solución acuosa, se define matemáticamente de la siguiente manera: $\text{FC} = (\text{mg metal removido} \cdot \text{Kg}^{-1} \text{ PS}) /$

(mg metal en solución·L¹). En la presente investigación, el factor de concentración encontrado a la máxima concentración de Ni²⁺ probada (23 mg·L¹) fue de 455 ± 84.

Aún cuando en la presente investigación no se reguló el pH (siendo el inicial de 6.5) y el tiempo de exposición fue de 48 h, los reportes en cuanto al pH óptimo y el tiempo de equilibrio son especie específicos (Romera *et al.*, 2006). Abu *et al.* (2004) trabajando con *Chlorella vulgaris* encontró que la óptima absorción se realiza a un pH 5 en 120 minutos. Wong *et al.*, (2000), observó la capacidad de bioabsorción de dos especies de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella miniata* (WW1) expuestas hasta 40 mg L⁻¹, encontrando que la máxima acumulación del metal se alcanza a las 24 h de exposición. Por otro lado, la capacidad de remoción de las algas varía también de acuerdo a la especie. Mehta y Gaur (2005) para el caso de níquel, reportan para el género *Secenedesmus* un intervalo entre 0.04 a 59 mg de Ni²⁺ por gramo de biomasa seca de células y para el género *Chlorella* 0.12 a 205 mg de Ni²⁺ por gramo de biomasa seca de células.

IX. CONCLUSIONES

El níquel a concentraciones ligeramente por encima de las fisiológicas resultó tóxico, para *Scenedesmus incrassatulus*.

Se encontró que conforme aumentó la concentración de níquel en el medio de cultivo, el número de células y la velocidad relativa de crecimiento disminuyeron. La concentración efectiva media necesaria para inhibir el 50% del crecimiento (CE_{50}) fue $5.189 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} , resultando en un aumento del tiempo de duplicación celular de 1.18 d^{-1} a 2.5 d^{-1} . Concentraciones superiores a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} en el medio de cultivo inhibieron completamente la división celular.

La inhibición del crecimiento por la exposición al metal estuvo directamente relacionada con el efecto en el metabolismo y la estructura celular. En comparación con las células testigo sin metal, la ultraestructura celular no se modificó sustancialmente aún a la máxima concentración de metal probado, sin embargo concentraciones superiores a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} indujeron la acumulación citoplasmática de depósitos de polifosfato. Por otro lado, a esta misma concentración de níquel en el medio de cultivo, se induce la formación de gránulos de almidón en el cloroplasto, lo cual concuerda con la disminución de la actividad fotosintética y respiratoria en la célula.

La actividad fotosintética medida como liberación de oxígeno o emisión de fluorescencia fue afectada a concentraciones superiores a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} , sin embargo, la concentración de clorofila *a* y *b* no se modificaron en ninguna de las concentraciones de metal probadas. El contenido de carotenoides totales aumentó hasta un 60% conforme se incrementó la concentración de níquel en el medio de cultivo.

El análisis del transporte electrónico *in vivo* (ΦPSII) por la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a*, mostró que el Ni^{2+} afectó ambos lados del fotosistema II (PSII), es decir, el lado aceptor, lo cual involucra el movimiento de electrones después de Q_A y el lado donador, lo cual abarca la separación de cargas desde el complejo liberador de oxígeno (CLO) hasta el primer aceptor estable (Q_A). Por otro lado, la disipación térmica No-fotoquímica (ϕDlo) de la energía de excitación, se incrementó conforme se redujo la actividad fotosintética por efecto del metal. Así mismo, el metabolismo respiratorio fue

afectado de manera similar al proceso fotosintético, es decir, solamente concentraciones superiores a $13.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ni^{2+} inhibieron el proceso metabólico celular. En condiciones autotróficas, como las utilizadas en la presente investigación, los sustratos oxidados en la respiración provienen de la actividad fotosintética, por lo que no se puede descartar que la disminución de la respiración sea un reflejo de la disminución de la actividad fotosintética.

La concentración de níquel acumulada en la biomasa algal aumentó conforme se incrementó la concentración del metal en el medio de cultivo. La máxima remoción de metal fue de $10.5 \pm 2 \text{ mg}$ de Ni^{2+} por gramo de biomasa seca de células, siendo el factor de concentración ($\text{mg metal removido Kg}^{-1}\text{PS}/(\text{mg metal en solución}\cdot\text{L}^{-1})$) de 455 ± 84 .

