

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia



Tesis de Doctora en Biología

**Matas microbianas como agente de  
remediación: eficiencia, mecanismos de  
remoción de metales y efectos en la  
comunidad microfitobentónica**

Natalia Gabriela Morales Pontet

Bahía Blanca

Argentina

2024

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO) perteneciente al Centro Científico Tecnológico Bahía Blanca, dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 5 de noviembre del 2019 y el 9 de abril del 2024, bajo la dirección de la Dra. Sandra Botté y la co-dirección de la Dra. Carolina Fernández.

Lic. Natalia Gabriela Morales Pontet



### **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el 27/06/2024, mereciendo la calificación de 10 (diez sobresaliente).

## AGRADECIMIENTOS

A Sandra Botté y Carolina Fernández por dirigir mi tesis, por brindarme sus conocimientos, por guiarme estos cinco años de la beca doctoral y ayudarme en la toma de decisiones como así también en las numerosas actividades que implica el trabajo de investigación. Cabe destacar el buen trato recibido por ambas, siempre con sus respetuosas y cálidas palabras.

Al personal del IADO por su ayuda, en especial a Ariadna, Analía, Román por su buena predisposición y ayuda en campañas de muestreo y/o trabajo de laboratorio.

A los profesores de los cursos de posgrado realizados por compartir sus conocimientos y en muchos casos permitir análisis de mis muestras e incluso sugerir recomendaciones para el desarrollo de mis investigaciones.

A FUNDASUR, al CERZOS, INIBIBB, y al departamento BByF por permitirme el uso de instalaciones y equipamientos para el procesamiento de muestras y acondicionamiento del material.

Al Laboratorio de Análisis Químicos (LANAQUI), al departamento de Física, al departamento de Geología, a PLAPIQUI y al CCT por el trabajo realizado en analizar muestras con equipamiento específico.

A los becarios del IADO por las charlas y momentos compartidos, especialmente a mis amigas que estuvieron desde el primer día de ingreso a la beca doctoral Ana, Anto y Grethel. Un agradecimiento muy especial a Ana Forero por su gran ayuda con sus conocimientos de química y caracterización de materiales, lo cual fue un complemento valioso para aumentar la calidad de esta tesis y ampliar mi área de conocimientos interdisciplinarios.

A todos mis amigos por los momentos de distracción y alegría, en especial a Angi y Romi que siempre me escucharon y aconsejaron con todo su cariño.

A mi mamá Delia y a mi papá Ricardo que, aunque me acompañaron a la distancia siempre se interesaron, me escucharon y con una gran sonrisa festejaron mis logros y avances en mi carrera profesional, y quiero decirles que sin su apoyo no podría haber llegado hasta donde estoy hoy en día.

A mis hermanos Leandro y Luciano por escucharme, brindarme sus consejos y estar siempre presentes.

Un agradecimiento especial para mi amor Argenis por el acompañamiento, apoyo y motivación dada durante todos estos años de mi formación profesional. Por escucharme cada día, por los numerosos desayunos que me preparaste para afrontar con mucha energía el gran trabajo que implica realizar una tesis, y por todo el amor que formamos junto a nuestras queridas michis Ayumi y Abbi.



*A Arge, mis padres y hermanos*

*“Mira profundamente en la naturaleza y entonces comprenderás todo mejor.”*

*Albert Einstein*

## RESUMEN

La contaminación por metales en los sistemas acuáticos representa un riesgo inminente para todos los organismos vivos. Por ello, el desarrollo de tecnologías de remediación ambiental y tratamiento de efluentes es de vital importancia en la actualidad. En esta tesis se plantea como objetivo general evaluar a las matas microbianas de ambientes estuariales como potencial alternativa para la remoción de metales de soluciones acuosas mediante ensayos de laboratorio, estableciendo las condiciones fisicoquímicas óptimas para una mayor eficiencia del proceso y una menor alteración de la comunidad microfítobentónica. Cinco experimentos fueron realizados en cámaras de cultivo en laboratorio, en los que se evaluó la capacidad de remoción de cromo, plomo y zinc por matas microbianas del estuario de Bahía Blanca. Se realizaron determinaciones de la concentración de metales, análisis de la comunidad microfítobentónica y se aplicaron diversas técnicas de caracterización de materiales. Se concluyó que las matas microbianas remueven el Cr(III) y Pb rápidamente del agua de mar y con altos porcentajes de eficiencia cuando se las inunda con efecto marea por aproximadamente 5 días. Sin embargo, tanto para el Cr(VI) como para el Zn no se observó en el mismo tiempo evaluado una eliminación eficiente por parte de las matas microbianas. La eficiencia de remoción de Cr(VI) fue mejorada al mantener las soluciones a pH 2 y al aumentar el tiempo de inundación de las matas microbianas. Los procesos superficiales tuvieron un rol principal en la inmovilización de los metales evaluados en las matas microbianas. La presente tesis muestra resultados alentadores en la remoción de metales de soluciones acuosas, como así también brinda una interpretación de lo que ocurre con los metales que llegan al estuario.

## ABSTRACT

Metal contamination in aquatic systems represents an imminent risk to all living organisms. Therefore, the development of environmental remediation technologies and effluent treatment is currently of vital importance. This thesis aims to evaluate microbial mats from estuarine environments as a potential alternative for removing metals from aqueous solutions through laboratory assays, establishing the optimal physicochemical conditions for greater process efficiency and minimal alteration of the microphytobenthic community. Five experiments were conducted in laboratory culture chambers, assessing the capacity of microbial mats from the Bahía Blanca estuary to remove chromium, lead, and zinc. Determinations of metal concentrations, analyses of the microphytobenthic community were carried out, and various material characterization techniques were applied. It was concluded that microbial mats quickly remove Cr(III) and Pb from seawater with high efficiency when flooded with tidal effect for approximately 5 days. However, for both Cr(VI) and Zn, efficient removal by microbial mats was not observed at the same time evaluated. The removal efficiency of Cr(VI) improved when the solutions were maintained at pH 2 and the flooding time of the microbial mats was increased. Surface processes played a key role in the immobilization of the evaluated metals within the microbial mats. This thesis presents promising results for the removal of metals from aqueous solutions and provides an interpretation of the fate of metals reaching the estuary.

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.**

**Dra. Sandra Elizabeth Botté y Dra. Carolina Fernández**

Título y nombre y apellido de las/os directoras/es

## PUBLICACIONES

Parte de la información obtenida en el marco de la tesis ha sido publicada en revistas internacionales o comunicadas en reuniones científicas nacionales.

### PUBLICACIONES EN REVISTAS:

- ★ **Morales Pontet, N.G.**, Fernández, C., Perillo, V.L., La Colla, N.S., Serra, A.V., Botté, S.E., 2023. Preliminary assessment of microbial mats in seawater metal remediation. *Environ. Monit. and Assess.*, 195 (4), 516. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11134-8>.
- ★ **Morales Pontet, N.G.**, Fernández, C., Botté, S.E., 2024. Novel method of removing metals from estuarine water using whole microbial mats. *BioMetals*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00578-7>.
- ★ **Morales Pontet, N.G.**, Fernández, C., Botté, S.E., 2024. Chromium removal by microbial mats: understanding the effect of salinity and pH. *Environ. Monit. and Assess.* (Aceptado para su publicación).

### PRESENTACIONES EN CONGRESOS:

- ★ **Morales Pontet N.G.**, Fernández C., Botté S.E. 2023. Comunidad microfitobentónica en áreas de alto impacto ambiental en el estuario de Bahía Blanca. XXXIX Jornadas Argentinas de Botánica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 58, 197. Expositora (póster).
- ★ **Morales Pontet N.G.**, Fernández C., Botté S.E. 2023. Composición elemental de las matas microbianas y el rol de sus diferentes componentes en la

remoción de Cr(III). XXXIX Jornadas Argentinas de Botánica. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 58, 197. Expositora (póster).

- ★ **Morales Pontet N.G.**, Fernández C., Botté S.E. 2022. Concentración de Arsénico, Cromo y Zinc en biofilms bajo fuerte impacto antrópico en un estuario del sur bonaerense. XI Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos (EMEAP), Argentina, Bahía Blanca, p 487. Expositora (oral).
- ★ **Morales Pontet N.G.**, Fernández C., Botté S.E. 2022. Remoción de cromo del agua de mar y consecuencias sobre la comunidad microfitobentónica: efectos de la aireación. XI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar y XIX Coloquio de Oceanografía, Argentina, Comodoro Rivadavia, p 249. Expositora (póster).
- ★ **Morales Pontet N.G.**, Fernández C., Botté S.E. 2022. Biorremediación de cromo a diferentes concentraciones mediante matas microbianas del estuario de Bahía Blanca. VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC, Argentina, Mar del Plata, p 184. Expositora (póster).
- ★ **Morales Pontet N.G.**, Fernández C., Botté S.E. 2021. Tolerancia al cromo en la comunidad microfitobentónica del estuario de Bahía Blanca. XXXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 56, 158. Expositora (póster).

## ÍNDICE

PREFACIO .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT.....	vii
PUBLICACIONES .....	ix
ÍNDICE .....	xi
ABREVIACIONES .....	xv
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.    SISTEMAS COSTEROS, UNO DE LOS SITIOS CON MAYOR IMPACTO ANTRÓPICO .....	1
1.2.    UNA PROBLEMÁTICA MUNDIAL: ACUMULACIÓN DE METALES EN EL AMBIENTE .....	4
1.3.    BÚSQUEDA DE TECNOLOGÍAS PARA REMOCIÓN DE METALES.....	8
1.4.    DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	13
1.4.1.    Fuentes de contaminación antropogénicas en el estuario de Bahía Blanca.....	16
1.4.2.    Contaminación del estuario por metales .....	17
1.5.    HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO 2 .....	21
METODOLOGÍA GENERAL .....	21
2.1.    ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL .....	21
2.2.    DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS .....	22
2.3.    MÉTODO PARA LA FILTRACIÓN DE AGUA DE MAR .....	23
2.4.    RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS DE MATAS MICROBIANAS .....	23
2.5.    METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE VARIABLES GEOQUÍMICAS .....	25
2.5.1.    Determinación de la concentración de metales con ICP OES .....	25
2.5.2.    Determinación de Cr(VI) por método colorimétrico.....	26
2.5.3.    Determinación del contenido de MO.....	27
2.5.4.    Análisis granulométrico de las matas microbianas .....	28
2.5.5.    Difracción de rayos X (DRX).....	29
2.5.6.    Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de análisis de dispersión de rayos X (EDS) .....	29
2.5.7.    Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) .....	30
2.5.8.    Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) .....	31
2.6.    METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA VARIABLES BIOLÓGICAS.....	32

2.6.1.	Determinaciones de la concentración de clorofila <i>a</i> y feopigmentos .....	32
2.6.2.	Análisis cualitativo de la comunidad microfitobentónica .....	33
2.6.3.	Análisis cuantitativo de la comunidad microfitobentónica .....	36
2.6.4.	Determinación de la concentración de carbohidratos coloidales y capsulares.....	37
2.6.5	Recuento y caracterización de bacterias heterótrofas aerobias y cultivables presentes en las matas microbianas.....	40
2.6.5.1.	<i>Preparación del medio de cultivo</i> .....	40
2.6.5.2.	<i>Recuento de bacterias heterótrofas en placa</i> .....	41
2.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO GENERALES.....	43
CAPÍTULO 3 .....		45
CARACTERIZACIÓN DE LAS MATAS MICROBIANAS DE PUERTO CUATREROS.....		45
3.1.	INTRODUCCIÓN .....	45
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
3.3.1.	Composición biológica .....	49
3.3.2.	Composición mineral por granulometría y DRX.....	55
3.3.3.	Grupos funcionales presentes en las matas microbianas de Puerto Cuatrerros .....	57
3.3.4.	Composición elemental por SEM-EDS.....	60
3.3.5.	Especiación química superficial por XPS .....	63
CAPÍTULO 4 .....		70
REMOCIÓN DE Cr(III).....		70
4.1.	INTRODUCCIÓN .....	70
4.2.	ENSAYO DE REMOCIÓN DE Cr(III) CON Y SIN AIREACIÓN.....	74
4.2.1.	Materiales y métodos .....	74
4.2.2.	Resultados y discusión .....	78
4.3.	ENSAYO DE REMOCIÓN DE Cr(III) A DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	86
4.3.1.	Materiales y métodos .....	87
4.3.2.	Resultados y discusión .....	91
CAPÍTULO 5 .....		109
REMOCIÓN DE Cr(VI) BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y SALINIDAD.....		109
5.1.	INTRODUCCIÓN .....	109
5.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	112
5.2.1.	Preparación de soluciones de Cr(VI) .....	112
5.2.2.	Diseño experimental .....	113
5.2.3.	Análisis estadísticos.....	115
5.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	116
5.3.1.	Eliminación de Cr(VI) a diferentes salinidades y pH.....	116



5.3.2.	Parámetros fisicoquímicos .....	121
5.3.3.	Efectos de los tratamientos sobre la comunidad microfitobentónica y la materia orgánica.....	124
CAPÍTULO 6	.....	128
REMOCIÓN DE Cr(VI) USANDO BIOCHAR Y MATAS MICROBIANAS MODIFICADAS	.....	128
6.1.	INTRODUCCIÓN .....	128
6.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	130
6.2.1	Preparación de soluciones y diseño experimental.....	130
6.2.2.	Análisis estadísticos.....	132
6.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	133
6.3.1.	Remoción de Cr .....	133
6.3.2.	Parámetros fisicoquímicos: pH, Eh y salinidad.....	137
6.3.3.	Evaluación de la comunidad microfitobentónica.....	138
6.3.4.	Identificación de grupos funcionales mediante ATR-FTIR .....	150
6.3.5.	Identificación de minerales cristalinos por DRX.....	153
6.3.6.	El rol de los componentes de las matas microbianas en la remoción de Cr(VI) .....	155
CAPÍTULO 7	.....	158
REMOCIÓN DE Cr(VI) EN PRESENCIA DE Zn Y Pb	.....	158
7.1.	INTRODUCCIÓN .....	158
7.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	160
7.2.1.	Preparación de soluciones.....	160
7.2.2.	Diseño experimental .....	161
7.2.3.	Análisis estadísticos.....	163
7.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	164
7.3.1.	Remoción de Cr, Pb y Zn por las matas microbianas .....	164
7.3.2.	Parámetros fisicoquímicos .....	169
7.3.3	Mecanismos de remoción de Cr, Zn y Pb en matas microbianas.....	170
7.3.4.	Efectos del Cr, Pb y Zn sobre la comunidad microfitobentónica y las bacterias heterótrofas .....	176
CAPÍTULO 8	.....	185
DISCUSIÓN GENERAL Y CONSIDERACIONES FINALES	.....	185
8.1.	EFICIENCIA Y MECANISMOS DE REMOCIÓN DE METALES POR MATAS MICROBIANAS...	185
8.2.	EFFECTOS DEL Cr Y OTROS METALES SOBRE LA COMUNIDAD MICROFITOBENTÓNICA: MECANISMOS CELULARES PARA LA DETOXIFICACIÓN .....	192
8.3.	¿PUEDEN LAS MATAS MICROBIANAS CONVERTIRSE EN UNA HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA PARA LA REMOCIÓN DE METALES? .....	197
8.4.	CONCLUSIÓN .....	201

BIBLIOGRAFÍA..... 204

## ABREVIACIONES

**ATR-FTIR:** espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada

**DFC:** 1,5-difenilcarbazida

**DRX:** difracción de rayos X

**EDS:** espectroscopía de análisis de dispersión de rayos X

**Eh:** potencial redox

**EPS:** sustancias poliméricas extracelulares (siglas en inglés).

**ICP OES:** espectrometría de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente

**MO:** materia orgánica

**MT:** metalotioneínas

**SEM:** microscopía electrónica de barrido

**TSA:** Agar Triptona Soja

**XPS:** espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. SISTEMAS COSTEROS, UNO DE LOS SITIOS CON MAYOR IMPACTO ANTRÓPICO

Los **sistemas costeros** de todo el mundo han recibido a lo largo del tiempo diferentes aportes de contaminantes procedentes de diversas fuentes tanto puntuales como difusas. Entre ellos, los más afectados son las zonas semicerradas como los **estuarios**. Las principales **fuentes de contaminación** en estos ambientes abarcan las descargas de aguas residuales provenientes de numerosas industrias, puertos y ciudades. Asimismo, se incluye la disposición de desechos sólidos urbanos, los residuos generados por la agricultura y ganadería, transportados tanto por escorrentía como a través de tributarios. Además, se suman las actividades que contribuyen a la destrucción de la costa y los hábitats costeros, tales como el dragado, la pesca de arrastre, el turismo y actividades recreativas sin una adecuada gestión, entre otras (Grecco et al., 2011; Perillo et al., 2001; Souza et al., 2021; Wysocka y Vassileva, 2016). Esta problemática se encuentra agravada por la falta de una planificación acorde en el uso de los recursos y en el tratamiento y disposición final de los desechos, y por una sobreproducción de basura concomitante (Martínez et al., 2007). El **deterioro del hábitat** costero puede tener consecuencias a mediano y largo plazo, no solo para los organismos que desarrollan su ciclo de vida en los estuarios, sino también para las numerosas familias dedicadas a la pesca artesanal y para los consumidores de peces y crustáceos (Pérez et al., 2017).

Las **planicies intermareales** estuarinas se encuentran entre los ecosistemas más productivos de la Tierra y desempeñan un papel fundamental en la estructuración de la red alimentaria de las zonas costeras (Ribeiro et al., 2021). Gran parte de la elevada

productividad de las planicies de marea se debe a las **comunidades microfitobentónicas**, las cuales están compuestas por una mezcla de diferentes taxones que pueden formar estructuras biogénicas conspicuas y pueden dar lugar a la formación de biofilms o estructuras más complejas llamadas matas microbianas. Ambas estructuras en los ecosistemas marinos costeros se desarrollan en los sedimentos intermareales, sub- y supra- mareales en la interfase con el agua (Croce et al., 2021; Juneau et al., 2015; Ribeiro et al., 2021).

Los **biofilms** están formados por una sola capa de microorganismos adheridos a una superficie biológica o no biológica (Hall-Stoodley et al., 2004; Sabater et al., 2007). En cambio, las **matas microbianas** son estructuras estratificadas verticalmente dominadas por cianobacterias y se consideran fases avanzadas de los biofilms (Cuadrado et al., 2011, Maisano, 2019). Estas matas representan ecosistemas bien desarrollados con ciclos casi cerrados de carbono, azufre y otros elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo biológico (Kühl et al., 2003).

Según Hall-Stoodley et al. (2004) y Noffke (2010) el **desarrollo del biofilm** se da en 5 etapas principales. Las **etapas uno y dos** generalmente se identifican por una asociación laxa o reversible de células procariotas con una superficie, seguida de una adhesión robusta e irreversible facilitada por una rápida producción de **sustancias poliméricas extracelulares (EPS, siglas en inglés)** (Hall-Stoodley et al., 2004). En áreas como las planicies de marea las cianobacterias se adhieren estrechamente a la arena y el limo, estableciendo capas cohesivas donde las partículas de sedimento se unen de manera firme y compacta entre sí (Gerdes et al., 2000). En experimentos de laboratorio, la segunda fase puede durar tan solo 15 minutos y se ha observado que en ella comienza la comunicación intercelular entre células mediante enzimas (Noffke, 2010). Si el ambiente es rico en nutrientes es posible que se desarrollen las

**etapas tres y cuatro**, las cuales implican la agregación de células en microcolonias y el posterior crecimiento y maduración. Los procariotas reorganizan sus posiciones, dejando espacio para la construcción de **canales**. Estos canales limpian el biofilm, transportan nutrientes y eliminan los desechos. Los procariotas recién llegados utilizan los canales para migrar por el biofilm. La comunidad microbiana está compuesta por miembros fisiológicamente integrados de modo que muchos microbios se organizan para formar **capas metabólicamente acopladas** para la desintegración de los nutrientes. Esta capacidad es un requisito previo para la funcionalidad de la mata microbiana multicapa (Noffke, 2010).

La **etapa cinco** implica la **dispersión de células microbianas** debido al desprendimiento causado por perturbaciones **externas**, como la fuerza del agua, los procesos sedimentarios y las interacciones biológicas, o por procesos **internos**, como la degradación enzimática endógena, liberación de EPS o proteínas de unión a la superficie (Hall-Stoodley et al., 2004; Stoodley et al., 2002). Los procesos físicos que permiten el crecimiento del biofilm y el desarrollo de las matas microbianas son: la sedimentación, la erosión y la ruptura de capas superficiales como resultado de la desecación. Luego de que la capa superficial es cubierta por sedimentación, los microorganismos migran hacia la superficie y generan una nueva capa de biomasa. Este ciclo se repite durante sucesivos eventos de entierro, dejando láminas ricas en materia orgánica (MO) compuesta por biomasa muerta. La repetición de estos eventos es lo que da como resultado la secuencia de **biolaminación** característica de las matas microbianas (Gerdes et al., 2000).

## 1.2. UNA PROBLEMÁTICA MUNDIAL: ACUMULACIÓN DE METALES EN EL AMBIENTE

El aumento de la industrialización y urbanización sin el acompañamiento de una adecuada planificación en el tratamiento de efluentes y desechos ha llevado al aumento de la concentración de **metales** en el **medio marino**, deteriorando los ecosistemas oceánicos y exponiendo a riesgos a todos los seres vivos (Souza et al., 2021; Wysocka y Vassileva, 2016). La mayoría de los elementos, excepto aquellos producidos por el hombre, como muchos de los actínidos, existen en el ambiente de manera natural. Su incremento en los distintos compartimentos del ambiente (atmósfera, agua, suelo) puede deberse tanto a **procesos naturales** (erupciones volcánicas, geisers, meteorización) como también a **actividades humanas** (agrícolas, ganaderas, mineras, metalúrgicas, tecnológicas, textiles, el uso de combustibles fósiles, entre otros) (Bradl, 2005; Maher et al., 2013; Planer-Friedrich et al., 2020). Cuando se describe el origen de los metales que ingresan a un cuerpo de agua se habla de **fuentes puntuales** o **difusas**, la primera se refiere a una contaminación localizada donde los contaminantes vienen de una fuente identificable, y en la segunda las fuentes son dispersas y difíciles de identificar (Butu, 2013).

Hoy en día los metales son imprescindibles para la humanidad, son usados en aleaciones o revestimiento de superficies, en la preservación de la madera, en la fabricación del vidrio, pinturas, asfalto, cemento, medicinas, cosméticos, en la producción de agroquímicos y en las industrias electrónicas, mineras y de pieles (García-Sánchez, 2021; Souza et al., 2021). También existe una gran cantidad de metales en las carreteras y estacionamientos. Por ejemplo, algunos de estos metales son generados principalmente por factores como fugas de combustible y lubricantes, oxidación de vehículos, desgaste de neumáticos y en las emisiones de los sistemas

de escape de los vehículos (Silva-Juarez et al., 2021). Estos contaminantes llegan a los cuerpos de agua por medio de la escorrentía superficial y subterránea, la deposición atmosférica (seca y húmeda) y/o la descarga directa de efluentes urbanos e industriales (Pérez, 2017).

Los metales generan principal interés y preocupación debido a su imposibilidad de biodegradarse, a su capacidad de bioacumularse en los tejidos vivos al adsorberse/absorberse, y a su potencial **biomagnificación** en la cadena trófica, pudiendo afectar a los organismos de niveles tróficos altos, incluidos los humanos (Bashir et al., 2019; La Colla et al., 2021; Negi et al., 2023). Entre otras propiedades, tienen una gran afinidad por los grupos tiólicos (-SH) presentes en las enzimas y en aminoácidos como la cisteína, pudiendo inhibir sus funciones y por ende alterar mecanismos celulares esenciales (Pérez Rama, 2005; Remelli et al., 2016). Asimismo, generan un impacto negativo sobre la fisiología de ciertos organismos como microalgas, peces y mamíferos marinos, ya que generan efectos citotóxicos y genotóxicos comprometiendo la viabilidad celular y la estructura de las membranas (Mena Bolaños, 2019; Ni et al., 2020; Wise et al., 2008). Tanto los metales como los metaloides pueden interactuar con el ADN y las proteínas, causando estrés oxidativo a través de la formación de radicales libres (Negi et al., 2023). Son capaces de inducir carcinogénesis, teratogénesis y mutagénesis (Jang et al., 2016; Pernía et al., 2018).

Los metales y metaloides de mayor preocupación debido a su abundancia y/o toxicidad son el cromo (Cr), plomo (Pb), zinc (Zn), mercurio (Hg), cobre (Cu), níquel, cadmio (Cd) y arsénico (As) (Fu y Wang, 2011). Los metales se clasifican en **esenciales** y **no esenciales**. Los primeros son necesarios para que determinadas vías metabólicas en los organismos funcionen correctamente, pero pueden ser fisiológicamente tóxicos por encima de un determinado umbral. Entre ellos se



encuentran el Cu, Fe (hierro), Mn (manganeso), Zn y Ni. Los no esenciales, como Cd, Pb, Hg, Al (aluminio) y As, son aquellos que hasta el momento se desconoce que cumplan algún rol esencial y son tóxicos aún a bajas concentraciones (Ali y Khan, 2018; Botté et al., 2013; Raychaudhuri et al., 2021).

La **toxicidad** de un metal para los organismos vivos depende de **variables** como su concentración, estado de oxidación, tiempo de exposición, así como del grupo taxonómico y estado fisiológico del organismo. Por ejemplo, el Zn y el Cu, considerados importantes para las funciones celulares y fisiológicas de los organismos vivos, pueden volverse tóxicos en concentraciones superiores a las necesarias. En microalgas, han generado alteraciones en la división celular, la actividad enzimática, la fotosíntesis, el metabolismo de nutrientes, la reproducción y malformaciones celulares (Cantonati et al., 2014; Negi et al., 2023; Sathicq y Gomez, 2018). En mamíferos, entre ellos el hombre, pueden provocar calambres, vómitos, alteraciones endocrinas e incluso la muerte (Fu y Wang, 2011; Jang et al., 2016). Por otro lado, el As, el Pb y el Hg son altamente tóxicos incluso a bajas concentraciones para la mayoría de los seres vivos, ocasionando un deterioro y disminución de cloroplastos, malformaciones, muerte celular, y reducción de la biomasa en algas (Negi et al., 2023; Oliveira de Souza et al., 2022), así como daños en el sistema nervioso central y en los riñones de los animales (Fu y Wang, 2011; Jang et al., 2016).

De interés global resulta el estudio de la concentración y toxicidad del **Cr**, siendo de particular importancia en los ambientes acuáticos tales como las zonas costeras marinas. Este elemento puede existir en el ambiente en diferentes formas químicas que van desde el **estado de oxidación** 0 al VI. Sin embargo, en el medio acuático existe principalmente como trivalente [Cr(III)] y hexavalente [Cr(VI)] (Unceta et al., 2010). Las formas de Cr(II), Cr(IV) y Cr(V), son generalmente productos inestables

durante los procesos de oxidación y reducción del Cr(III) y Cr(VI) (Shahid et al., 2017). Existen diferencias en las propiedades químicas entre las formas de Cr trivalente y hexavalente, las cuales están relacionadas con la estabilidad, movilidad y biodisponibilidad de estas especies en el ambiente (Unceta et al., 2010).

Antiguamente el Cr se encontraba dentro de la clasificación de metales no esenciales. En la actualidad, se considera al **Cr(III)** un micronutriente esencial para mamíferos debido a que interviene en el metabolismo del azúcar, los lípidos y las proteínas (Berry et al., 2004; Ni et al., 2020). Sin embargo, también se lo ha asociado a efectos tóxicos como eczema, daños en el ADN, trastornos esqueléticos y neurológicos en animales, e inhibiciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pang et al., 2023; Unceta et al., 2010). Con respecto al **Cr(VI)**, altamente soluble, hay un fuerte consenso de que presenta una elevada toxicidad, no sólo para la salud humana sino también para todos los componentes bióticos del ambiente (Ni et al., 2020). En el hombre como posible consumidor final de recursos marinos pueden presentar problemas hematológicos, y gastrointestinales tras su exposición al Cr(VI) (Bhunja et al., 2022). En peces y mamíferos marinos genera estrés oxidativo, inflamación, alteraciones en numerosos procesos metabólicos, muerte celular y desarrollo de células cancerosas (Ni et al., 2020). En este contexto los ecosistemas marinos toman un valor significativo frente a la contaminación por Cr.

En los últimos años, el **Cr** ha sido uno de los metales que ha mostrado  **aumentos** considerables de su **concentración** en los ecosistemas acuáticos en el mundo, como consecuencia del incremento de industrias que lo utilizan como materia prima, por ejemplo, la galvanoplastia, metalúrgicas, curtiembres de cuero, y del uso de fertilizantes comerciales con Cr en sus formulaciones (Bonnand et al., 2013; Krüger et al., 2017; Mohapatra et al., 2017; Ni et al., 2020; Pradhan et al., 2017). Existen

casos extremos de contaminación por Cr como la zona industrial de Hazaribagh en Bangladesh, por la presencia de 150 curtiembres, las cuales afectan canales naturales, lagunas y ríos con desembocadura en el Golfo de Bengala, al noreste del océano Índico (Khan et al., 2020). Como ejemplo en Argentina, tenemos la cuenca del río Matanza-Riachuelo, donde en los años 1968-1990 una planta industrial química que producía bicromatos, ácido crómico, ácido sulfúrico y productos de curtiembre depositó en pilas sin revestimiento residuos que contenían sales de Cr(VI). La disolución de estas sales residuales promovió la migración de Cr(VI) hacia las aguas subterráneas para consumo humano, alcanzando hoy en día concentraciones de hasta 5 mg de Cr(VI)/L (Ceballos et al., 2020).

### 1.3. BÚSQUEDA DE TECNOLOGÍAS PARA REMOCIÓN DE METALES

El rápido crecimiento demográfico, la expansión urbana sin planificación, la fuerte industrialización y la utilización inadecuada de los recursos naturales han llevado a una destrucción sin precedentes de la calidad del agua, el aire y el suelo a nivel global (Bashir et al., 2019), dando como resultado una contaminación ambiental persistente, caracterizada por la presencia de metales, metaloides, radionúclidos y diversos contaminantes orgánicos (Fomina y Gadd, 2014). Al conjunto de acciones específicas llevadas a cabo para eliminar o reducir los contaminantes en un ambiente afectado se le llama **remediación** (Guerra et al., 2018; Lima et al., 2016). Las tecnologías y procesos utilizados para la limpieza de sitios contaminados, tanto con sustancias orgánicas como inorgánicas, pueden realizarse *in situ* o *ex situ*, utilizando enfoques biológicos, físicos y/o químicos (Guerra et al., 2018; Khalid et al., 2017). A pesar de los desafíos que implica remediar un ambiente contaminado con metales, existen numerosas técnicas extensamente estudiadas destinadas a la recuperación de suelos, sedimentos y soluciones acuosas (Tabla 1.1) (Bhunja et al., 2022; Fu y Wang,

2011; Khalid et al., 2017; Madhavi et al., 2013; Sandoval, 2006). Estas técnicas se centran en la aplicación de estrategias específicas para mitigar los impactos negativos de la contaminación sobre los humanos y el medio, y así restaurar la salud ambiental en áreas afectadas (Rosén et al., 2015).

Entre las técnicas de **remediación de suelos y sedimentos**, las de sustitución o aislación del suelo, además de tener una baja aceptabilidad pública debido a su naturaleza destructiva, suelen requerir una gran cantidad de mano de obra y recursos materiales. La excavación suele ser el método que se aplica cuando hay que retirar o eliminar grandes cantidades de suelo. La inmovilización y el lavado del suelo son técnicas rentables debido a que la cantidad de productos químicos necesarios es muy reducida y las dosis aplicadas de extractantes químicos o agentes inmovilizadores, como el EDTA, son comparativamente bajas (Khalid et al., 2016). Cabe aclarar que la mayoría de las técnicas de remediación son difíciles de aplicar en suelos con mucho contenido arcilloso debido a la fuerte unión de los metales a las partículas de arcilla, por ello la técnica más recomendada para este tipo de suelos es la oxidación/reducción química (Khalid et al., 2016).

Para la **remoción de metales en soluciones acuosas** tradicionalmente se ha empleado la precipitación química debido a su sencillez y eficiencia en efluentes con alta concentración de metales. Sin embargo, es ineficaz cuando la concentración del metal es baja y puede producir gran cantidad de lodos difíciles de tratar (Bashir et al., 2019).

Tabla 1.1. Tecnologías de remediación de metales en suelos/sedimentos y agua/efluentes. (Fuentes mencionadas en el texto).

Medio	Métodos	Procesos involucrados
<b>Suelo/sedimento</b>	Sustitución del suelo	Excavar el suelo contaminado y sustituirlo por suelo no contaminado
	Aislación del suelo	Uso de barreras subterráneas para aislar el suelo contaminado
	Inmovilización	Aplicación de una sustancia inmovilizadora y la formación de complejos estables e inmóviles por adsorción
	Lavado de suelos	Adición de extractantes y formación de complejos estables y móviles
	Vitrificación	Formación de material vítreo a alta temperatura
	Electrocínética	Electroforesis o electromigración mediante la aplicación de tensión continua
	Reducción/ oxidación química	Adición de agentes reductores u oxidantes a suelos excavados
<b>Agua/efluentes</b>	Ultrafiltración	Adición de tensioactivos, se forman micelas que se unen a los iones metálicos y son retenidos en una membrana
	Nanofiltración	Uso de una membrana con carga superficial que repele a los pequeños iones cargados junto a los solutos y sales neutras más grandes
	Ósmosis inversa	Aplicación de una presión hidrostática mayor que la presión osmótica de la solución, los compuestos catiónicos se separan del agua
	Coagulación/floculación	Adición de coagulantes y agitación física para neutralizar las cargas eléctricas y agrupar las partículas formando flóculos
	Precipitación química	Adición de hidróxidos, sulfuros u otras sustancias que suben el pH del medio para hacer insolubles a los metales
	Carbón activado	Adsorción a la gran superficie específica que le confiere la estructura porosa del carbón
	Intercambio iónico	Iones de hidrógenos son intercambiados por cationes metálicos en resinas naturales o sintéticas
	Electrodialisis	Separación de iones a través de membranas cargadas utilizando un campo eléctrico como fuerza impulsora
<b>Suelo/sedimento y agua/efluente</b>	Biorremediación	Uso de plantas o microorganismos autóctonos y/o exógenos para contener, remover o neutralizar metales

Otros métodos convencionales, como la extracción con disolventes, filtración por membrana, intercambio iónico, eliminación electroquímica y la coagulación también tienen algunas desventajas, como la eliminación incompleta, requisitos de alta energía, baja eficiencia, condiciones operativas sensibles y eliminación costosa (Burakov et al., 2018). Para superar estos inconvenientes, se han propuesto muchos enfoques destinados a desarrollar métodos más baratos y eficientes para mejorar la calidad de los efluentes tratados. La mayoría de ellos se basan en el uso de procesos de **sorción**, por ser más rentables y fáciles de operar (Burakov et al., 2018).

El término sorción comprende dos procesos: **adsorción** y **absorción**. El primero es un fenómeno en el que un contaminante soluble en agua se adhiere a una superficie a través de un enlace químico (en ese caso el proceso se denomina quimisorción) o por fuerzas físicas (en ese caso el proceso se denomina fisorción) (Aksu y Balibek, 2007; Bashir et al., 2019; Biswal y Balasubramanian, 2023). El segundo consiste en que un contaminante difunde o se incorpora a un líquido o sólido (Bashir et al., 2019; Fomina y Gadd, 2014). Cuando en el proceso de sorción se utiliza biomasa viva o muerta se lo llama **biosorción** (Sandoval, 2006). Se han llevado a cabo numerosas investigaciones con diferentes biosorbentes como bacterias, hongos, algas, plantas, subproductos de industrias de fermentación o residuos agrícolas como la cascarilla de arroz, cáscara de naranja y el salvado de trigo (Burakov et al., 2018; Fu y Wang, 2011; Tejada Tovar et al., 2015). En este sentido, la biosorción ha demostrado ser muy prometedora para la eliminación de metales de las aguas residuales (Fu y Wang, 2011).

La **biorremediación** incluye el uso de microorganismos, plantas (caso particular denominado fitorremediación), o sus derivados para estabilizar, remover o volatilizar sustancias orgánicas e inorgánicas (Aksu y Balibek, 2007; Magro et al., 2012).

Además de la biosorción, la biorremediación puede incluir otros procesos como la transformación enzimática de los compuestos a sustancias menos tóxicas o no tóxicas (Thatoi et al., 2014). Es rentable, no-invasiva, ofrece una solución permanente y tiene una muy alta aceptabilidad pública porque causan la mínima alteración del lugar (Bhunja et al., 2022; Khalid et al., 2016).

Muchas **algas** (*Chlorella*, *Cyclotella*, *Scenedesmus*, *Cladophora*) y **cianobacterias** (*Lyngbya*, *Synechocystis*, *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Anabaena*) pueden secuestrar metales por adsorción superficial a componentes de la pared celular que actúan como ligandos, consiguiendo así concentrar el metal en un pequeño volumen (Arunakumara et al., 2007; Kumar et al. 2015; Subashchandrabose et al., 2011). Mientras que sólo algunas especies también pueden acumular ciertos metales en compartimentos intracelulares. Por ejemplo, las cianobacterias *Synechocystis elongates*; *Plectonema boryanum*; *Anabaena* sp. *Spirulina* sp., *Nostoc* sp. y otros microorganismos y microalgas, como *Escherichia coli*; *Ochrobactrum anthropi*, *Stichococcus bacillaris* Nägeli, pueden acumular metales en cuerpos de polifosfato conservados principalmente en vacuolas intracelulares conocidas como acidocalcisomas o unir metales a proteínas, péptidos y otros polímeros secretados en el citoplasma (Cui et al., 2021; Kalita y Baruah, 2023; Singh et al., 2011; Villagrasa et al., 2020, 2021). Las metalotioneínas son pequeñas proteínas ricas en cisteína y podrían unirse a metales a través del grupo tiol de sus aminoácidos cisteína (Cui et al., 2021). Las vacuolas, el cloroplasto y las mitocondrias son orgánulos que también pueden encontrarse involucrados en el secuestro de metales (Kalita y Baruah, 2023).

Por otra parte, existen microorganismos capaces de transformar los contaminantes en sustancias menos tóxicas, como es el caso de algunas cianobacterias y bacterias que pueden reducir Cr(VI) a Cr(III) (por ejemplo, *Phormidium* sp., *Oscillatoria* sp.

*Pseudomonas* sp., *Synechocystis* sp.) y As(V) a As(III) (por ejemplo, *Crocospaera watsonii*; *Shewanella*, *Chrysiogenes arsenatis*, *Desulfitobacterium hafniense*) (Cui et al., 2021; Gorny et al., 2016; Jang et al., 2016; Ma et al., 2019; Rhine et al., 2005; Shukla et al., 2012). Entre los microorganismos utilizados en biorremediación, las microalgas han sido ampliamente utilizadas en la biosorción de metales tóxicos debido a su abundancia y riqueza, tanto en aguas naturales como residuales (Kumar et al., 2015; Magro et al., 2012; Subashchandrabose et al., 2011).

La gran mayoría de las investigaciones sobre remoción de metales de soluciones acuosas se han centrado en microalgas o bacterias aisladas (Chakraborty et al., 2016; Jagiello et al., 2006; Shukla et al., 2012; Villagrasa et al., 2020, 2021). No obstante, no hay estudios donde se empleen matas microbianas completas, tal y como se las encuentra en la naturaleza, en la remoción de metales. La gran diversidad de especies y funciones metabólicas encontradas en las matas microbianas, junto con su papel crucial en los procesos de biomineralización y en la degradación/absorción de diversos contaminantes (Gadd, 2010; Serra et al., 2017), constituye una fuente de motivación para considerarlas potenciales agentes para la eliminación de metales de soluciones acuosas.