Los diferentes procesos fisiológicos medidos en esta investigación fueron afectados de manera diferencial conforme aumentó la cantidad de Ni^{2+} en la célula. El crecimiento fue más sensible que la actividad metabólica (fotosíntesis y respiración), sin embargo el contenido de pigmentos no fue modificado por la exposición al metal. Lo anterior, implica que cada proceso celular presenta una concentración crítica de níquel a la cual es afectado.

Por lo anterior, de acuerdo a los resultados de la presente investigación, la concentración de níquel permitida en las aguas residuales liberadas al medio ambiente según la Norma Oficial Mexicana (NOM-CCA-031-ECOL/1993), podría afectar severamente el crecimiento de organismos fotosintéticos acuáticos.

X. Apéndice

1. Parámetros cinéticos de la prueba OJIP (van Hereden *et al.*, 2004)

Parámetros Técnicos		
Fluorescencia a 50 μ s	F_0	
Florescencia máxima	F_M	
Fluorescencia variable	F_V	$=F_M - F_0$
Pendiente desde el origen de la Fluorescencia	M_0	$=(F_{300 \mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$
Fluorescencia Variable a 2 ms	V_j	$=(F_{2 \text{ ms}} - F_0)/(F_M - F_0)$
Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)		
Absorción por RC	ABS/RC	$=(M_0/V_j)/(1 - F_0/F_M)$
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	TR_0/RC	$=M_0/V_j = (ABS/RC)\phi P_0$
Disipación a tiempo 0 por RC	Dl_0/RC	$=(ABS/RC) - (TR_0/RC)$
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	ET_0/RC	$=(TR_0/RC)\psi^0$
Productos (o relaciones de flujo)		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	ϕP_0	$=TR_0/ABS = (F_M - F_0)/F_M$
Producto cuántico máximo de disminución de excitación no fotoquímica	ϕD_0	$=Dl_0/ABS = 1 - \phi P_0 = F_0/F_M$
Producto cuántico máximo para que un excitón atrapado mueva un electrón después de Q_A	Ψ_0	$ET_0/TR_0 = 1 - V_j$
Producto cuántico máximo para el transporta de electrones en PSII	ϕE_0	$= \phi P_0 \cdot \Psi_0$ $=(TR_0/ABS)/(ET_0/TR_0) = ET_0/ABS = (1 - F_0/F_M)(1 - V_j)$

2. Estadísticos

Cuadro 1. Promedio del crecimiento por número de células y por biomasa de cultivos de *Scenedesmus incrassatulus* tratados con diferentes concentraciones de Níquel. Valores promedio de 6 repeticiones.

Tratamiento (Ni mg·L ⁻¹)	Crecimiento (1 X 10 células · ml ⁻¹)	Biomasa (g · L ⁻¹)
0	17.9167 a	0.71333 a
4.6	10.1167 b	0.51333 b
9.2	8.1833 c	0.40667 c
13.8	6.8033 d	0.3600 c
18.4	5.5000 e	0.23333 d
23	5.2167 e	0.22667 d
DMS	1.0502	0.0941
CV	6.677486	8.393177

Medias con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: diferencia mínima significativa.

CV: Coeficiente de Variación.

Cuadro 2. Concentración promedio de pigmentos en cultivos de *Scenedesmus incrassatulus* tratados con diferentes concentraciones de Níquel. Valores promedio de 4 repeticiones.

Tratamiento (Ni mg·L ⁻¹)	Clorofila a (mg·1 X 10 ⁶ células)	Clorofila b (mg·1 X 10 ⁶ células)	Carotenoides (mg·1 X 10 ⁶ células)
0	0.091158 b	0.021078 c	0.032824 c
4.6	0.097227 b	0.024551 b, c	0.040501 b
9.2	0.096553 b	0.024679 b. c	0.042467 b
13.8	0.105695 a, b	0.026630 b	0.049702 a
18.4	0.108012 a, b	0.028841 a, b	0.053682 a
23	0.131853 a	0.032930 a	0.055247 a
DMS	0.0283	0.005	0.0067
CV	9.834786	6.859119	5.147286

Medias con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: diferencia mínima significativa.

CV: Coeficiente de Variación.

Cuadro 3. Promedio de la actividad metabólica en cultivos de *Scenedesmus incrassatulus* tratados con diferentes concentraciones de Níquel. Valores promedio de 4 repeticiones

Tratamiento	Fotosíntesis	Respiración
(Ni mg·L ⁻¹)	(nmoles O ₂ 1X10 ⁶ cél·hr ⁻¹)	(nmoles O ₂ 1X10 ⁶ cél·hr ⁻¹)
0	12.7048 b	7.4152 c
4.6	14.6580 b, a	7.8489 b, c
9.2	16.2192 a	10.2438 a
13.8	15.9592 a	9.8413 a, b
18.4	11.5288 b	5.2946 d
23	5.3488 c	4.2791 d
DMS	3.1441	0.1333
CV	10.57949	6.0064

Medias con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DMS: diferencia mínima significativa.

CV: Coeficiente de Variación.

X. Bibliografía

- Avilés, C., Loza-Tavera, H., Ferry, N., Moreno-Sánchez, R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 180: 1-10.
- Abu, Al-Rub, F. A., El-Naas, M., H., Benyahia, F., Ashour, I. (2004). Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cell. Process. Biochem. 39: 1767-1773.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. (2006). Algae, anatomy, biochemistry and biotechnology. Taylor & Francis Group. Florida, US.
- Boisvert, S., Joly, D., Leclerc, S., Govindachary, S., Harnois, J., Carpentier, R. (2007). Inhibition of oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. Biometals. 20: 879-889.
- Bold, H., Alexopolus, C., Delevoryas, T. (1980). Morphology of plants and fungi. 4ta. ed. Harper & Row. New York.
- Campbell, P. M., Semith, G. D. (1986). Transport and accumulation of nickel ions in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. Arch. Biochem. Biophys. 244: 470.
- Cañizares-Villanueva, R.O. (2000^a). Empleo de cultivos de *Chlorella vulgaris* para eliminación del cadmio presente en aguas residuales y evaluación de la interacción cadmio-zinc en este proceso. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.
- Cañizares-Villanueva, R.O. (2000^b). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42: 131-143.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E., Abalde, J. (1995). Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. Aquat. Toxicol. 37: 165-174.
- Cortinas de Nava, C. (2000) Tóxicos ambientales y salud pública en México. The National Law Center for Inter-America free trade. www.natlaw.com/pubs/spmxen9.htm.
- Choudhury, N.K., Behera, R.K. (2001). Photoinhibition of photosynthesis: role of carotenoids in photoprotection of chloroplasts. Photosynthetica 39: 481-488.
- Crist, R. H., Oberholser, K., Shank, N., Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and alga cell walls. Environ. Sci. Technol. 15: 1212-1217.
- Davis, T. A., Volesky, B., Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. Water Res. 37: 4311-4330.
- Darnall, D.W., Greene, B., Hosea, M., McPherson, R.A., Henzl, M., Alexander, M.D. (1986) Recovery of heavy metals by immobilized algae. En: Trace metal removal from aqueous solution. Thompson, R. (eds) Whitstable Litho, Ltd. London. 1-24p.
- Darley, W.M. (1991). Biología de las algas: enfoque fisiológico. Editorial Limusa. México. 11-28p.