#### **1.4. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO**

El estuario de Bahía Blanca, ubicado en el sur de la Provincia de Buenos Aires, Argentina (38°73'S; 62°35'O), es el segundo más extenso del país después del estuario del Río de la Plata. Es considerado un estuario de planicie costera templada, con una elevada turbidez y con un régimen de marea semidiurno de amplitud mesomareal (Perillo y Piccolo, 1999). Se extiende sobre una superficie de 2300 km<sup>2</sup> e incluye extensas planicies de marea separadas por canales de marea, parches de



marismas e islas. En él convergen sobre el veril norte dos afluentes de agua dulce, el río Sauce Chico y el arroyo Napostá Grande, con descargas de 1,9 y 0,8 m<sup>3</sup>/s, respectivamente (Pratolongo et al., 2016). Acompañan otros afluentes pequeños y de aporte intermitente, como así también aguas subterráneas (Di Martino et al., 2022). Los niveles freáticos están a poca o nula profundidad y las arcillas facilitan el ascenso capilar del agua hacia la superficie, permaneciendo ciertos sectores anegados durante el período húmedo (otoño e invierno) (Di Martino et al., 2022). La ciudad de Bahía Blanca y localidades más pequeñas como General Daniel Cerri, Ingeniero White y Punta Alta están localizadas en el veril norte del estuario (Fig. 1.1 a).

La costa del estuario de Bahía Blanca está densamente cubierta por plantas halófilas como *Spartina alterniflora* Loisel, *Sarcocornia perennis* (Miller) A.J. Scott, *Heterostachys ritteriana* (Moq.) Ung.-Sternb y *Allenrolfea patagonica* (Moq.) Kuntze (Pratolongo et al., 2016). Además, sus planicies de marea están habitadas principalmente por el cangrejo cavador *Neohelice granulata* (Dana, 1851), el cual es considerado un ingeniero ecosistémico ya que su comportamiento modifica el movimiento de aire y nutrientes en el sedimento (Nuñez et. al 2021; Simonetti et. al 2013). Este cangrejo es el alimento principal de un ave endémica, la gaviota *Larus atlanticus* (Orlog, 1958) (Petracci et al., 2023). La vegetación y la energía moderada de las mareas y las olas protege la zona superior de las planicies de marea de la deposición o erosión, favoreciendo la colonización de comunidades microbianas bentónicas (Cuadrado et al., 2011).

Las extensas planicies intermareales están colonizadas por bacterias epibentónicas, cianobacterias y diatomeas que forman biofilms y matas microbianas. Estas estructuras están presentes principalmente en la zona intermareal superior libre de vegetación y en la planicie supramareal inferior (Cuadrado et al., 2011, 2012, 2014;

Pan et al., 2017). Esta composición de microorganismos de diferentes grupos de la cadena trófica (productores, consumidores y descomponedores) las hace ecosistemas autosuficientes que reciclan nutrientes y desempeñan un papel primordial en la bioestabilización de sedimentos en las mareas actuales (Maisano, 2019; Pan et al., 2017).

Puerto Cuatros fue seleccionado para la obtención de muestras de matas microbianas a usar en los experimentos. El sitio es un puerto de pescadores artesanales situado en la zona más interna del estuario de Bahía Blanca (Figs. 1.1 a y b), se encuentra alejado del área industrial y portuaria, presenta bajo impacto antrópico en la región y sus extensas planicies de marea están cubiertas por matas microbianas (Cuadrado et al., 2014; Negrin, 2011; Negrin et al., 2021), las cuales pueden ser observadas por una coloración marrón-dorada dada por las diatomeas que cubren la superficie del sedimento (Figs. 1.2 a-c).

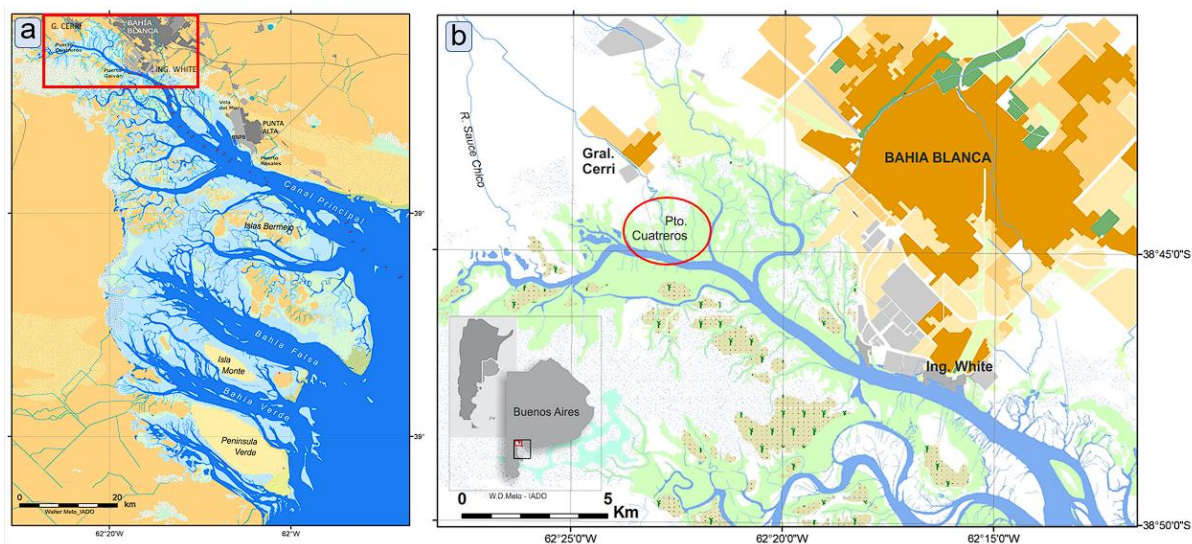


Fig. 1.1. a) Mapa del estuario de Bahía Blanca. b) Zona interior del estuario mostrando la ubicación de Puerto Cuatros, área donde se colectaron las matas microbianas.

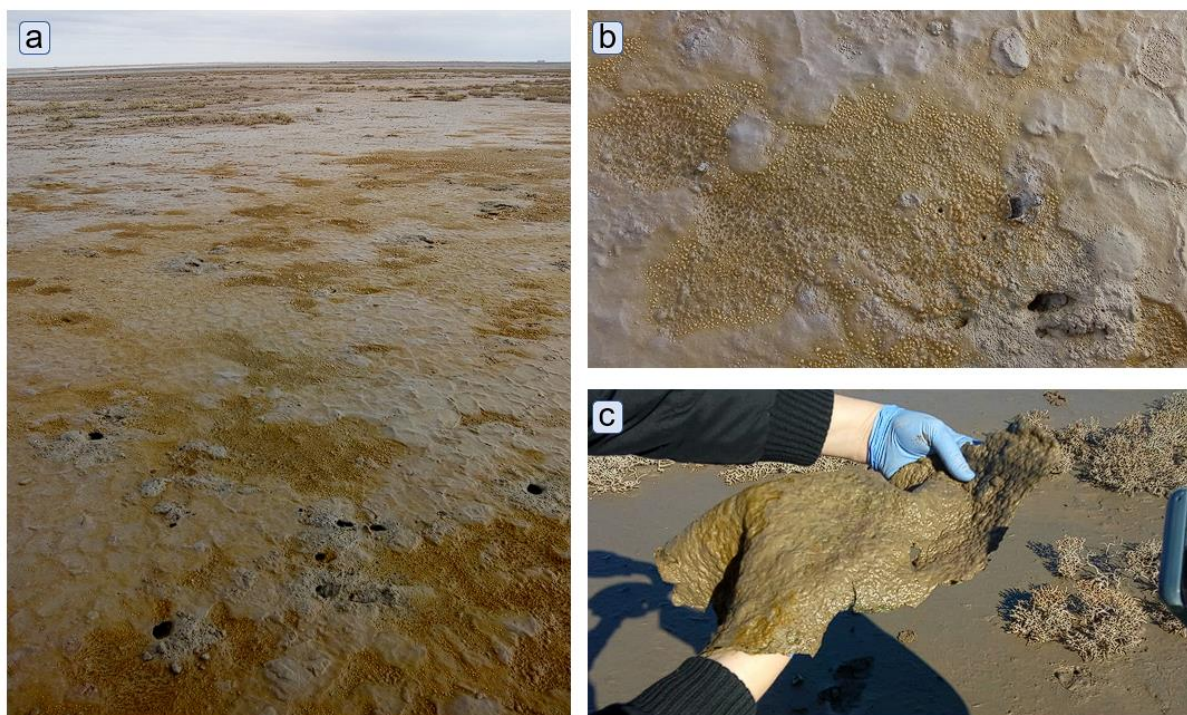


Fig. 1.2. Matas microbianas de Puerto Cuatrerros. a) Vista de la planicie de marea cubierta por matas microbianas. b) Matas microbianas vistas a mayor magnificación. c) Matas microbianas separadas del resto del sedimento.

#### 1.4.1. Fuentes de contaminación antropogénicas en el estuario de Bahía Blanca

El estuario cuenta con un Canal Principal de navegación de gran profundidad, el cual es sometido a actividades de dragado de profundización y de mantenimiento, que permiten el ingreso de buques de gran calado (Heredia Chaz et al., 2014). La principal actividad económica del sistema portuario es la exportación de productos agrícolas, petróleo, gas y derivados petroquímicos (Perillo et al., 2001). El puerto de Bahía Blanca exporta el 40% de la producción petroquímica nacional y el 20% de los productos agrícolas del país (Puerto Bahía Blanca, 2023).

En sus cercanías se encuentra el **complejo petroquímico** más importante del país, con un creciente número de industrias que vierten sus efluentes, con diferente grado de tratamiento, al estuario a través del canal colector del Polo Petroquímico o por el sistema cloacal general (Marcovecchio et al., 2016; Speake et al., 2020).

Asimismo, en las proximidades del estuario se desarrollan actividades agrícolas y ganaderas y sus residuos pueden ser llevados por escorrentía al estuario (La Colla et al., 2021).

Los **efluentes cloacales** de la ciudad de Bahía Blanca son tratados por las plantas depuradoras Primera Cuenca y Tercera Cuenca (Speake et al., 2020; Streitenberger y Baldini, 2010). Estas instalaciones llevan a cabo el tratamiento primario que implica la retención de sólidos presentes en los efluentes cloacales. Además, en años recientes se ha incorporado un proceso adicional de desinfección y descomposición de diversos compuestos químicos nocivos, utilizando ozono como oxidante fuerte. Lamentablemente, el funcionamiento de dichas plantas ha sido intermitente durante décadas lo que conlleva a una descarga de grandes cantidades de contaminantes orgánicos e inorgánicos al estuario durante los periodos en los que no se encuentran operativas.

Por otro lado, en el sector interno del estuario se destaca también la presencia del ex Basural Municipal Belisario Roldán, el cual fue clausurado en 2010 pero continúa siendo utilizado para el depósito de residuos sólidos urbanos, orgánicos e inorgánicos, y la quema ilegal a cielo abierto.

### **1.4.2. Contaminación del estuario por metales**

Los residuos y efluentes líquidos provenientes de las actividades industriales y portuarias suelen tener una alta carga de metales, los cuales pueden acumularse en el ambiente marino, manifestando incrementos progresivos en sus niveles de concentración (Calderón y Valdés, 2012). En el estuario de Bahía Blanca, numerosas investigaciones han sido realizadas respecto a la presencia de metales (Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb y Zn) en diversas matrices, como el agua, el material particulado,

el sedimento, y la biota de todos los niveles tróficos del ambiente marino: plancton, plantas, bivalvos, crustáceos y peces, entre otros (Berasategui et al., 2018; Botté et al., 2007; Forero-López et al., 2021; La Colla et al., 2021; Marcovecchio et al., 2016; Negrin et al., 2021; Serra et al., 2017; Simonetti et al., 2013). Las concentraciones de estos analitos en el estuario presentan una variación espacial, siendo más elevadas, en el sector interno donde conviven los usos urbanos e industriales y donde los afluentes de agua dulce desembocan luego de drenar grandes extensiones de campos agrícolas (La Colla et al., 2021; Speake et al., 2020). Negrin et al. (2021) encontraron enriquecimiento antropogénico para todos los metales que evaluaron en **suelos de marismas** del estuario e identificaron un enriquecimiento mínimo para Pb, Zn y Ni, y un **enriquecimiento moderado** para Cu y, especialmente, **Cr**.

En 30 años de monitoreo del estuario de Bahía Blanca las concentraciones de **Cr total disuelto** en agua de mar han sido bajas (Andrade, 2001; Botté et al., 2007; Marcovecchio et al., 2010). Sin embargo, se ha observado un **incremento del mismo** durante los últimos años, con valores de hasta 57 µg Cr/L, y con varios valores (30%) superiores a los máximos recomendados por directrices internacionales (La Colla et al., 2018, 2021). Por tal motivo, en esta tesis el Cr ha sido el principal metal evaluado para ser eliminado del agua mediante el uso de matas microbianas.

### 1.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo surge de la necesidad de garantizar la sustentabilidad del medio, mantener el equilibrio ecológico y mitigar la contaminación ambiental. En este contexto, los estuarios frecuentemente experimentan el impacto de las actividades humanas, las cuales introducen diversos contaminantes, incluyendo metales, al medio ambiente. En las zonas intermareales de los estuarios, se desarrollan biofilms

y/o matas microbianas que actúan como sistemas de amortiguación de sustancias en general, contribuyendo a mitigar los efectos adversos.

Las **hipótesis** planteadas para el desarrollo de la tesis fueron:

- ❖ Las matas microbianas poseen la capacidad de remover metales del medio y este proceso además no afecta la viabilidad de la comunidad microfitobentónica que las componen.
- ❖ Las matas microbianas constituyen una herramienta capaz de remover con mayor eficiencia los metales en comparación a sedimentos inertes.

El **objetivo general** fue:

- ❖ Evaluar a las matas microbianas de ambientes estuariales como potencial alternativa para la remoción de metales de soluciones acuosas mediante ensayos de laboratorio, estableciendo las condiciones fisicoquímicas óptimas para una mayor eficiencia del proceso y una menor alteración de la comunidad microfitobentónica.

Los **objetivos específicos** fueron:

- ❖ Realizar la caracterización biogeoquímica de las matas microbianas de Puerto Cuatrerros que se emplearán en los ensayos de remoción de metales.
- ❖ Evaluar la capacidad de las matas microbianas de remover Cr(III) del agua de mar, con y sin un sistema de aireación del agua.
- ❖ Evaluar los efectos del Cr(III) y la aireación del agua sobre la biomasa y la composición de la comunidad microfitobentónica.

- ❖ Evaluar el contenido de materia orgánica y los parámetros físicoquímicos (pH, potencial redox, salinidad y temperatura) de las matas microbianas y las soluciones como condicionantes en la remoción de metales.
- ❖ Evaluar la eficiencia de las matas microbianas en la eliminación de Cr(III) a diferentes concentraciones (2-30 mg Cr /L) en agua de mar y la interacción del Cr con otros metales (Cu, Pb, Zn) presentes en las matas.
- ❖ Evaluar el efecto de variaciones en el pH (2, 4 y 8) y la salinidad (2, 15 y 33 UPS) en la remoción de Cr(VI) por las matas microbianas.
- ❖ Evaluar los efectos combinados de la exposición a Cr(VI) y las diferentes condiciones de pH (2, 4 y 8) y salinidad (2, 15 y 33 UPS) sobre la comunidad microfitobentónica.
- ❖ Determinar y comparar la eficiencia de remoción de Cr(VI) por el biochar de matas microbianas y por matas autoclavadas, matas expuestas a oscuridad permanente y matas incubadas bajo ciclos de luz/oscuridad similares a los ambientales.
- ❖ Evaluar en las matas microbianas la capacidad de remoción de Cr(VI), Pb(II), y Zn(II) y los efectos de dichos metales sobre la comunidad microfitobentónica y las bacterias heterótrofas aerobias, al exponerlas a soluciones con los metales en forma individual y combinados.
- ❖ Determinar el rol de los diferentes componentes de las matas en el proceso de remoción mediante la caracterización elemental, mineral y de los grupos funcionales que componen las matas expuestas a Cr(III), Cr(VI), Pb y Zn.



## CAPÍTULO 2

### METODOLOGÍA GENERAL

En el marco de esta tesis se desarrollaron cinco experimentos en laboratorio para dar respuesta a cada uno de los objetivos planteados. Esto requirió la aplicación de numerosas determinaciones analíticas, las cuales se detallan en este capítulo. Los diseños experimentales de cada ensayo se describieron en los capítulos correspondientes.

#### 2.1. ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

Para dar cumplimiento al objetivo general de la tesis fue necesario seguir protocolos validados internacionalmente (APHA, 1998) para el acondicionamiento del material empleado, evitando de esta manera la contaminación cruzada por metales. Se siguieron los siguientes pasos de acondicionamiento para todo el material empleado durante los ensayos de remoción de metales y determinaciones de la concentración de metales: lavado inicial con agua de red y detergente no iónico, seguido por tres enjuagues con agua destilada, y luego inmersión en baño de ácido nítrico al 5% durante 24 horas. Finalmente, todo el material se vuelve a enjuagar en agua destilada tres veces y se deja secar a temperatura ambiente al resguardo de corrientes de aire. El protocolo descrito se aplicó al material utilizado en la recolección de las muestras a campo, en el procesamiento de las mismas en el laboratorio, en el desarrollo de cada uno de los experimentos y en las determinaciones analíticas posteriores.

Para las determinaciones analíticas de **clorofila a**, **feopigmentos** y **carbohidratos**, después de los experimentos, el material empleado fue acondicionado con agua de red y detergente no iónico, luego fue sumergido en



hidróxido de sodio al 1% durante 4 horas. Posteriormente fue enjuagado por inmersión en agua destilada durante dos horas; repitiendo el proceso dos veces. En particular, el material para el **cultivo de bacterias** fue previamente esterilizado mediante autoclave a 121 °C y una atmósfera durante 15 minutos.

### 2.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

La determinación de los parámetros fisicoquímicos se llevó a cabo en los Capítulos 4-7. Como se muestra en la Fig. 2.2, los mismos se midieron en las soluciones de metales y en las matas microbianas con los **sensores**:

- Hanna Instruments HI991003 para temperatura (°C) y pH en matas microbianas.
- Ohaus ST2100 para pH en soluciones.
- Mettler Toledo FiveGo™ F2 para potencial redox (Eh en mV) en soluciones y matas microbianas.
- Hanna Instruments HI9033 para conductividad (mS/cm) en soluciones. A partir de los datos de conductividad se calculó la salinidad multiplicando cada valor por un factor de corrección: 0,64. La salinidad es la suma de las concentraciones de todos los iones principales, en particular el sodio y el cloruro son los iones dominantes en el agua de mar. Este parámetro se expresó como Unidades Prácticas de Salinidad (UPS), la cual se basa en la relación entre la conductividad de una muestra y la de una solución estándar de cloruro de potasio (Kelly et al., 2024).



Fig. 2.2. Medición de pH y Eh en matas microbianas al final del experimento.

### 2.3. MÉTODO PARA LA FILTRACIÓN DE AGUA DE MAR

Agua de mar filtrada fue utilizada para la preparación de las soluciones de metales en los ensayos de los Capítulos 4, 5 y 7. Para ello se filtró secuencialmente agua de mar a través de filtros de acetato de celulosa de  $1,2\ \mu\text{m}$  (Gamafil) y  $0,45\ \mu\text{m}$  (Millipore) de tamaño de poro. A continuación,  $2\ \text{g/L}$  de carbón activado fueron agregados al agua filtrada. Después de 24 horas, el agua fue filtrada nuevamente a través de filtros de acetato de celulosa de  $0,22\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Gamafil). Finalizado todo el proceso, el agua fue guardada en bidones de 5 L acondicionados y almacenada en heladera hasta su uso dentro de las 48 horas.