- Devars, S., Sánchez-Moreno, R. (1999). Abundancia de los metales pesados en la biosfera. En Contaminación ambiental por metales pesados: Impacto en los seres vivos. Cervantes, C., Moreno-Sánchez R. (eds) AGT Editor, S.A. México.
- Devi, R.S., Prasad, M.N.V., (1999). Membrana lipid alteration in heavy metal exposed plants. En: Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Prasad, M.N.V., y Hagemeyer, J. (eds) Springer, New York. 99-138p.
- Díaz-Aguilar, I., Larqué, S.M.U., Alcántar, G.G., Vázquez, A.A., González, C. F.V., Carrillo, G.R. (2001). Acumulaciones tóxicas de Níquel en el crecimiento y la nutrición de Trigo. Rev. Int. Contam. Ambient. 19: 199-209.
- Dzhambazov, B., Belkinova, D., Mladenov, R., (2003). Karyotypic análisis of two alga especies *Scenedesmus incrassatulus* Bohl. and *Scenedesmus antennatus* Breb. (Chlorophyta, Chlorococcales). Hereditas 139: 35-40.
- Eccles Harry (1999) Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? Trends Biotech. 17:462-467.
- Edwar, R. (1989). Phycology 2. Cambridge University Press. New York. 271-281p.
- El-Sheekh, M.M. (1993). Inhibition of photosystem II in the green alga *Scenedesmus obliquus* by nickel. Biochem. Physiol. Pflanzen. 188: 363-372.
- Encarta® 2007. Algas (2006). Microsoft Corporation.
- Fargašová, A. (1999). Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu^+ , $\text{Cu}^{2+}\text{Mn}^{2+}$, Mo^{6+} , Ni^{2+} , V^{5+}) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Chemosphere. 38: 1165-1173.
- Fargašová, A. (2001). Interactive effect of manganese, molybdenum, nickel, copper I and II and vanadium on the freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67: 688-695.
- Feng, L., Ping, W., Xiang, Z., Tao, L., Zhaoyang, L., Huakuan, L., Dongzhao, G., Congyi, Z., y Chengtai, W., (2004). Nickle(II) and cobalto (II) complexes of hydroxyl-substituted trizamacrocyclic ligand as potencial antitumor agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14: 1901-1904.
- Fiedor, J., Fiedor, L., Haeßner, R., Scheer, H. (2005). Cyclic endoperoxides of β -carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. Biochimica et Biophysica Acta. 1709: 1-4.
- Flores M. M., (1999). Estudio del género *Scenedesmus* Mayes 1892 en algunos cuerpos de agua del altiplano Mexicano y su posible uso como indicador de calidad del agua. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Force, L., Critchley, C., van Rensen, J.J.S., (2003). New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. Photosynth. Res. 78: 17-33.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E-L., y Zenk, M. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. Archi. Microbiol. 150: 197-2002.

- Haldimann, P., Strasser, R.J. (1999). Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise kinetic in pea (*Pisum sativum* L.). *Photosynth. Res.* 62: 67-83.
- Hall, J. L., (2000). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.
- Heuillet, E., Moreau, A., Halaren, S., Jeanne, N., Puisieux-Dao, S., (1986). Cadmium binding to a thiol molecule in vacuoles of *Dunaliella tertiolecta* contaminated with CdCl₂: electron probe microanalysis. *Bio. Cell.* 58: 79-86.
- INEGI, Banco de Información Económica. www.inegi.gob.
- Jin, X., Nalewajko, C., Kushner, D. J., (1996). Comparative Study of Nickel Toxicity to Growth and Photosynthesis in Nickel-Resistant and Sensitive Strains of *Scenedesmus acutus f. alternans* (Chlorophyceae). *Microb. Ecol.* 31: 103-114.
- Jin, X. (1998). Nickel toxicity and mechanisms of nickel resistance in *Scenedesmus acutus f. alternans*. Tesis de Doctorado. University of Toronto. Department of Botany.
- Kasprzak, K. S., Sunderman, F. W., Salnikow, K. (2003). Nickel Carcinogenesis. *Mutation Research*, 533: 67-97.
- Krämer, U., Smith, R. D., Wenzel, W.W., Raskin, I., Salt, D. E. (1997). The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Hálácsy. *Plant Physiol.* 115: 1641-1650.
- Kratochvil, D., Volesky B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends Biotech.* 16: 291-300.
- López, E., (2003). Sin tratamiento 78 por ciento de aguas residuales en México. Departamento de Información, Orientación y Documentación. Fundación Vamos México. www.cvs.mexico.org.mx/htmls/not_mar-28-03_3.html.
- Lösch, R., Köhl, K.I. (1999). Plant respiration under the influence of heavy metals. En *Heavy metals stress in plants: from molecules to ecosystems*. Prasad M., N., N.V., y Hagemeyer, J. (eds) Springer. Berlin.
- Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (2000). *Environmental Microbiology*. Academic Press, USA.
- Mallick, N., Mohn, F.H. (2003). Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 22: 64-69.
- Manankina, E. E., Mel'nikov, S. S., Budakova, E. A., Shalygo N. V. (2003). Effect of Ni²⁺ on Early stages of Chlorophyll biosynthesis and pheophytinization in *Euglena gracilis*. *J. Plant Physiol.* 50: 390-394.
- Marshchner, H. (1986). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. E.U.A. 673p.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., (2000). Chlorophyll fluorescence: A practical guide. *J. Exp. Bot.* 345: 659- 668.
- Mehta, S. K., Gaur, J. P. (2005). Use of Algae for Removing Heavy Metal ions From Wasterwater: Progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25: 113-152.
- Mendoza-Cózatl, D.G., Moreno-Sánchez, R. (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim. Bioph. Acta* 1706: 88-97.