### 2.4. RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS DE MATAS MICROBIANAS

Para todos los experimentos de remoción de metales (Capítulos 4-7) se recogieron muestras de matas microbianas en la zona intermareal superior de Puerto Cuatros, en la zona interior del estuario de Bahía Blanca ( $38^{\circ}44'50''\text{S}$ ;  $62^{\circ}23'5''\text{O}$ ).

Las muestras de matas microbianas junto al sedimento que se encuentra debajo fueron cuidadosamente recolectadas con moldes cortantes de acero inoxidable de  $8\ \text{x}\ 8\ \text{cm}$  de lado y  $1\ \text{cm}$  de profundidad (Fig. 2.1 a). Con la ayuda de una espátula se

separaron las muestras del resto del sedimento y se colocaron sobre una rejilla plástica (Figs. 2.1 b y c). Se utilizaron tiras de nailon para introducir las rejillas conteniendo las matas microbianas dentro de cajas de acrílico transparente de 11 cm de largo x 8 cm de ancho, en la misma posición en la que se encontraban en el ambiente. Todas las muestras se transportaron en conservadoras al laboratorio.

Previo a los ensayos las matas microbianas se aclimataron durante 72 horas en una **cámara de cultivo** (310 TLD) bajo luz y temperatura controladas, similares a las condiciones ambientales de la época en la que se realizó cada ensayo (Fig. 2.1 d). La iluminación en la cámara de cultivo tuvo una intensidad de aproximadamente  $66 \mu\text{moles}/\text{m}^2 \times \text{seg}^1$  y fue proporcionada por lámparas LED de 18 W.



Fig. 2.1. Recolección de muestras de matas microbianas para ensayos de remoción de metales. a) Corte de la mata microbiana con un molde cortante. b) Separación de la muestra con espátula. c) Mata microbiana sobre una rejilla plástica. d) Matas microbianas en contenedores acrílicos en cámara de cultivo durante el período de aclimatación.

Al final de los ensayos de remoción, las soluciones destinadas a determinar la concentración total de metales fueron acidificadas con HCl 36% hasta alcanzar un pH

≤ a 2 y las soluciones destinadas a la determinación de Cr hexavalente fueron llevadas a pH 8 con NaOH 1N. Las soluciones se almacenaron en botellas plásticas en heladera hasta su procesamiento.

Tanto las muestras de matas microbianas recolectadas a campo como las matas empleadas en los experimentos de remoción de metales fueron subdivididas para posteriormente realizar diversas determinaciones analíticas detalladas en el siguiente apartado.

## **2.5. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE VARIABLES GEOQUÍMICAS**

### **2.5.1. Determinación de la concentración de metales con ICP OES**

Se realizaron determinaciones de metales en soluciones y matas microbianas en los ensayos de los Capítulos 4-7. La concentración de metales en las soluciones acuosas se determinó por el método de adición creciente de patrones certificados (Chem-Lab, Zedelgem B-8210, Bélgica).

Aproximadamente 40 g de mata microbiana fue secada en estufa (SAN-JOR, modelo SL30S) a  $60 \pm 5$  °C, posteriormente fue molida y homogeneizada en un mortero de porcelana y se almacenó en recipientes plásticos de 30 cm<sup>3</sup> en un desecador a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Una pequeña fracción de la muestra (0,25 g) se sometió a una digestión con ácido nítrico (Merck pro-analytical) en un digestor de microondas (MARS-5 CEM Corporation, EE.UU.), según la norma SW 846-3051 (potencia: 400 W; presión (máx): 350 psi; temperatura (máx): 165 °C; tiempo: 15 min). El ácido utilizado fue previamente ultra-purificado (sub-hervido) utilizando un destilador (Berghof distillacid BSB-939-IR, GmbH, Alemania).

Las mediciones finales se realizaron con un espectrómetro de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (ICP OES, Shimadzu Simultaneous 9000) de acuerdo con la norma 200.7 de la EPA. Las longitudes de onda usadas para cada metal fueron 267,72 nm (Cr total), 220,35 nm (Pb) y 213,86 nm (Zn). Las digestiones y determinaciones fueron realizadas por personal de LANAQUI (Laboratorio de Análisis Químicos) perteneciente al CERZOS-CONICET-UNS.

### 2.5.2. Determinación de Cr(VI) por método colorimétrico

Se determinó la concentración de Cr(VI) en soluciones de los ensayos de los Capítulos 6 y 7. La determinación se realizó siguiendo la técnica de Rand et al. (1976) descrita en el Standard Methods (1998). El principio del método colorimétrico se basa en una reacción de óxido reducción, donde el Cr(VI) reacciona con la **1,5-difenilcarbazona (DFC)** en medio ácido formando Cr(III) y 1,5-difenilcarbazona de color violeta (Córdova Pantigoso y Medina Delgado, 2019).

Se realizó una solución de DFC al 0,5% ( $C_{13}H_{14}N_4O$ , M&B) usando como disolvente acetona ( $C_3H_6O$ , Anedra). Para realizar la curva de calibrado se realizaron soluciones de Cr(VI) con seis concentraciones distintas: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg Cr(VI)/L. Se traspasaron 10 mL de cada solución a un tubo de centrifuga, se le añadió 1 gota de ácido sulfúrico 50% y 200  $\mu$ L de la solución DFC. Se preparó el blanco en un tubo de centrifuga con 10 mL de agua destilada y las mismas cantidades de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ , Anedra) y DFC que para las diluciones. Se dejó reposar 10 minutos para que se desarrolle el color, luego se midió la absorbancia de cada solución en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz a 540 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway (modelo 6715). Se realizaron dos curvas de

calibrado de absorbancia vs concentración de Cr con 7 puntos cada una y se eligió la curva de mayor R (Fig. 2.3).

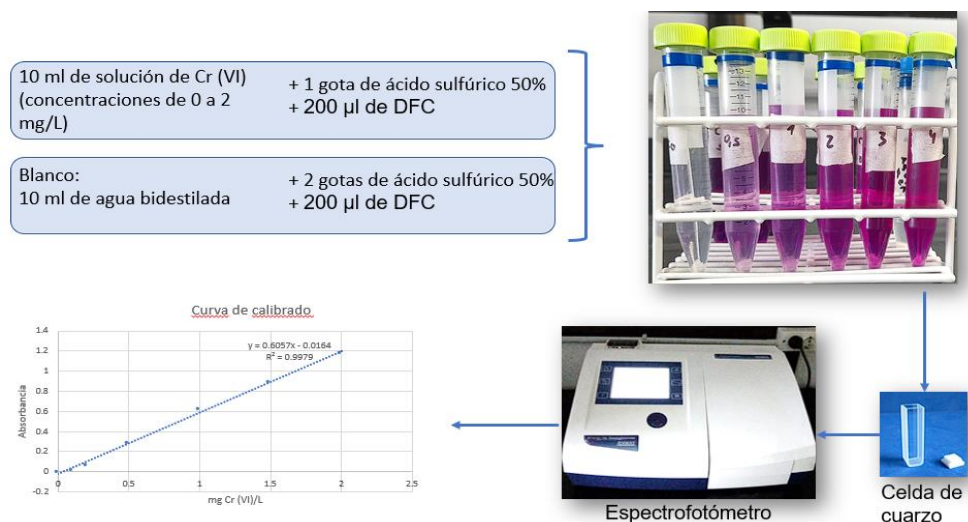


Fig. 2.3. Esquema de la preparación de la curva de calibrado para la determinación de Cr(VI) por el método colorimétrico.

Para medir el Cr(VI) en las soluciones luego de los ensayos de remoción de Cr se tomaron 1 a 5 mL de dichas soluciones, se colocaron en un tubo de 15 mL y se llevó a un volumen de 10 mL con agua bidestilada. Se llevó la solución a pH 2 con 1 gota de ácido sulfúrico 50% y se le añadieron 200 µl de la solución DFC. Luego de 10 minutos se midió la absorbancia de cada muestra en la celda de cuarzo a 540 nm. A partir de la curva de calibrado y el factor de dilución se calcularon los mg Cr(VI)/L en cada muestra.

### 2.5.3. Determinación del contenido de MO

El contenido de **MO** se evaluó en los ensayos de los Capítulos 4, 5 y 7. Aproximadamente 10 g de la mata microbiana seca y homogeneizada (ítem 2.5.1) se guardó en sobres de aluminio para la determinación del contenido de materia orgánica (MO). Dichos sobres se pesaron antes y después de la ignición a  $450 \pm 50$  °C durante



4 horas en un horno de mufla IONOMEX. Se empleó el método de pérdida de peso por ignición (LOI) (Commendatore y Esteves, 2004; Dean, 1974), aplicando la Ecuación 1 (Ec. (1)) para calcular el contenido de MO:

$$w = [(W_i - W_f) / W_i] * 100 (\%) \quad (1)$$

Donde:

w: contenido de MO expresado en %

$W_i$ : peso de la mata microbiana antes de la ignición (secada a 60 °C).

$W_f$ : peso de la mata microbiana después de la ignición.

#### **2.5.4. Análisis granulométrico de las matas microbianas**

El análisis de granulometría se realizó solo para el Capítulo 3. Aproximadamente 10 g de la mata microbiana fresca fueron almacenados en vasos precipitados de 100 mL. Posteriormente se eliminó la MO con peróxido de hidrógeno al 65% ( $H_2O_2$ , Anedra). Inicialmente la reacción se realizó a temperatura ambiente durante varios días y para finalizar se continuó en una placa calefactora a 40-50 °C hasta el cese total de burbujeo y casi sequedad. Finalmente, la composición por tamaño de grano de cada muestra se analizó por el método de difracción láser con un Malvern Masterziser 2000 y software Mastersizer 2000 (5.40).

### 2.5.5. Difracción de rayos X (DRX)

El análisis de DRX se realizó para los Capítulos 3, 4, 6 y 7. Esta técnica se utiliza para determinar la **estructura cristalina** de un material, la distancia entre los planos y, eventualmente, la presencia de fases amorfas (Forero-López, 2019).

Diferentes partes de las matas microbianas fueron cortadas y secadas a 50 °C. Posteriormente fueron molidas y homogeneizadas en un mortero de porcelana. Cuando fue necesario, se procedió a darle un final de molienda a aproximadamente 1 g de muestra en un mortero de ágata hasta un tamaño de 50 µm. Luego las muestras fueron analizadas con un difractómetro de rayos X Rigaku (modelo Dmax III-C) con radiación Cu K $\alpha$  y un monocromador de grafito, con 35 kv y 15 mA perteneciente al Laboratorio de rayos X del Departamento de Geología, UNS. Se utilizó un paso de 0,04 con un tiempo de conteo de 1 s.

### 2.5.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de análisis de dispersión de rayos X (EDS)

Los análisis de SEM-EDS se llevaron a cabo para los Capítulos 3, 4, 6 y 7. La espectroscopia de análisis de dispersión de rayos X (EDS) es una técnica analítica que se utiliza para determinar la **composición elemental** de una muestra (Forero-López, 2019). Se realizaron cortes paralelos y perpendiculares a la superficie de las matas microbianas frescas (~ 5 x 5 mm de lado), los cuales se fijaron inmediatamente con glutaraldehído al 2,5% (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) preparado en tampón fosfato 0,067 M (pH 7,2) y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

Las muestras de matas microbianas fijadas se lavaron 3 veces con tampón fosfato y se deshidrataron utilizando un gradiente de alcohol etílico/agua destilada de 30, 50 (15 min cada uno) y 70% v/v (toda la noche). La deshidratación se llevó al 96% de



alcohol y se continuó con acetona/alcohol etílico (50% v/v, 15 min), hasta alcanzar el 100% de acetona (1 hora), seguido de secado por punto crítico (E3000, Polaron) utilizando CO<sub>2</sub>. Las muestras secadas se recubrieron de oro (300 Å) utilizando un evaporador de metales por plasma de argón (91000 Modelo 3, Pelco).

Los análisis SEM-EDS fueron llevados a cabo con un microscopio electrónico de barrido LEO EVO 40 (Cambridge 2003) a una aceleración de voltaje de 20 kV en Laboratorios de Servicio de Rayos X y Microscopía Electrónica, pertenecientes al Centro Científico Tecnológico (CCT) CONICET Bahía Blanca. Se tomaron **fotomicrografías** y se realizaron mapeos elementales y espectros puntuales sobre los componentes de las matas microbianas. Los **mapeos** permiten visualizar la composición y distribución espacial de elementos químicos en un área de la muestra, la intensidad de color en la imagen del mapeo está asociada a la cantidad del elemento. En cambio, un **espectro puntual** permite caracterizar la composición elemental de un punto específico de la muestra con mayor detalle.

### **2.5.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)**

Los análisis de ATR-FTIR se realizaron para los Capítulos 3 y 6. La espectroscopía de absorción infrarroja (IR) es una rama de la espectroscopía que se basa en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. En principio cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar) debido a que todas las moléculas (a excepción de las especies diatómicas homonucleares) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de luz de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo (Forero-López, 2019).

Los **grupos funcionales** que contienen las matas microbianas fueron determinados mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) utilizando un espectrómetro Nicolet iS5 equipado con un módulo ATR iD7 ubicado en el Laboratorio de Estudio y Ensayo de Materiales del Departamento de Ingeniería, UNS. Para ello diferentes partes de las matas microbianas fueron cortadas, secadas a 50 °C y el corte intacto fue usado durante los análisis.

### 2.5.8. Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Los análisis de XPS se realizaron para el Capítulo 3. La espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) es un método de caracterización de superficies que permite obtener información cualitativa y cuantitativa de una muestra con determinación de los **estados de oxidación** de los compuestos. Asimismo, mediante el análisis de las intensidades de sus señales, este método posibilita establecer la relación atómica de los elementos que forman parte de la superficie de un material para comprender cómo los elementos interactúan y se combinan químicamente en la superficie (Forero-López, 2019).

El análisis químico composicional de las matas microbianas se realizó por XPS (SPECS ProvenX-PS) usando una fuente de rayos X de ánodo doble (Al/Mg) y un analizador de energía de electrones hemisférico de 150 mm (PHOIBOS), técnica aplicada por colaboradores del Instituto de Física Aplicada (INFAP), CONICET-San Luis. El analizador funciona en modo de transmisión de analizador fijo (FAT) con energía de paso de 30 eV. Las energías de todos los espectros se referenciaron al pico C1s correspondiente a energía de enlace 285,0 eV. Todos los espectros XPS

fueron deconvolucionados usando el software Casa XPS. Los datos se ajustaron mediante el empleo de las funciones Gaussian-Lorentzian.

## 2.6. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA VARIABLES BIOLÓGICAS

### 2.6.1. Determinaciones de la concentración de clorofila a y feopigmentos

Las determinaciones de clorofila a y feopigmentos se realizaron para los Capítulos 4-7. La **clorofila** es un pigmento fotosintético de color verde que las plantas vasculares, algas y cianobacterias sintetizan para absorber energía lumínica a diferentes longitudes de onda. En las plantas y algas, se encuentra presente en las membranas de los tilacoides de los cloroplastos, mientras que en las cianobacterias se localizan en laminillas fotosintéticas (Padilla Prado, 2023). Cuando la clorofila se degrada, forma una serie de productos llamados feofitina, clorofilida y feoforbida que en conjunto se denominan **feopigmentos** (Sanmartín et al., 2011). La cuantificación de feopigmentos es útil para evaluar posibles daños causados por metales en las cianobacterias y diatomeas (Sanmartín et al., 2011).

Se tomaron muestras de matas utilizando un corer cilíndrico de plástico con un diámetro interior de 28,5 mm y una altura de 5 mm. Las muestras se colocaron en cajas de Petri plásticas de 35 mm de diámetro y se conservaron a -70 °C en ultrafreezer (Presvac FH-80V) hasta ser liofilizadas. Las muestras se secaron en un liofilizador (Rifacor L-A-B3-C) y posteriormente se trituraron en un mortero de porcelana. Finalmente, las cajas de Petri con las muestras se almacenaron en un recipiente plástico con sílica gel hasta su procesamiento.

Un gramo de cada muestra de mata microbiana liofilizada se suspendió en 5 mL de acetona al 90% y se mantuvo en oscuridad a 4 °C durante 16 horas. Tras la centrifugación a 1600 g, el sobrenadante se leyó espectrofotométricamente (665 y

750 nm) antes y después de la acidificación con HCl 0,1 N en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway (modelo 6715). Se utilizaron las ecuaciones de Lorenzen (1967) (Ec. (2) y (3)) para calcular la concentración de clorofila *a* y feopigmentos; expresados en  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (p.s.).

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/g p.s.}) = A \cdot K \cdot [(665-750)-(665a-750a)] \cdot V/W \cdot l, \quad (2)$$

$$\text{Feopigmentos } (\mu\text{g/g p.s.}) = A \cdot K \cdot [R \cdot (665a-750a)-(665-750)] \cdot V/W \cdot l, \quad (3)$$

Donde:

A: coeficiente de absorción de la clorofila *a* = 11,0,

K: factor para equiparar la reducción de la absorbancia a la concentración inicial de clorofila = 2,43,

665 y 750: absorbancias antes de la acidificación,

665a y 750a: absorbancias después de la acidificación,

V: volumen de acetona utilizado para la extracción (mL),

l: longitud del recorrido de la cubeta (1 cm),

W: peso seco de mata microbiana (g),

R: relación máxima 665:665a en ausencia de feopigmentos= 1,7.

### 2.6.2. Análisis cualitativo de la comunidad microfitobentónica

El análisis cualitativo de diatomeas y cianobacterias se realizó únicamente en muestras de campo para el Capítulo 3. Para ello se tomaron muestras con la ayuda

de una pala y una espátula, se colocaron en recipientes plásticos y se trasladaron al laboratorio en conservadora para su inmediato procesamiento.

Las microalgas fueron identificadas al menor nivel taxonómico posible mediante la observación al microscopio óptico (Nikon Eclipse E100) y al microscopio electrónico de barrido (LEO EVO 40), basándose en su morfología y tamaño celular, siguiendo la bibliografía tradicional. Para la identificación de las cianobacterias (Clase Cyanophyceae/Oxyphotobacteria) se siguió a Komárek y Anagnostidis (1989, 2005). Para la identificación de las diatomeas (Clase Bacillariophyceae) se siguió a Krammer y Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a, b). Los organismos se clasificaron en órdenes y familias siguiendo Algaebase (Guiry, 2023).

### *2.6.2.1. Separación de diatomeas y cianobacterias del sedimento*

Para separar las células del resto del sedimento y poder visualizarlas más fácilmente bajo el microscopio óptico se utilizaron dos técnicas diferentes:

**Técnica 1:** Las matas microbianas de un espesor aproximado a 1 cm se colocaron en recipientes plásticos. Por encima de ellas se colocó una **red de nailon** de 63  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, una capa de 2 mm de arena previamente muflada (4 horas a 450 °C) y se cubrió la arena con otra red de nailon de 63  $\mu\text{m}$ . La red y la arena se humedecieron completamente con agua de mar filtrada. Los recipientes se mantuvieron bajo luz artificial en el laboratorio durante al menos 24 horas (Fig. 2.4 a). Mediante esta técnica las microalgas móviles migran a la red de nailon superior a través de la capa de arena que actúa para retener los desechos adheridos al mucílago que las rodea (Fig. 2.4 b). La capa de nailon superior fue retirada y enjuagada con agua de mar filtrada para recoger las microalgas móviles y observarlas luego al microscopio óptico.

**Técnica 2:** Las matas microbianas de un cm de profundidad se colocaron en recipientes plásticos. Sobre ellas se colocaron pequeños cuadrados de **papel tissue** de aproximadamente 2 x 2 cm y se las iluminó de forma artificial desde la parte superior durante al menos 12 horas (Fig. 2.4 a). De esta manera las microalgas con capacidad de migrar a la superficie quedan retenidas en el papel (Fig. 2.4 b). Al día siguiente los papeles fueron retirados y se colocaron en frascos con 10 mL de formol al 5% (CH<sub>2</sub>O, Anedra) para su conservación hasta el momento de la observación al microscopio óptico.