- Mimuro, M., Akimoto, S., (2003). Carotenoids of light harvesting systems: Energy transfer processes from fucoxanthin and peridinin to chlorophyll. En *Photosynthesis in Algae*. Larkum, A.W., Douglas, S.E., y Raven, J.A. (eds) Kluwer Academic Press. The Netherlands. 95-131p.
- Molas, J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. *Environ. Exp. Bot.* 47: 115-126.
- Müller, P., Li, Xiao-Ping, Niyogi, K., K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.
- Mulrooney, B.S., Hausinger, P.R., (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 239-261.
- Nalewajko, C., y Olaveson, M., (1994). Differential responses of growth, photosynthesis, respiration, and phosphate uptake to copper in copper-tolerant and copper-intolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Canadian J. Bot.* 73: 1295-1303.
- Nilshammar, M., Walles, B. (1974). Electron microscope studies on cell differentiation in synchronized cultures of the green alga *Scenedesmus*. *Protoplasma.* 79: 317-332.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., Tominaga, N. (2003). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophyla* (Chlorophyta) induced by heavy metal ion polyphosphate metabolites. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 253-259.
- Nriagu, J. O., Pacyna M. J., (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature.* 33: 134-139.
- OECD. (1984). Guideline for testing of Chemicals 'Alga and Growth Inhibition Test'.
- Ortega, M. (1984). Catalogo de algas continentales recientes de México. Instituto de Biología. UNAM. México.
- Osman, E.H.M., El-Naggar, H.A., El-Sheekh, M.M., El-Mazally, E.E. (2004). Differential effects of Co^{+2} and Ni^{+2} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. *Environ. Toxicol. Phar.* 16: 169-178.
- Padua, M., Aubert, S., Casimiro, A., Bligny, R., Block, M.A. (2003). Effects of a sub-lethal copper exposure on non-green *Acer pseudoplatanus* cell lipids. *Plant Physiol. Bioch.* 41: 471-477.
- Pawlik-Skowronska, B. y Skowronski, T. (2001). Freshwater Algae. En *Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity*. Ed. M.N.V. Prasad. Marcel Dekker, Inc. USA. 59-94p.
- Paez, O. F. (1996). Fuentes de metales en la zona costera marina. En *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y tendencias*. Botello, A.V, Rojas, G., J., L., Benitez, J.A., Zárate, L.D. (eds.) Universidad Autónoma de Campeche, EPOMEX, Campeche, México. 297-308p.

- Peña-Castro, J. (2002). Interacción de los metales pesados Cd, Cu y Cr con la microalga *Scenedesmus incrassatulus*: importancia biológica y evaluación de su capacidad de remoción. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Zacatenco, departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64: 1-10.
- Perales-Vela, H.V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C., Cañizares-Villanueva, R.O. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) *Chemosphere*. 67: 2274–2281.
- Perales-Vela, H.V., (2008). Caracterización fotosintética y respiratoria de *Scenedesmus incrassatulus* durante la biorremoción de Cu^{+2} Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Zacatenco, departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39: 1008-1018.
- Rai, L.C., Gaur, P.J. Kumar, D.H. (1981). Phycology and heavy-metal. *Biological Review. Camb. Philos. Soc.* 56: 99-151.
- Ranndhawa, V. K., Zhou, F., Nalewajko, C. y Kushner, J. (2001). Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus* f. *alternans*. *Can. J. Microbiol.* 47: 987-993.
- Reed, R.H., Gadd, G.M. (1990). Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. En, *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. Ed. Shaw J., CRC. Florida USA.
- Romera, E., González, F., Ballester, A., Blázquez, M. L., Muñoz, J.A. (2006). Biosorption with Algae: A Statistical Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26: 223-235.
- Robison, P.K. (1997). Immobilized alga technology for wastewater treatment purpose. En *Wastewater with algae*. Wong, Y.S., y Tam, N.F.Y. (eds) Springer-Verlag. New York. 37-53p.
- Rodríguez, M. D. (1991). Serie Vigilancia [10] Níquel. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Metepec, Estado de México.
- Ros, R., Cooke, D. T., Burden, R. S., James, C. S. (1990). Effect of the herbicide MCPA, and the heavy metals, cadmium and nickel, on the lipid composition, Mg-ATPase activity and fluidity of plasma membranes from rice, *Oryza sativa* cv. Bahia Shoots. *J. Exp. Bot.* 41: 457-462.
- Ros, R., Morales, A., Segura, J., Picazo, I. (1992). In Vivo and In Vitro effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots. *Plant Sci.* 83: 1-6.