Fig. 2.4. Técnica 1 y 2 para la separación de diatomeas y cianobacterias móviles del sedimento. a) Matas microbianas cubiertas por red de nailon (izquierda y centro) y papel tissue (derecha) expuestas a luz artificial. b) Matas microbianas luego de haberse producido la migración de las microalgas a la red y al papel tissue.

#### 2.6.2.2. *Técnica para la limpieza de frústulos de diatomeas*

Las diatomeas poseen una pared celular formada por un **frústulo** bivalvo de silicio unido por fibras de exopolisacáridos. Para su identificación taxonómica se

emplea principalmente la morfología y las ornamentaciones formadas por los intrincados y llamativos patrones morfológicos de sílice presentes en el frústulo. Para observar estos detalles es necesario “limpiar” el frústulo, mediante la eliminación del sedimento asociado y el contenido orgánico de las células.

Para realizar el lavado del frústulo se colocó 3 mL de la muestra (tomada como se indicó en la sección 2.6.2.1) en un tubo de vidrio y se centrifugó durante 10 minutos a 1600 g. Se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur, se agregó agua destilada hasta completar el volumen anterior (3 mL) y se volvió a centrifugar 10 minutos. El proceso de lavado se repitió 3 veces consecutivas. Luego del último descarte del sobrenadante se le agregó peróxido de hidrógeno al 20% hasta duplicar el volumen (6 mL) y se colocó el tubo a baño maría durante aproximadamente 2 horas. Para separar las células del peróxido se centrifugó el tubo y se descartó el sobrenadante. Finalmente se realizaron 3 lavados más con agua destilada y se observó al microscopio óptico el pellet resultante (Moreno et al., 2012).

### **2.6.3. Análisis cuantitativo de la comunidad microfitobentónica**

El análisis cuantitativo de diatomeas y cianobacterias se llevó a cabo para los Capítulos 4, 5 y 7. El mismo corer cilíndrico que el utilizado para la determinación de pigmentos se utilizó para recolectar las muestras de matas para la determinación de la abundancia de diatomeas y cianobacterias, las cuales se fijaron inmediatamente en 10 mL de formaldehído al 10% (preparado con agua de mar filtrada a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) y se almacenaron en conservadoras a temperatura ambiente.

Las muestras de mata microbiana fijadas fueron sonicadas durante 9 minutos y homogeneizadas en un vórtex. Luego, se realizaron diluciones (1:10) añadiendo 1 mL de muestra a un tubo Falcon con 9 mL de agua de mar filtrada (0,45 µm de tamaño de poro). Posteriormente, se procedió al recuento de diatomeas y cianobacterias con una cámara de recuento Sedgwick Rafter en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 300). Las microalgas se clasificaron en **cianobacterias filamentosas, diatomeas céntricas y diatomeas pennadas de diferentes rangos de tamaño: <39 µm, 39-100 µm y >100 µm**. Esta clasificación se eligió en base a la bibliografía y debido a la imposibilidad de determinar géneros y especies durante el análisis cuantitativo producto de la gran cantidad de sedimento y MO que contienen las muestras (Pan et al., 2013). Además, el rango de tamaño tiene muchas implicaciones ecológicas para las diatomeas, como la vulnerabilidad a los herbívoros, la adquisición de recursos, la reproducción, la vulnerabilidad a las perturbaciones, etc. (Lowe, 2011). Los valores de abundancia se expresaron como **células/cm<sup>3</sup> de peso húmedo (p.h.)**.

#### **2.6.4. Determinación de la concentración de carbohidratos coloidales y capsulares**

La determinación de la concentración de carbohidratos se realizó para el Capítulo 7. para ello se tomaron muestras de matas utilizando un corer cilíndrico de plástico con un diámetro interior de 28,5 mm y una altura de 10 mm. Las muestras se colocaron en cajas de Petri plásticas de 35 mm de diámetro y se conservaron a -70 °C en ultrafreezer. Posteriormente se secaron en un liofilizador y se trituraron en un mortero de porcelana. Las cajas de Petri con las muestras se almacenaron en un recipiente plástico con sílica gel hasta su procesamiento.



Luego se procedió a separar la fracción coloidal de la capsular, para ello 0,50 g de muestra se mezcló con 1 mL de agua destilada en tubos de vidrio de punta cónica de 15 mL, se agitaron en vortex y durante 1 hora fueron incubadas en un baño de agua a 30 °C (2.5 a-b). Al finalizar el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 1600 g durante 15 minutos y se extrajo el sobrenadante resultante, el cual contiene la fracción de carbohidratos coloidales (2.5 c). El pellet fue incubado con 1 mL de EDTA 100 mM ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ , Tetrahedron) durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se centrifugó a 1600 g durante 15 min y se extrajo el sobrenadante que contiene la fracción de carbohidratos capsulares (Underwood et al., 1995).

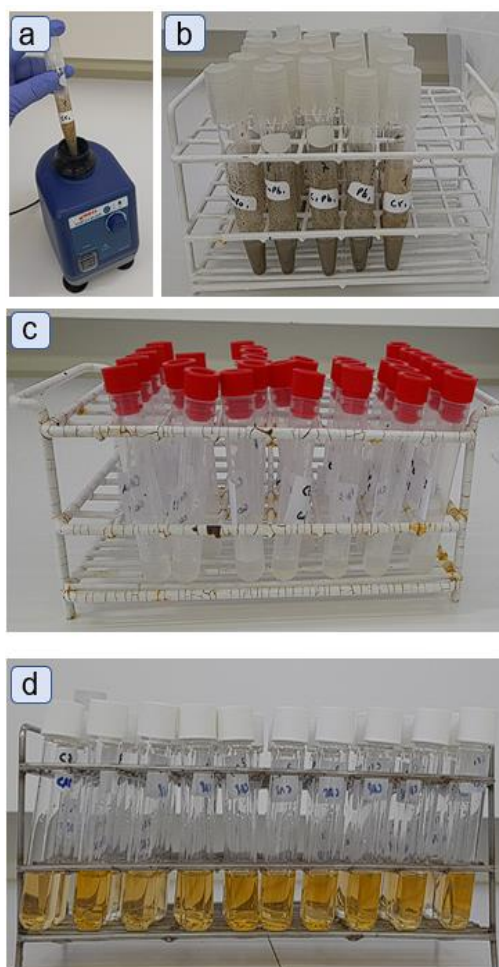


Fig. 2.5. Imágenes de las diferentes etapas en la extracción y determinación de los carbohidratos coloidales y capsulares. Detalle explicado en el texto.

La cuantificación de carbohidratos en ambas fracciones se realizó siguiendo el método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Para ello se tomaron 0,50 mL de cada sobrenadante, se colocaron en tubos de vidrio con tapa a rosca y se les añadió 0,50 mL de fenol 5% ( $C_6H_6O$ , Cicarelli), se lo agitó manualmente y luego se adicionaron 2,50 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ , Anedra), tras lo cual se repitió la agitación y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente (2.5 d). Finalmente, se tomó una alícuota de cada solución y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway (modelo 6715) a 485 nm de longitud de onda para la determinación de carbohidratos.

A partir de una solución madre de glucosa de 10,64 mg/L se preparó una solución intermedia de 106,40  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de ella, se tomaron diferentes volúmenes para realizar las soluciones estándar de la curva de calibrado (siete puntos) por duplicado; seleccionando la curva con el mayor  $R^2$  (Fig. 2.6).

	$\mu\text{L}$ agua	$\mu\text{L}$ St	$\mu\text{g/mL}$ St
<b>Bco</b>	1000	0	0
<b>T1</b>	950	50	5,32
<b>T2</b>	900	100	10,64
<b>T3</b>	800	200	21,28
<b>T4</b>	600	400	42,56
<b>T5</b>	400	600	63,84
<b>T6</b>	0	1000	106,40

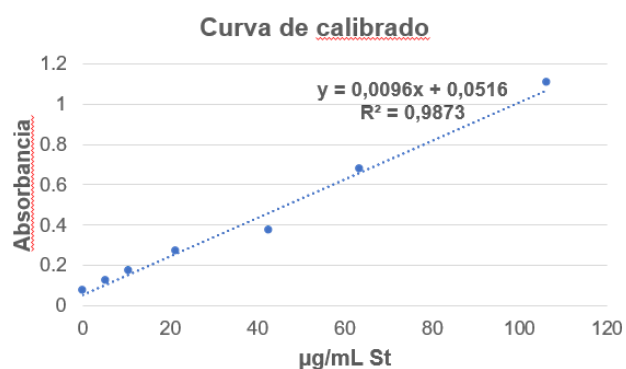


Fig. 2.6. Soluciones estándar de glucosa (St) empleadas para la curva de calibrado.

El contenido de carbohidratos coloidales y capsulares en las muestras de matas microbianas de cada experimento correspondiente se expresó como equivalentes de glucosa por gramo de sedimento seco (eq glu/g sed. seco).

## 2.6.5 Recuento y caracterización de bacterias heterótrofas aerobias y cultivables presentes en las matas microbianas

### 2.6.5.1. Preparación del medio de cultivo

El recuento y caracterización de bacterias heterótrofas se realizó para el Capítulo 7. Debido a la gran diversidad de microorganismos presentes en las matas microbianas se seleccionó un medio de cultivo generalista, el **Agar Triptona Soja (TSA)**, Biokar diagnostics ref. BK047HA). El TSA posee una gran versatilidad y capacidad para soportar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos (Caycedo Lozano et al., 2021; Llíros et al., 2008). Sus componentes son: triptona 15 g/L, digerido papaico de harina de soja 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, agar bacteriológico 15 g/L.

Para su preparación se suspendieron 40 g de polvo en 1 L de agua de mar filtrada. Se calentó a 95-100 °C en agitador magnético con placa calefactora (Dlab MS-H280-Pro) hasta su ebullición y total disolución (aproximadamente 2 horas). Se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm durante 15 min y posteriormente se distribuyó en placas de Petri de vidrio (Figs. 2.7 a y b).

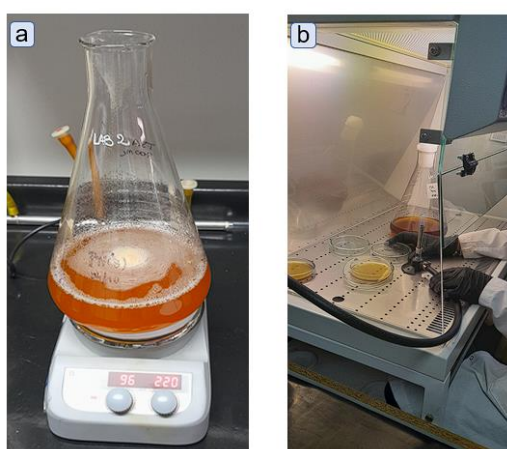


Fig. 2.7. a) Preparación del medio de cultivo Agar Triptona Soja (TSA) en agitador magnético con placa calefactora. b) Distribución del TSA esterilizado en placas de Petri bajo flujo laminar y mechero.

### 2.6.5.2. Recuento de bacterias heterótrofas en placa

Aproximadamente 1 g de mata microbiana se diluyó en 9 mL de agua de mar filtrada y esterilizada y se homogeneizó en vortex durante 5 min y 30 segundos.

La siembra se realizó bajo flujo laminar vertical (EUROCLONE-BIOAIR, modelo: AURA MINI), homogeneizando primero cada tubo con micropipeta de 1000  $\mu$ L y se realizaron diluciones seriadas ( $10^4$ ) (Fig. 2.8). Se inocularon 100  $\mu$ l de la dilución final en una placa con TSA y se esparció por toda la placa con una espátula de Drigalsky. Se dejó reposar unos minutos hasta la absorción total del inóculo.

Las placas se incubaron en posición invertida a 27° C en estufa de cultivo (San Jor, serie SL DB). Luego de 48 horas se procedió al recuento diario de colonias durante 5 días. Los resultados se expresaron en UFC/g.

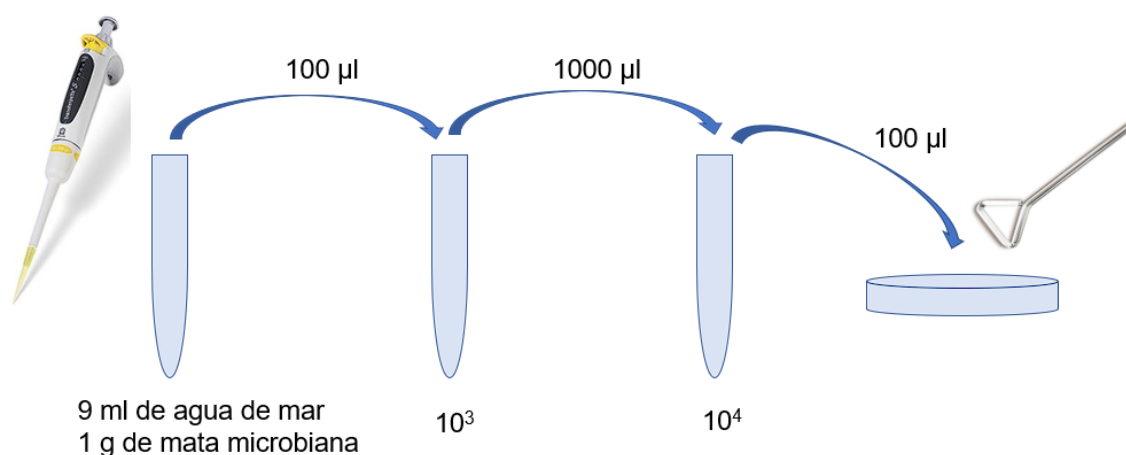


Fig. 2.8. Diluciones seriadas para la siembra en placa de Petri con TSA.

### 2.6.5.3. Caracterización de bacterias heterótrofas

Luego del recuento de bacterias heterótrofas, se aislaron las colonias usando un asa metálica esterilizada bajo llama, las colonias se extrajeron y se esparcieron con

movimientos en zigzag sobre la superficie de una nueva placa con TSA (Figs. 2.9 a y b).

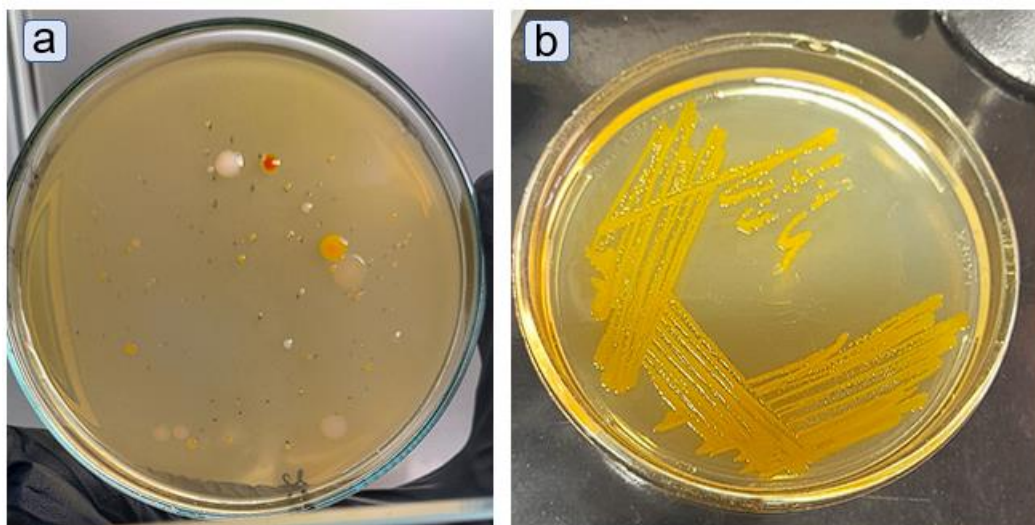


Fig. 2.9. a) Placa con varias colonias de bacterias heterótrofas empleada para el recuento. b) Placa generada a partir del aislamiento de una colonia

Para la caracterización de las bacterias heterótrofas se llevó a cabo la coloración de Gram en algunas de las colonias que crecieron en la placa de recuento, así como en todas las colonias aisladas, utilizando un kit de tinción comercial (marca Britania). El procedimiento se realizó en mesada al lado de un mechero y con un asa metálica esterilizada se esparció una colonia sobre un portaobjetos. Se calentó suavemente el portaobjeto (del lado contrario a los microorganismos esparcidos) para fijar las bacterias en el portaobjetos y evitar que se desprendan durante el proceso de tinción. Luego se procedió a una serie de tinciones y enjuagues:

1. Se cubrió el extendido con violeta de Gram y se dejó actuar 20 segundos.
2. Se lavó suavemente con agua corriente durante 10 segundos para eliminar el exceso de colorante.
3. Se cubrió con Lugol y se dejó actuar 30 segundos.

4. Se lavó con agua corriente durante 10 segundos para eliminar el exceso de Lugol.
5. Se cubrió con decolorante para Gram y se dejó actuar 10 segundos.
6. Se lavó con agua corriente durante 10 segundos para detener la acción del decolorante.
7. Se cubrió con safranina para Gram (colorante rojo) y se dejó actuar 20 segundos.
8. Se lavó con agua corriente durante 10 segundos para eliminar el exceso de safranina.

Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente bajo flujo laminar. Mediante la visualización de los preparados en microscopio óptico bajo un aumento total de 1000x se determinó si las colonias estaban formadas por bacilos o cocos y si eran Gram positivos (color violeta oscuro o azul) o Gram negativos (color rojo o rosa).

### 2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO GENERALES

Los programas informáticos empleados para el análisis de los datos fueron R studio (Team 2021), Statistica 8.0 (StatSoft, Inc, 2007) y PRIMER versión 6.0 (Clarke y Warwick, 2001).

Todos los valores medios mostrados en esta tesis se acompañan con su error estándar (EE). La normalidad y homocedasticidad de los datos se comprobó gráficamente con Normal Q-Q plot y prueba de Levene, respectivamente (Residuals vs Fitted) (Andina, 2018). Las variables que cumplieron con dichos supuestos fueron comparadas con análisis de varianza (ANOVA) simple o doble, según corresponda, para evaluar diferencias significativas entre el control y los tratamientos de cada ensayo. Se realizaron pruebas LSD Fisher para las comparaciones *a posteriori* cuando se encontraron diferencias significativas en las pruebas ANOVA ( $p < 0,05$ ). Las variables que no seguían una distribución normal se transformaron con la función adecuada para cada conjunto de datos (recíproca, logarítmica, raíz cuadrada, raíz

cúbica). Si la variable transformada no cumplía con los supuestos se analizó con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis o mediante el uso de modelos lineales generalizados (GLM).

En el caso de las variables mostradas en porcentajes (%) siempre fueron analizadas con un GLM de distribución beta. Se utilizaron las pruebas de Tukey para las comparaciones *a posteriori*. Los paquetes utilizados para dichos modelos fueron glmmTMB (Magnusson et al., 2017) y lsmeans (Lenth y Lenth, 2018).

Se evaluó similitudes en la estructura de la comunidad microfitobentónica con las pruebas ANOSIM. Para dichos análisis, se transformaron los datos con raíz cuadrada y se emplearon matrices de similitud de Bray Curtis. El valor del estadístico R de la prueba ANOSIM se encuentra dentro del rango (-1,1), un valor aproximado a cero indicará mayor similitud entre tratamientos.

## CAPÍTULO 3

### CARACTERIZACIÓN DE LAS MATAS MICROBIANAS DE PUERTO CUATREROS

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

El **microfitobentos (MPB)** marino es una comunidad fototrófica presente en ecosistemas bentónicos intermareales y neríticos. El MPB desempeña un papel fundamental en la productividad primaria total de estuarios y otros ecosistemas costeros, al mediar en el reciclado de nutrientes y contribuir a la estabilización de los sedimentos. Las diatomeas y las cianobacterias son las principales constituyentes de estas comunidades intermareales (Cartaxana et al., 2016; Fernández et al., 2021).

El éxito del MPB en sistemas intermareales se ha relacionado con su **motilidad celular**, que les permite buscar condiciones ambientales óptimas en relación con parámetros cruciales como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Durante las mareas bajas diurnas, las microalgas realizan una **migración ascendente** en el sedimento hasta alcanzar la zona fótica. Antes de la inundación por las mareas o durante la oscuridad realizan una **migración descendente** para reducir la exposición de las células a la depredación o a las alteraciones físicas, además de facilitar la absorción de nutrientes y carbono, así como la división celular (Cartaxana et al., 2016).

Las cianobacterias se adhieren a las superficies con granos de arena y comienzan a secretar EPS y modificar el microambiente (como se describió en el Capítulo 1, ítem 1.1) para la posterior colonización de bacterias más especializadas y con requerimientos ambientales más específicos (Noffke, 2010; Prieto-Barajas et al., 2018). Inicialmente se forma una fina biopelícula, llamada **biofilm**, y posteriormente si las fuentes de nutrientes son abundantes y el sustrato arenoso lo favorece se puede



desarrollar una estructura compleja y laminada denominada **mata microbiana** (Cuadrado et al., 2014; Noffke et al., 2003; Pan, 2021; Stolz, 2000). Estas estructuras son recubrimientos orgánicos compuestos por microorganismos del phylum perteneciente al Dominio Bacteria, y en menor medida Archaea y Eukarya, y EPS que son producidas por ellos mismos (Noffke et al., 2003; Prieto-Barajas et al., 2018).

Las **EPS** son una mezcla compleja de polímeros hidratados de alto peso molecular que consisten principalmente en polisacáridos, aproximadamente el 90%, y una proporción menor de proteínas y ADN (Férrandez et al., 2021; Steinberger y Holden, 2005). Estas sustancias forman una densa red en la que quedan embebidos los microorganismos junto con partículas de sedimento y MO (Seckbach y Oren, 2010; Stal, 2012). Desempeñan un rol fundamental tanto durante la migración de las microalgas a través del sedimento como en la retención de nutrientes y agua. Cumplen un papel protector contra la deshidratación, la radiación UV, la fagocitosis, las toxinas y los contaminantes (Férrandez et al., 2021; Steinberger y Holden, 2005). Además, las EPS integran las vainas mucilaginosas de muchas especies de cianobacterias (*Lyngbya*, *Schizothrix*, *Phormidium*, entre otras) y estas vainas, al ser recalcitrantes a los agentes microbianos, se pueden encontrar vacías en la profundidad de la mata microbiana (Cuadrado, 2020; Pan, 2021).

Los componentes sólidos de las matas microbianas pueden clasificarse en tres grandes clases: **mineral** (arena, limo, arcilla y óxidos), **material orgánico** (ácidos húmicos, péptidos y sacáridos) y **material biológico** (microorganismos) (Ferreyroa, 2015). Las especies de cianobacterias predominantes y las estructuras que desarrollan varían según el relieve topográfico (submareal, intermareal y supramareal) y las condiciones hidrodinámicas del ambiente (Maisano, 2019). Según Noffke (2010) en la zona intermareal inferior, se suele observar una estructura tipo

biofilm, mientras que en la zona intermareal superior crecen matas microbianas estacionales y en la zona supramareal inferior se forman matas microbianas con mayor grado de desarrollo y son perennes.

Las matas microbianas albergan una amplia diversidad de microorganismos fotosintéticos dispuestos de manera estratificada debido a los gradientes de luz, oxígeno y sulfuro presentes en su entorno (Stal, 2012). La parte superior de la mata microbiana es una capa óxica que suele comenzar por una fina lámina de **diatomeas** (Phylum Bacillariophyta, Clase Bacillariophyceae), las cuales son las únicas representantes del dominio Eukarya (Pan et al., 2019). Por debajo de ellas se encuentran un conjunto de bacterias fotoautótrofas Gram negativas conocidas como **cianobacterias** (Phylum Cyanobacteria, Clase Cyanophyceae/Oxyphotobacteria), uno de los grupos incluidos en el Dominio Bacteria. Ambos grupos utilizan principalmente la clorofila *a* como pigmento fotosintético para captar la energía lumínica y utilizan agua como donante de electrones durante la fotosíntesis. El tipo de fotosíntesis que realizan es oxigénica, es decir liberan oxígeno como subproducto durante este proceso. Las cianobacterias fueron las responsables de crear nuestra atmósfera oxigenada a través de sus actividades fotosintéticas y fueron los primeros organismos en utilizar dos fotosistemas (fotosistemas I y II) (Kamal y Ahmad, 2014).

En la parte más profunda de la capa óxica de la mata microbiana, se encuentran las **bacterias púrpuras del azufre** (Dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, Clase Alphaproteobacteria) debido a que pueden crecer y prosperar en ambientes con baja o nula concentración de oxígeno (Goericke, 2002; Pan et al., 2019). La parte inferior de las matas microbianas es la capa reductora anóxica que se visualiza como un estrato de sedimento negro, donde se encuentran las **bacterias verdes del azufre** (Dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria) y la mayor

cantidad de **bacterias reductoras de sulfato** (Dominio Bacteria, Phylum Desulfobactereota, Clase Deltaproteobacteria) (Pan et al., 2019). Tanto las bacterias púrpuras como las verdes realizan una fotosíntesis anoxigénica y sus principales pigmentos fotosintéticos para captar la luz solar son las bacterioclorofilas (a, b, c, d, e y g) (Goericke, 2002; Stal, 2012). Pueden utilizar compuestos que contienen azufre, como el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), en lugar de agua, como donante de electrones en el proceso de fotosíntesis (Goericke, 2002). A lo largo de todo el sedimento, incluso cerca de las cianobacterias también pueden encontrarse las bacterias reductoras de sulfato, microorganismos heterótrofos que reducen el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) en condiciones anaeróbicas hasta  $\text{H}_2\text{S}$  (Sacaca Cuellar, 2013).

El objetivo de este capítulo fue realizar la caracterización biogeoquímica de las matas microbianas de Puerto Cuatrerros que se emplearán en los ensayos de remoción de metales.

### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de matas microbianas de Puerto Cuatrerros para la descripción cualitativa de diatomeas y cianobacterias, y para análisis de granulometría, DRX, SEM-EDS, ATR-FTIR y XPS (protocolos de muestreo y análisis detallados en el Capítulo 2, ítems 2.4 y 2.5.4 - 2.5.8). Se separaron las diatomeas y cianobacterias del sedimento mediante las técnicas explicadas en el Capítulo 2, ítem 2.6.2.1 y 2.6.2.2 y se identificaron por observaciones directas en microscopio óptico y con la bibliografía detallada en el Capítulo 2, ítem 2.6.2.

Para los análisis SEM-EDS, DRX, ATR-FTIR y XPS se realizaron cortes paralelos a la superficie de la mata a diferentes profundidades (Fig. 3.1). Para SEM-EDS se analizó la capa superficial (0-2 mm) vista desde la superficie como se indica en la Fig.

3.1, mientras que para DRX, ATR-FTIR y XPS se analizó la capa superficial y profunda (4-6 mm).

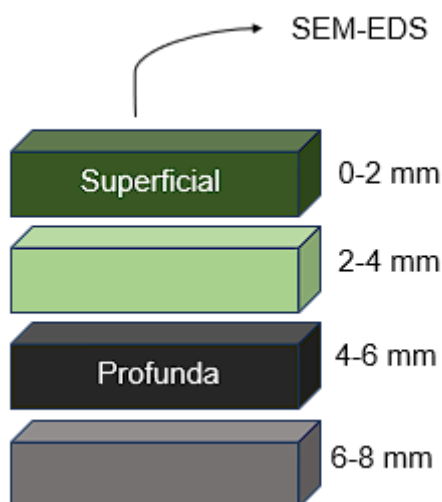


Fig. 3.1. Representación esquemática de los cortes realizados a las matas microbianas para análisis de SEM-EDS, DRX, ATR-FTIR y XPS.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Composición biológica

Las matas microbianas pueden ser reconocidas a simple vista en la planicie de marea de Puerto Cuatrerros por la coloración marrón-dorada dada por la acumulación de diatomeas en la superficie del sedimento y por la formación de diversas estructuras como grietas, pliegues, burbujas y domos (Fig. 3.2). Se forman grietas de desecación o contracción debido a la exposición de las matas microbianas a la radiación solar durante varios días (Fig. 3.2 a). Las grietas vuelven a recolonizarse biológicamente con posterioridad a un evento de inundación. Los pliegues se forman mediante una serie de procesos hidrodinámicos que hacen que las matas se des sequen y se rehidraten a medida que se desprenden del sedimento subyacente (Fig. 3.2 b) (Cuadrado et al. 2014; Pan, 2021). Las burbujas y domos son generados por los gases liberados ( $O_2$ ) durante el metabolismo fotosintético de las microalgas (Figs. 3.2 c y d) (Cuadrado, 2017).

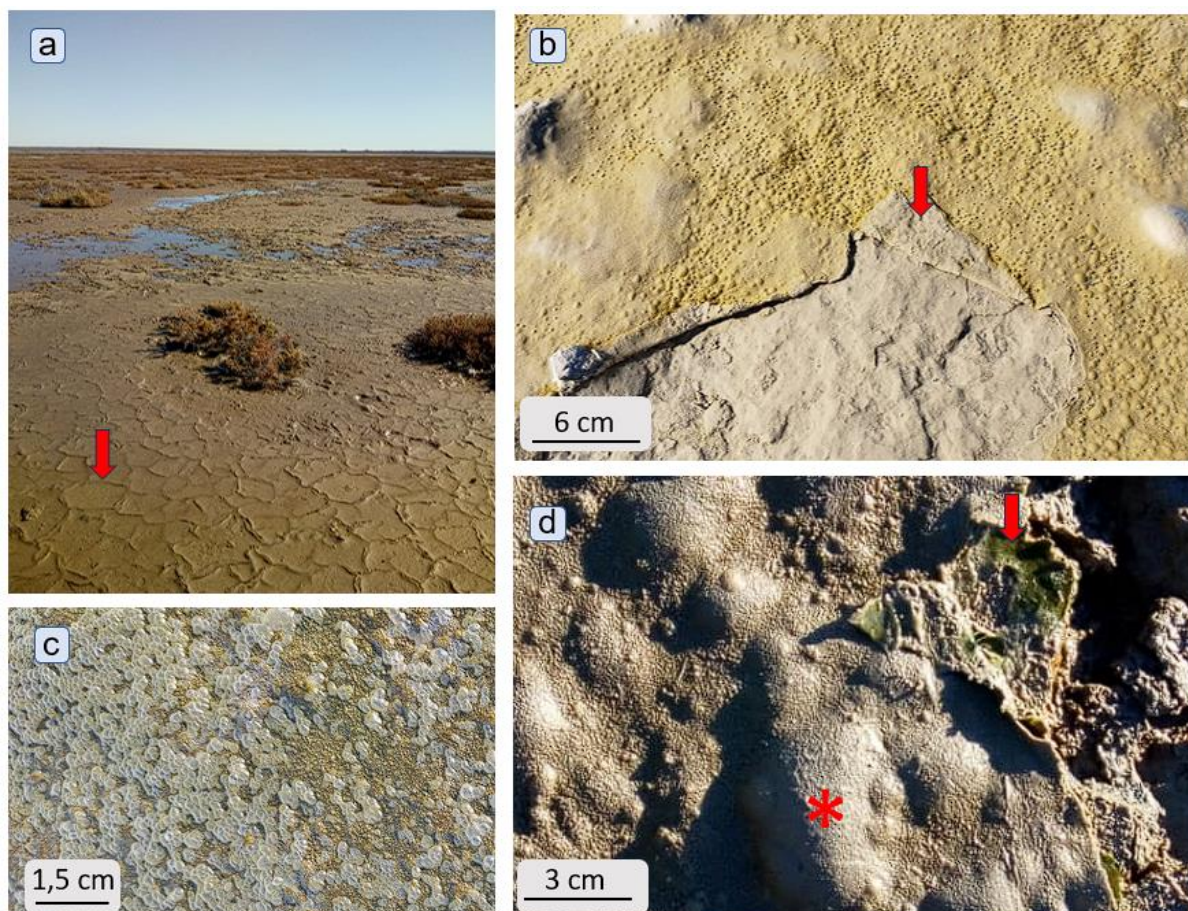


Fig. 3.2. Imágenes de diferentes estructuras en las matas microbianas formadas en la planicie de marea de Puerto Cuatros. a) Grietas de desecación. b) Pliegues. c) Burbujas de gas. d) Domos de gas (asterisco) y estrato de coloración verde dado por las cianobacterias (flecha).

En ocasiones, al retirar la primera lámina superficial de la mata microbiana, que mide aproximadamente 1 mm, se puede observar una coloración verdeazulada dada por la mayor acumulación de cianobacterias (Fig. 3.2 d).

La Fig. 3.3 a, muestra la distribución vertical de los diferentes componentes observados en la mata microbiana de Puerto Cuatros y su distribución dentro de la misma. La capa óxica de las matas, que oscila entre 0,2 - 0,4 cm de profundidad, puede presentar una coloración marrón-dorada, debido a la migración de diatomeas a la superficie, o verdeazulada, debido a una mayor abundancia de cianobacterias en superficie. En cambio, la capa anóxica es visualizada por sedimentos negros y se encuentra entre 0,4 - 1 cm de profundidad (Figs. 3.3 b y c). En esta capa anóxica se



pueden observar las vainas vacías de cianobacterias descritas por Pan (2021). En la Fig. 3.3 d se muestra la apariencia mucilaginosa de la superficie de la mata microbiana producto de las EPS que la cubren. Estas EPS forman una barrera hidratada que separa a las células del entorno exterior (Steinberger y Holden, 2005).

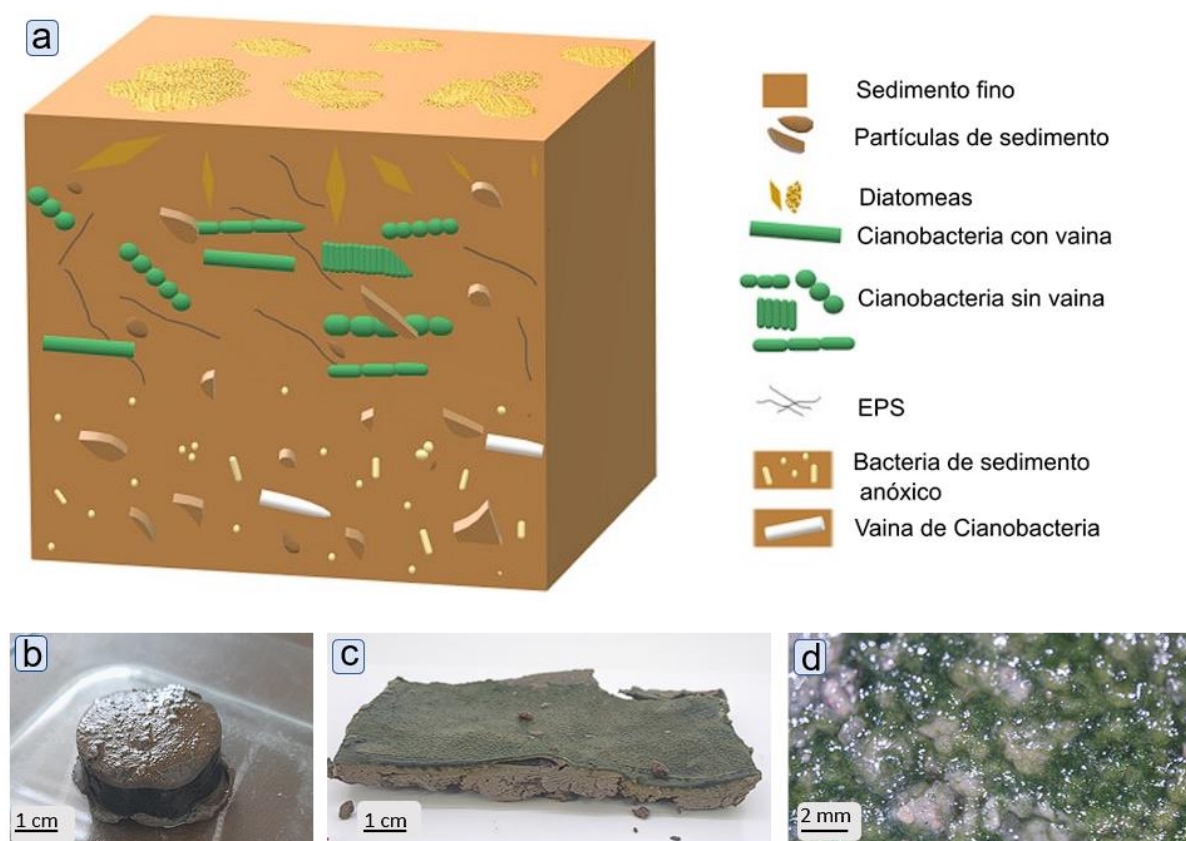


Fig. 3.3. a) Representación gráfica de la estructura y composición de la mata microbiana. b y c) imágenes de la superficie y del perfil de las matas microbianas. d) Imagen de la superficie de la mata microbiana de la figura c observada bajo lupa.

La observación de las matas microbianas en microscopio electrónico de barrido permitió identificar la matriz de EPS, detritos y partículas de sedimento en la que están inmersas las cianobacterias filamentosas, y las diatomeas pennadas y centrales (Figs. 3.4 a-d). Se pudieron registrar fotomicrográficas de numerosos filamentos de la cianobacteria *Coleofasciculus chthonoplastes* (Gomont) M. Siegesmund, J.R. Johansen & T. Friedl emergiendo de la matriz mucilaginosa (Figs. 3.4 b y c), varias

zonas de grandes acumulaciones de las diatomeas del género *Nitzschia* (Fig. 3.4 a) y otras zonas con numerosos ejemplares de *Navicula* sp. (Fig. 3.4 b).

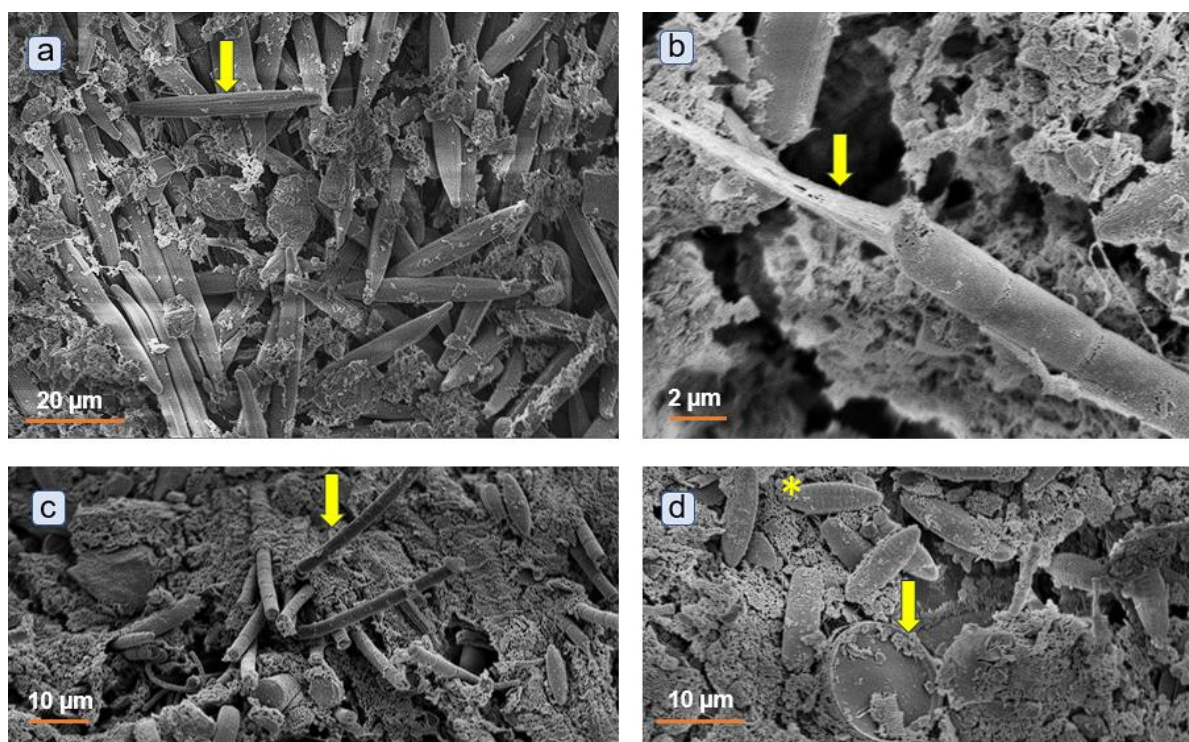


Fig. 3.4. Fotomicrografías de microscopía electrónica de barrido de cortes superficiales de matas microbianas de Puerto Cuatrerros. Las flechas indican a) una diatomea pennada (*Nitzschia* sp.), b) EPS, c) un tricoma de una cianobacteria filamentosa (*C. chthonoplastes*) y d) una diatomea central junto a otras diatomeas pennadas (*Navicula* sp. indicada con un asterisco).