- Round, F. (1981). The ecology of the algae. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 653p.
- Salisbury, B. F., Ross, W. C. (1994). Fisiología Vegetal. Iberoamericana., México D.F. 759p.
- Salwa, A. S., Sabah A. B., (1980). Growth response of *Scenedesmus* to different concentrations of copper, cadmium, nickel, zinc and lead. Environmental International 4: 431-434.
- Sandoval de Ecurrida J.M., (2000). Compendio sobre el agua: Un análisis temático para la introducción al quehacer legislativo. Política Social: Servicio de Investigación y Análisis. LVIII Legislatura. H. Cámara de Diputados México.
<http://www.cddhcu.gob.mx/bibliot/publica/inveyana/polisoc.htm>.
- Seregin, V.I., Kozhevnikova, D.A. (2006). Physiological Role of nickel and its toxic effects on higher plants. Russ. J. Plant Physiol+. 53: 257-277.
- Spencer, F.D., Nichols, H.L. (1983). Free Nickel growth of two species of green algae. Environ. Pollut. 31: 97-104.
- Strasser, J.B., Strasser, R.J. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. En Photosynthesis: from light to biosphere. Mathis P. (eds) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 977-980p.
- Strasser, B.J., (1997). Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. Photosynth. Res. 52: 147-155.
- Takguchi, H., (2003). Ven mala calidad de agua en México. Departamento de Información, Orientación y Documentación. Fundación Vamos México. www.cvs.mexico.org.mx/htmls/not_mar-28-03_3.html.
- Tam, N. F. Y., Wong, J. P. K., Wong, Y. S. (2001). Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and *WW1* for cyclic nickel biosorption. Environ. Pollut. 114: 85-92.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (1998). Plant Physiology. 2 ed. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U. S. A. 792p.
- Tóth, S.Z., Schansker, G., Strasser, R.J. (2005). In intact leaves, the maximum fluorescence level (F_m) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study. Biochimica et Biophysica Acta. 1708: 275-282.
- Trainor, F.R., (1978). Introductory phycology, John Wiley & Sons. New York. 525p.
- Trainor, F.R., (1998). Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)-phenotypic plasticity. J.Cramer. Berlin.
- van Assche, F., Clijsters, H., (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ. 13: 195-206.
- van Heerden, P.D.R., Tsimilli-Michael, M., Krüger, G.H.J., Strasser, R.J. (2003). Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. Physiol. Plantarum. 117: 476-491.
- van Heerden, P.D.R., Strasser, R.J., Krüger, G.H.J. (2004). Reduction of dark chilling stress in N₂-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. Physiol. Plantarum 121: 239-249.
- van Lis, R., Atteia, A. (2004). Control of mitochondrial function via photosynthetic redox signals. Photosynth. Res. 79: 133-148.

- van den Hoek (1995). *Algae: an Introduction to Phycology*. Cambridge University Press New York. 370-371p.
- Vega, O.J.M. (2006). *Caracterización Fisiológica de *Scenedesmus incrassatulus* durante la síntesis de pigmentos*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Weir, T. E., Stocking, G.R., Barbour, M.C. (1991). *Botánica*. Editorial Limusa. 455-492p.
- Wellburn, A. (1994). The spectral determination of chlorophylls, a and b, as well as total carotenoids, using, vary solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiology*. 144: 307-313.
- Wong, P.K. and Chang, L., (1991). Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll-*a* synthesis of *Chlorella pyrenoidosa* 251. *Environ Pol.* 72: 127-139.
- Wong, J. P. K., Wong, Y. S. and Tam N. F. Y. (2000). Nickel biosorption by tow *Chlorella* species, *C. vulgaris* (a commercial species) and *C. miniata* (a local isolate). *Bioresource Technol.* 73: 133-137.
- Zornoza, P., Robles, S., y Martin, N. (1999). Alleviation of nickel toxicity by ammonium supply to sunflower plants. *Plant and Soil*. 208: 221-226.