Durante los análisis cuantitativos de la comunidad microfítobentónica en muestras de campo, las cianobacterias filamentosas fueron el grupo dominante en todas las muestras analizadas (n=39). Se destacó la presencia de *C. chthonoplastes* (Fig. 3.5), asimismo se observó la presencia de representantes de los géneros *Spirulina*, *Phormidium*, *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*, *Romeria* y *Schizothrix* (Figs. 3.6 a-e). Entre las diatomeas, el grupo más representativo fue el de las diatomeas pennadas en el rango de tamaño 40 - 100 µm, siendo *Nitzschia* el género mejor representado (Fig. 3.6 a). Dentro del rango de tamaño <40 µm, se encontró menor abundancia pero más diversidad de géneros, entre ellos fueron registrados *Navicula*, *Ephitemia*, *Rhopalodia*, *Amphora* y *Cymbella* (Figs. 3.7 b-e). También se observaron

representantes de las diatomeas centrales, aunque probablemente estén presentes en las matas microbianas principalmente por la sedimentación de la columna de agua, ya que este grupo es dominante en el fitoplancton del estuario de Bahía Blanca (Fernández et al., 2021).

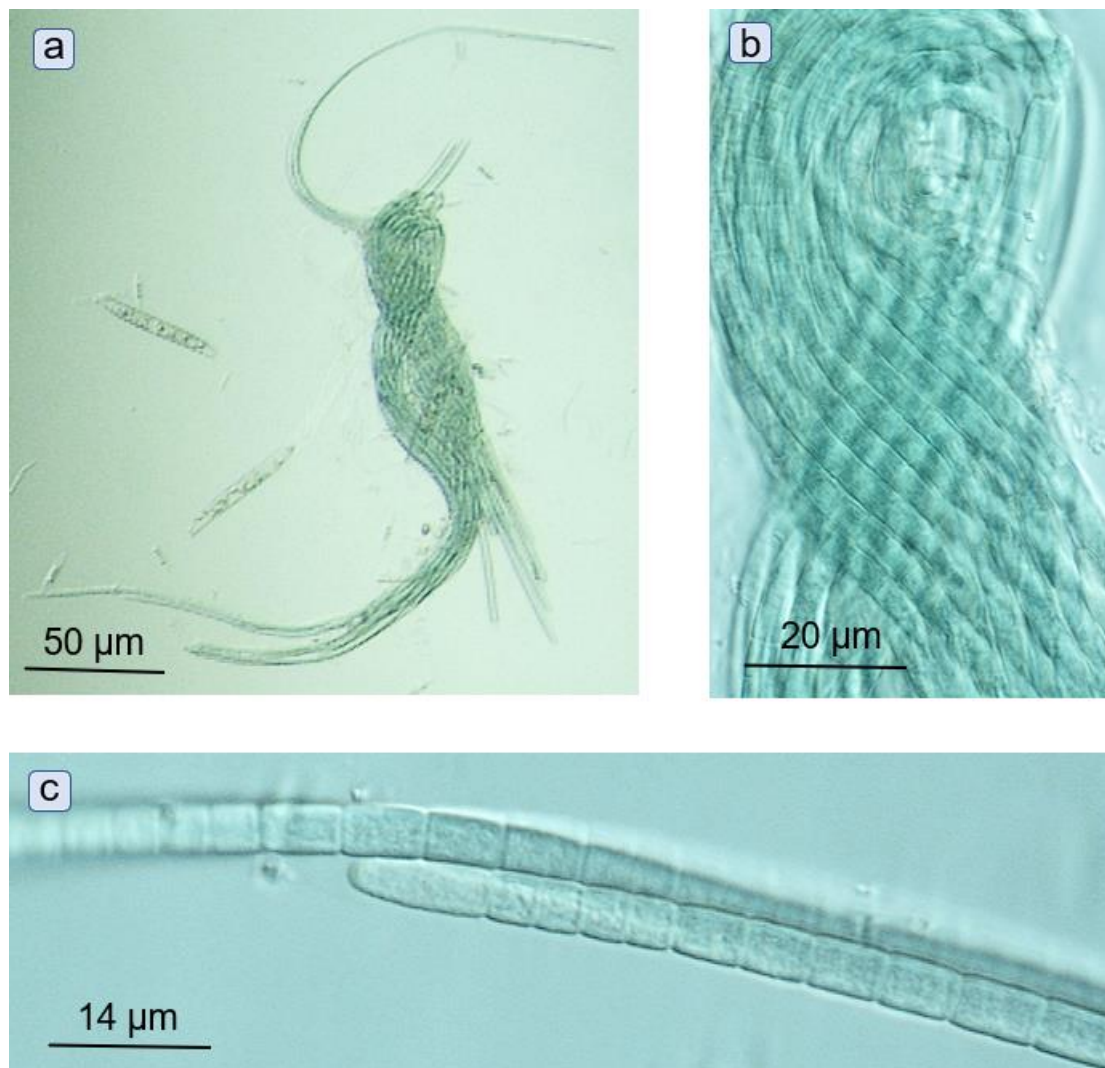


Fig. 3.5. *C. chthonoplastes* vista en diferentes magnificaciones en microscopio óptico a)10X, b) 20X y c) 40X.



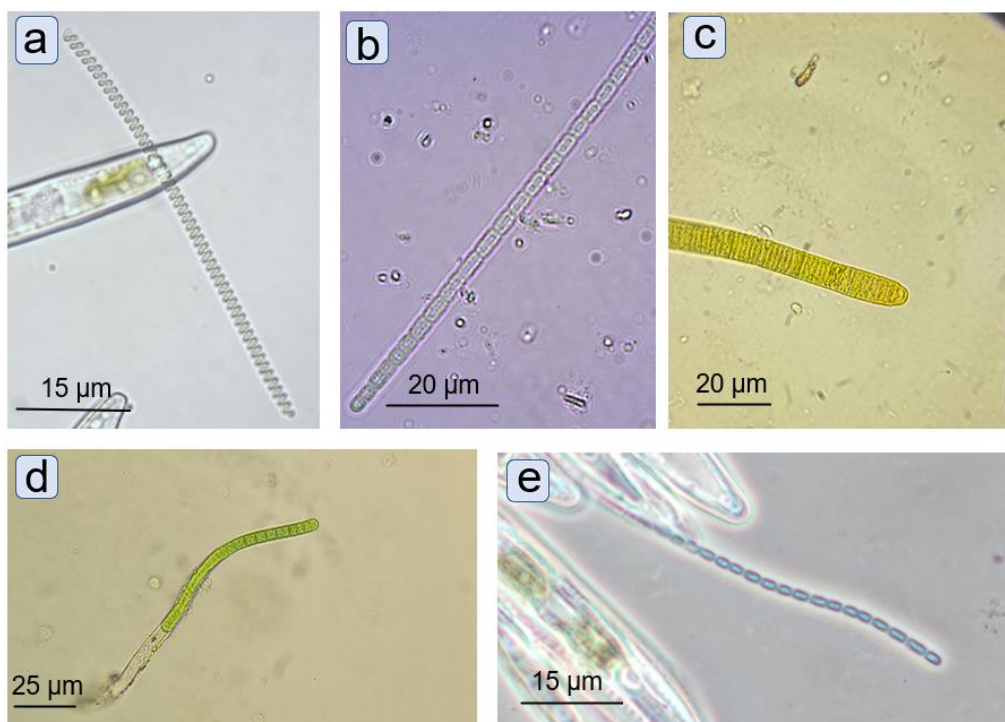


Fig. 3.6. Cianobacterias filamentosas en matas microbianas vistas en microscopio óptico. a) *Spirulina subtilissima*, b) *Phormidium nigroviride*, c) *Oscillatoria limosa*, d) *Phormidium corium*, e) *Pseudanabaena* sp.

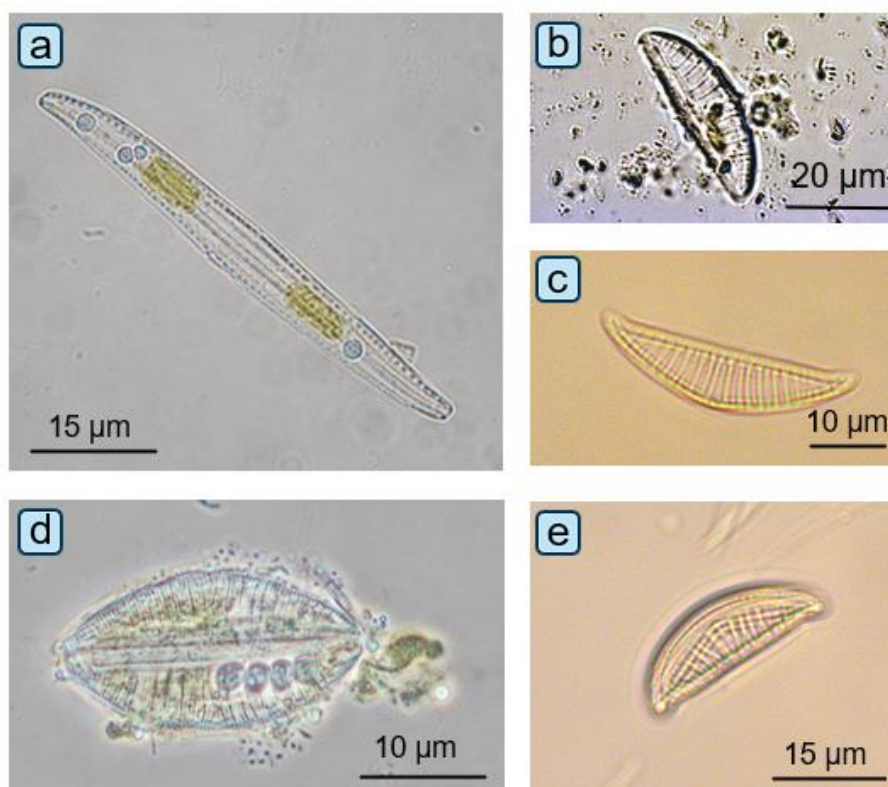


Fig. 3.7. Diatomeas en muestras de matas microbianas vistas en microscopio óptico. a) *Nitzschia clausii*, b y c) *Rhopalodia* sp., d) *Amphora* sp., e) *Ephitemia* sp.

### 3.3.2. Composición mineral por granulometría y DRX

La composición granulométrica de las matas microbianas (n=14) de Puerto Cuatrerros fue limo-limosa. La fracción predominante fue la fina (<63  $\mu\text{m}$ ) que representó el  $80,41 \pm 1,57\%$ . Grecco et al. (2011) también determinó que más del 80% de las partículas de sedimento presentaban un tamaño menor a <63  $\mu\text{m}$  en puertos y marismas cercanas al complejo petroquímico ubicado en proximidad al área de estudio. La mayor presencia de este tamaño de partícula es beneficioso para el secuestro de metales debido a que las partículas de menor tamaño tienen mayor superficie disponible para la adsorción (Sandoval, 2006; Watermann et al., 1999). En dicha fracción la mayor proporción correspondió al limo, con valores del 56,40 al 78,10%, mientras que las arcillas fueron menos predominantes y sus valores variaron del 3,80 al 9,30%. La proporción de arena fina y muy fina (rango de tamaño entre 63-500  $\mu\text{m}$ ) fue del 12,60 al 39,72%. La variación del tamaño de grano es usual en este tipo de ambiente debido a la gran amplitud de la planicie de marea y al transporte, agregación y deposición de sedimentos en suspensión (Botté et al., 2010; Simonetti et al., 2017).

Con respecto a la estructura cristalina y la composición química, es posible agrupar a los minerales en diversas categorías. Entre ellas se encuentran los silicatos cristalinos no arcillosos y arcillosos, silicatos amorfos, carbonatos, sulfatos, fosfatos, óxidos e hidróxidos, entre otros (Imbellone et al., 2017). La composición cristalina de las matas microbianas tanto en la capa superficial (0-2 mm) como la capa profunda (4-6 mm) estuvo representada principalmente por silicatos cristalinos no arcillosos (cuarzo y plagioclasa) y, en menor medida, por silicatos cristalinos arcillosos y calcita (Fig. 3.8).

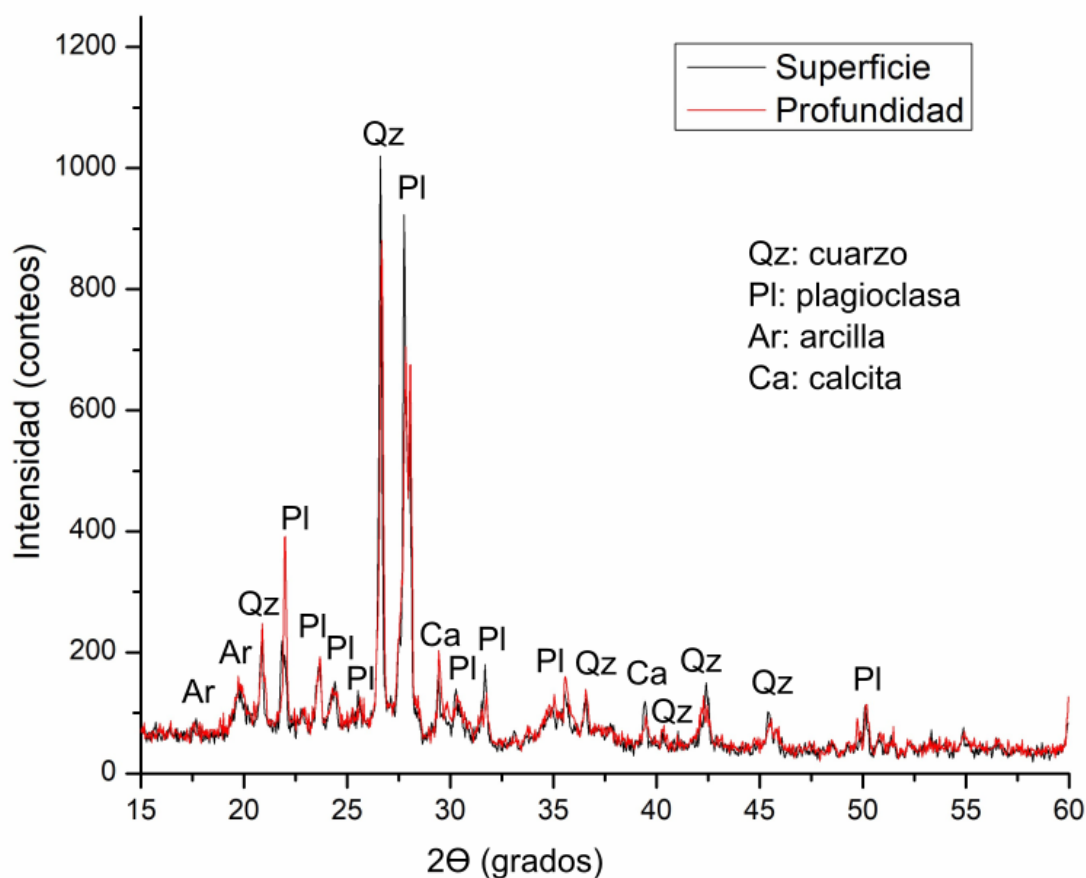


Fig. 3.8. Difracción de rayos X en la capa superficial y profunda de las matas microbianas de Puerto Cuatros.

Los picos de **cuarzo -  $\text{SiO}_2$**  corresponden al cuarzo presente en el sedimento, ya que las diatomeas están constituidas por sílice amorfa, es decir, sin estructura cristalina (Lopez et al., 2005). Los minerales amorfos presentaron un pico típico que no se observa en el diagrama de DRX, lo cual podría explicarse a que la concentración de sílice amorfa es menor al límite de detección del equipo (2%). Se identificó la presencia de **anortita -  $\text{Ca}(\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_8)$**  entre las plagioclasas, de **illita -  $(\text{K},\text{H}_3\text{O})\text{Al}_2\text{Si}_3\text{AlO}_{10}(\text{OH})_2$**  entre las arcillas y de **calcita -  $\text{Ca}(\text{CO}_3)$**  entre los minerales carbonáticos. Otros autores encontraron mayor variedad de minerales en sedimentos del estuario de Bahía Blanca, ya que, además de cuarzo, illita y calcita, indicaron la presencia de Ca-Montmorillonita, albita y halita (Reinoso et al., 2020).

La illita junto a la montmorillonita pertenecen a los **alúminosilicatos** dioctaédricos, los cuales son componentes minerales que controlan en gran medida las características más importantes de muchos suelos y sedimentos, como por ejemplo, la estructura, permeabilidad, hinchamiento, intercambio catiónico, amortiguación del pH, retención de micronutrientes o contaminantes (Fernandes y Baeyens, 2019). Sus propiedades de intercambio iónico, gran área superficial y carácter hidrófilo, los hacen aptos para la extracción de metales provenientes de efluentes de aguas residuales (Burakov et al., 2018; Chakraborty et al., 2015).

Las **arcillas** poseen una capacidad de adsorción mayor que muchos otros minerales debido a las cargas negativas que rodean a la partícula que hacen posible la remoción de los cationes metálicos presentes en la solución acuosa por medio de intercambio iónico, adsorción o ambos procesos (García-Sánchez, 2021). Debido a estas propiedades únicas, los sistemas basados en arcilla se usan comúnmente para la remediación de suelos y aguas contaminadas (Fernandes y Baeyens, 2019).

### **3.3.3. Grupos funcionales presentes en las matas microbianas de Puerto Cuatrerros**

En los espectros de ATR-FTIR realizados sobre las muestras se pueden observar los grupos funcionales presentes en la superficie y en la profundidad de las matas microbianas de Puerto Cuatrerros (Fig. 3.9). Las señales entre 3000 y 3600  $\text{cm}^{-1}$ , únicamente evidentes en la capa superficial, podrían corresponder a grupos **amidas (-C=N)** de proteínas y/o a **hidroxilos (-OH)** de polisacáridos derivados del EPS y de la biomasa de la mata microbiana (Braissant et al., 2009; Forero-López et al., 2022; Oliveira et al., 2014).

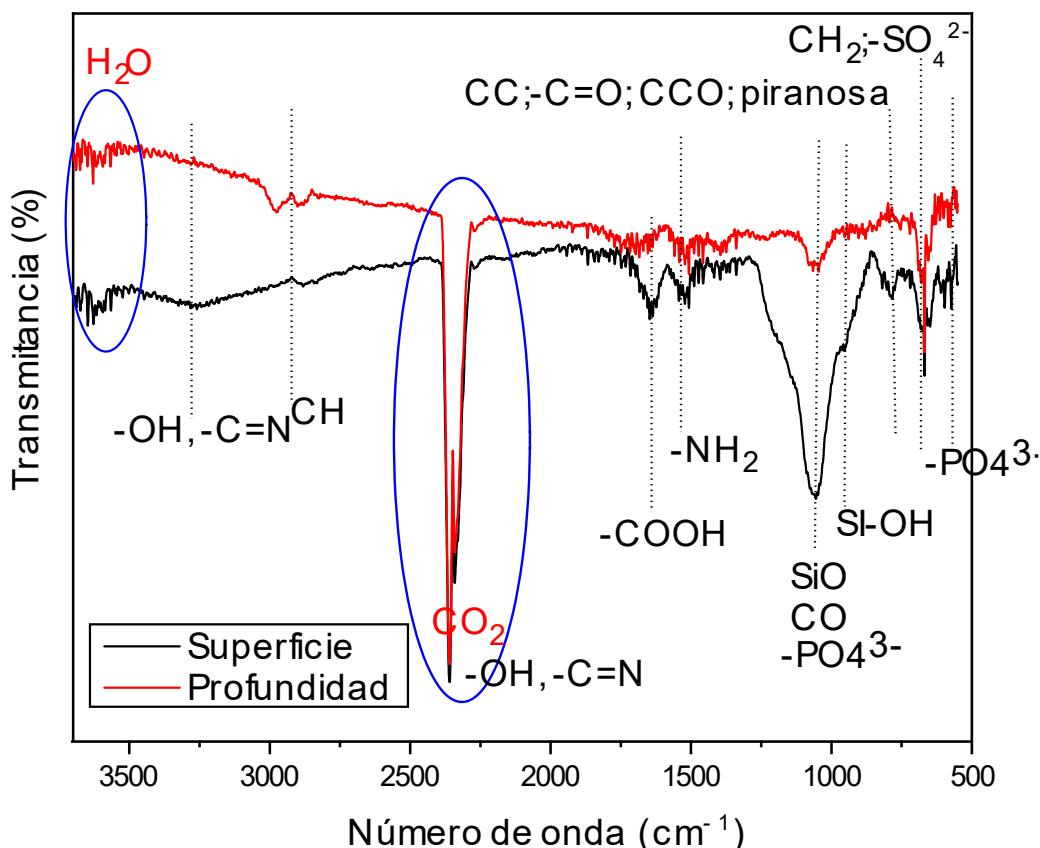


Fig. 3.9. Espectros de ATR-FTIR de la capa superficial y profunda de la mata microbiana de Puerto Cuatros.

Los dos picos ubicados entre los 2825 y 2975  $\text{cm}^{-1}$ , los cuales fueron más pronunciados en la capa profunda, podrían representar **enlaces C-H** de los polisacáridos (Braissant et al., 2009). El pico registrado entre los 2394 y 2280  $\text{cm}^{-1}$  puede estar asociado a la captura de  $\text{CO}_2$  ya que, como se pudo observar en la Fig. 3.2 d, la mata microbiana presenta una estructura porosa lo que permite el flujo de aire por poros de difusión (Casco et al., 2014; Larkin, 2018). Sin embargo, Braissant et al. (2009) observaron el mismo pico al analizar el EPS aislado de matas microbianas y lo atribuyeron a la señal de -OH y a uniones -C=N de las EPS.

El pico localizado entre 1584 y 1721  $\text{cm}^{-1}$  podría corresponder a los dobles enlaces de los grupos **carbonilo (-C=O)** presentes en los grupos funcionales **carboxilos (-**

**COOH**) de polisacáridos y aminoácidos (Baysal, 2023; Fu et al., 2021; Oliveira et al., 2014). Por otro lado, el pico ubicado entre 1487 y 1573  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo **amina -NH<sub>2</sub>**, lo que confirma la presencia de aminoácidos, los cuales se unen a partir de enlaces peptídicos en proteínas y glicoproteínas (Oliveira et al., 2014).

Las señales detectadas en la superficie de la mata a  $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$  pueden corresponder a **enlaces Si-O**, que se asocia a residuos de minerales arcillosos, a la presencia de sulfatos y a los frústulos de las diatomeas (Braissant et al., 2009; Forero-López et al., 2022). El pico en torno a  $\sim 1054 \text{ cm}^{-1}$  fue más pronunciado en la superficie de la mata y se lo atribuye a las vibraciones de estiramiento C-O de los carbohidratos (Braissant et al., 2009). Los grupos **fosfatos -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>** podrían estar solapados con el pico de C-O y Si-O, ya que presentan un pico fuerte a  $1030 \text{ cm}^{-1}$  y un pico secundario a intensidad mediana a los  $570 \text{ cm}^{-1}$ . Los compuestos **silanol Si-OH** (óxido de silicio unido por enlace simple a un hidroxilo) presentan un pico en  $940 \text{ cm}^{-1}$ . La señal que aparece en  $616 \text{ cm}^{-1}$  en la capa superficial corresponde a polisacáridos, como los anillos de piranosa, y los grupos funcionales **sulfato (-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)** (Oliveira et al., 2014), sin embargo, no se observó en la capa profunda de la mata.

La mayoría de las señales en el espectro de la capa superficial mostraron picos más pronunciados en comparación con la capa profunda. Este hallazgo confirma la presencia de una mayor diversidad de microorganismos, incluyendo la comunidad microfitobentónica, en la superficie de la mata microbiana (Pan et al., 2019; Stal, 2012).

### 3.3.4. Composición elemental por SEM-EDS

La Fig. 3.10 muestra una fotomicrografía de un área de las matas microbianas de Puerto Cuatrerros y los **mapeos** de los elementos detectados en dicha área. La intensidad de color en los mapeos está asociada a una mayor cantidad del elemento en la posición equivalente a la de la fotomicrografía. La composición elemental de las matas microbianas estuvo conformada principalmente por **O<C<Si**. También se encontraron pequeñas cantidades (<1 %p/p) de **P**, el metaloide **As** y metales como **Na, Mg, Ca, K, Al, Fe, Ti y Mo** (Tabla. 3.1).

Las matas microbianas cumplen un rol fundamental en el ciclo biogeoquímico de numerosos elementos como el **C, O y P** ya que los microorganismos que las integran se descomponen en compuestos orgánicos que contienen **P** y contribuyen en la formación y degradación de minerales, como carbonatos, fosfatos y silicatos de suelos y rocas (Gadd, 2010). El **Si** forma parte del frústulo de las diatomeas y de los minerales del sedimento. La mayor proporción de los elementos **O, Si, Al, Ca, y K** corresponden a los minerales cuarzo, anortita e illita (composición elemental previamente mencionada) presentes en el sedimento.

Una capa de **Fe** puede estar presente entre las cianobacterias y las bacterias púrpuras del azufre. Esta capa podría estar formada por oxidación química a partir del oxígeno producido durante la fotosíntesis (Stal, 2012). La reducción de hierro (Fe(III) a Fe(II)) y de otros metales como por ejemplo el manganeso (Mn(IV) a Mn(II)) también ocurre comúnmente en los ambientes marinos. La reducción de hierro es causada por bacterias sulfato reductoras, como *Alteromonas*, *Desulfovibrio* y *Desulfobacter*, y suele ocurrir en asociación con la reducción de sulfato (Oschmann, 2000). Ambas reacciones proveen los precursores para la formación de sulfuro de



hierro (FeS) y pirita (FeS<sub>2</sub>), lo que le da la característica coloración negra o gris a la capa más profunda de la mata microbiana (Stal, 2012).

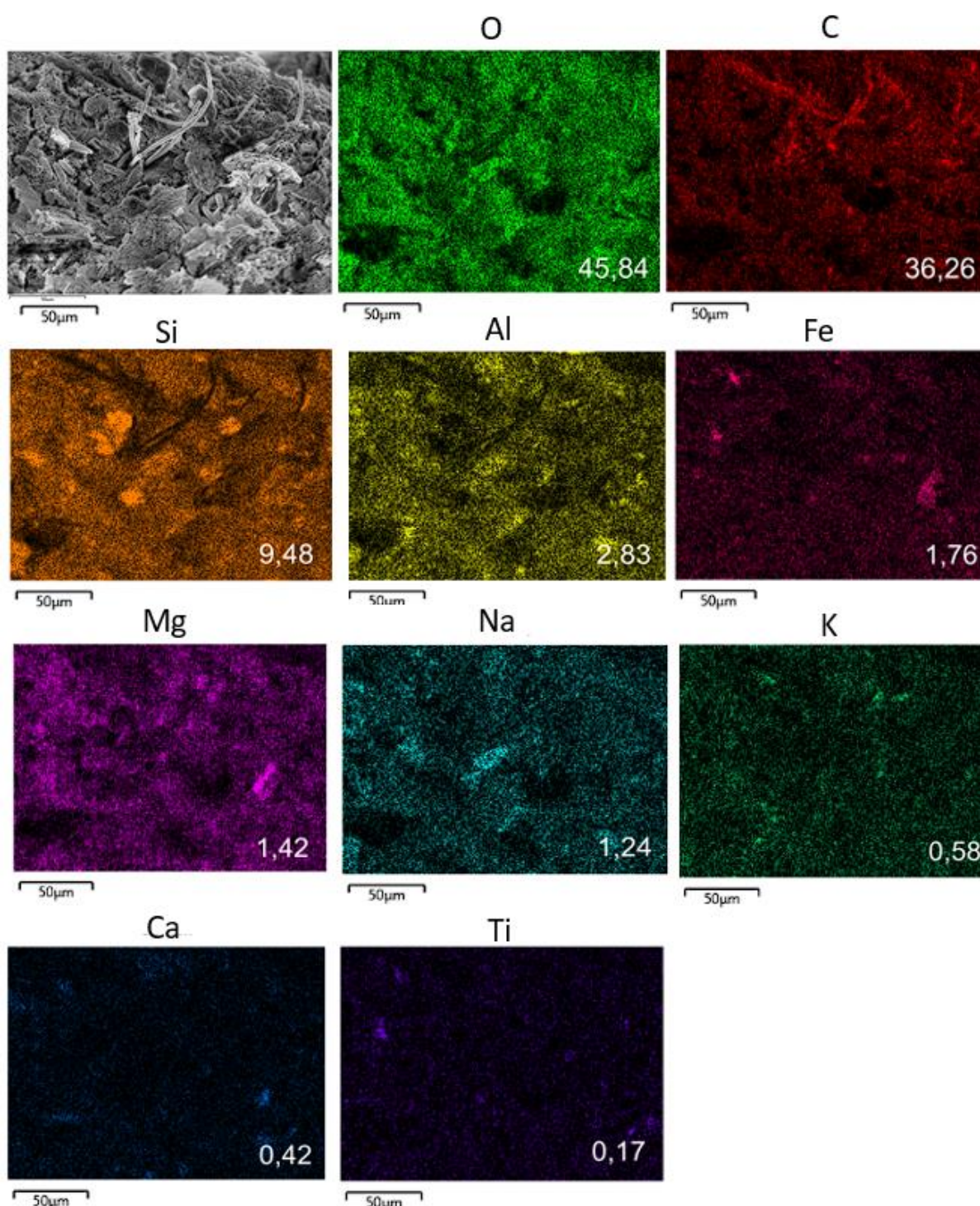


Fig. 3.10. Análisis SEM-EDS en la superficie de las matas microbianas de Puerto Cuatrerros. Mapeos de los elementos en un sitio de la mata y sus valores expresados en porcentaje en peso (%p/p).



Tabla 3.1. Composición elemental de las matas microbianas de Puerto Cuatrerros. La tabla muestra la media  $\pm$  EE de cada elemento en 6 áreas mapeadas de 2 muestras de matas microbianas. Valores medios expresados en porcentaje en peso (%p/p).

Elemento	%p/p
<b>O</b>	47,20 $\pm$ 0,47
<b>C</b>	34,96 $\pm$ 2,42
<b>Si</b>	8,76 $\pm$ 1,32
<b>Al</b>	2,85 $\pm$ 0,40
<b>Mg</b>	1,45 $\pm$ 0,15
<b>Fe</b>	1,42 $\pm$ 0,33
<b>Na</b>	1,07 $\pm$ 0,17
<b>Ca</b>	0,77 $\pm$ 0,07
<b>K</b>	0,62 $\pm$ 0,10
<b>Mo</b>	0,41 $\pm$ 0,13
<b>P</b>	0,33 $\pm$ 0,10
<b>Ti</b>	0,14 $\pm$ 0,03
<b>As</b>	0,07 $\pm$ 0,02

El titanio (**Ti**) es el noveno elemento y el séptimo metal más abundante en la corteza terrestre (0,63% en peso) (Baker, 2018). La señal de Ti observada en el mapeo EDS de las muestras de las matas microbianas podría estar asociada con minerales arcillosos y aluminosilicatos en el sedimento del estuario de Bahía Blanca. Estos minerales pueden ser portadores de Ti estructuralmente sustituido o fases de TiO<sub>2</sub> discretas, pero íntimamente asociadas (Skrabal y Terry, 2002). Usualmente en los sedimentos se forman óxidos de hierro y titanio, como por ejemplo la ilmenita (FeTiO<sub>3</sub>) y el rutilo (TiO<sub>2</sub>) (Franke et al., 2007). Además, el Ti puede provenir de la contaminación ambiental, ya que se aplica ampliamente en estructuras de aeronaves, compuestos de piezas de turbinas, equipos de procesamiento químico, hardware marino y aplicaciones de prótesis y equipos médicos debido a su resistencia a la corrosión (Souza et al., 2021).

La concentración del **Mo** también puede verse incrementada en el ambiente por fuentes antropogénicas ya que es usado como elemento de aleación en el acero, el hierro fundido y las superaleaciones, así como en la industria electrónica (Xu et al., 2013). El **As** se relaciona principalmente a fuentes naturales asociadas a factores geológicos como los procesos de meteorización y erosión. Sin embargo, las actividades humanas también pueden contribuir a su incremento en el ambiente a través de la liberación de desechos industriales o de agroquímicos en la tierra o en el agua (Litter et al., 2010). El registro de la presencia de estos metales y metaloides en las matas microbianas es importante para orientar los objetivos en futuros ensayos de remediación y monitoreo de contaminantes.

### 3.3.5. Especiación química superficial por XPS

La **composición química elemental** de las matas microbianas de Puerto Cuatrerros también fue analizada mediante XPS. El análisis se llevó a cabo en dos capas de las matas, la superficial (0 - 2 mm), donde se encuentran la mayor parte de diatomeas y cianobacterias, y la capa profunda (4 - 6 mm), donde se encuentran principalmente bacterias sulfato reductoras y se visualiza como sedimento negro. En las Figs. 3.11 a y b, se muestran los espectros generales de XPS donde se observa la presencia de señales de O, C, Si, Al, Fe, P y N como elementos constituyentes mayoritarios de la mata microbiana. Otros elementos como Ca, K y Na también fueron detectados pero no fueron analizados en profundidad debido a su baja proporción en las muestras.

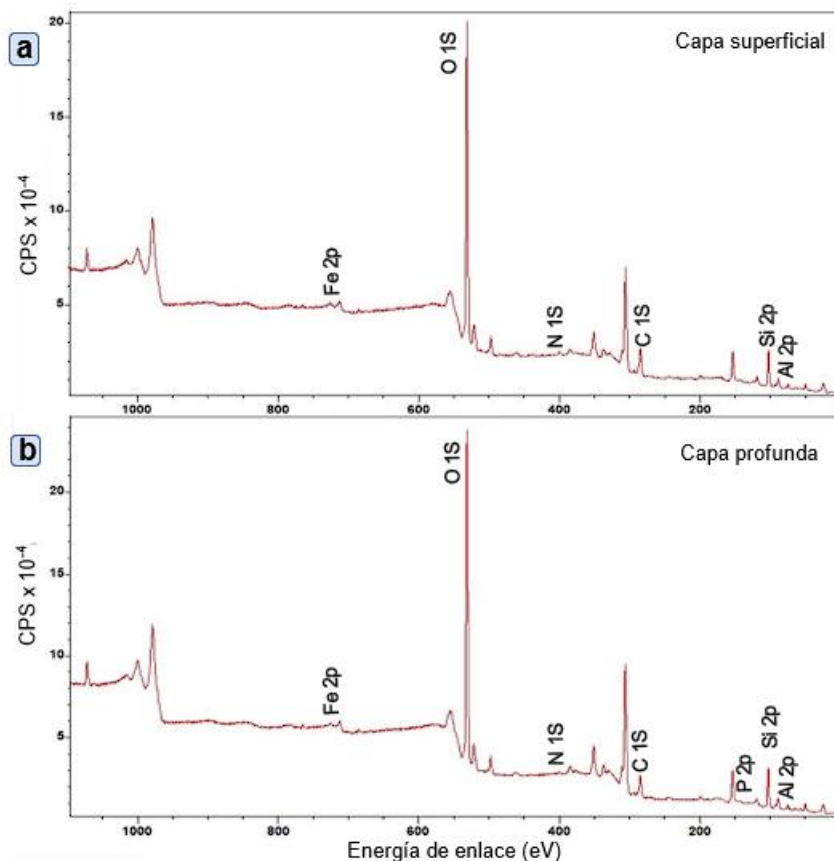


Fig. 3.11. Espectro general de XPS en a) la capa superficial y b) la capa profunda que componen la mata microbiana.

Para un estudio más detallado de los diferentes elementos y su estado de oxidación se obtuvieron los espectros de alta resolución de C1s, O1s, N1s, Al2p, Si2p y Fe2p de las capas superficial y profunda (Fig. 3.12). Los **espectros de alta resolución de C1s** de las dos capas que componen la muestra (Fig 3.12 a) pueden ajustarse en 4 componentes con las siguientes asignaciones: el primer pico a  $\sim 284,4$  eV es asociado a C-H, C-C y C adventicio, mientras que, el pico a  $\sim 284,6$  eV puede estar relacionado con C (N,O), y C-O-C. Finalmente el pico a  $\sim 286,06$  eV corresponde a -C=O, mientras que la última componente a  $\sim 288,5$  eV puede asociarse a  $-\text{COO}^-$  y a metales unidos a carbonatos pertenecientes a aminoácidos y polisacáridos de los microorganismos y EPS (Forero-López et al., 2021; Oliveira et al., 2014; ThermoFisher, 2023; XPSfitting, 2023).

El **espectro de alta resolución del O1s**, para la capa superficial y profunda (Fig. 3.12 b) muestra bastante similitud para ambas capas, formados por componentes relacionados con la presencia de una gran cantidad de grupos químicos que contienen oxígeno. El espectro O1s de la capa se deconvolucionó en tres componentes asociadas a óxidos metálicos ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \sim 530$  eV) y grupos funcionales -C=O, -OH ( $\sim 531,5$  eV). Mientras que la tercera componente se asoció a Si-O y COO aproximadamente a  $\sim 532,2$  eV. Es importante mencionar que la energía de enlace de los fosfatos en el espectro del O puede presentarse aproximadamente entre 530,5 eV y 532,8 eV dependiendo del tipo de catión al que está unido (Moulder, 1992; XPSfitting, 2023).

En la figura Fig. 3.12 c se observan los **picos característicos del Si** (energía de enlace entre los  $\sim 98$  eV y  $\sim 106$  eV) y Al (energía de enlace entre los  $\sim 76,5$  eV y  $\sim 69,5$  eV), y sus espectros de alta resolución fueron deconvolucionados en tres componentes cada uno. El espectro Si2p de la capa superficial exhibe un pico a 101,11 eV asociado a Si orgánico (Si-O-C; Si-N), mientras que los picos a 101,94 eV y 102,37 eV son atribuidos a Si-OH más silicato y aluminosilicatos (Forero-López et al., 2021; XPSfitting, 2023). Asimismo, el Si2p en la capa profunda de la muestra presenta similares energías de enlace relacionadas con silicato (102,28 eV), aluminosilicatos (102,41 eV) y silicio orgánico (100,78 eV) (Fig. 3.12 c). Por otro lado, el **pico Al2p** en la capa superficial se deconvolucionó en los picos a 74,11 eV y 73 eV asociados con  $\text{Al}_2\text{O}_3$  relacionados con aluminosilicatos y Al-OH, respectivamente (Fig. 3. 12 d) (ThermoFisher, 2023; XPSfitting, 2023).

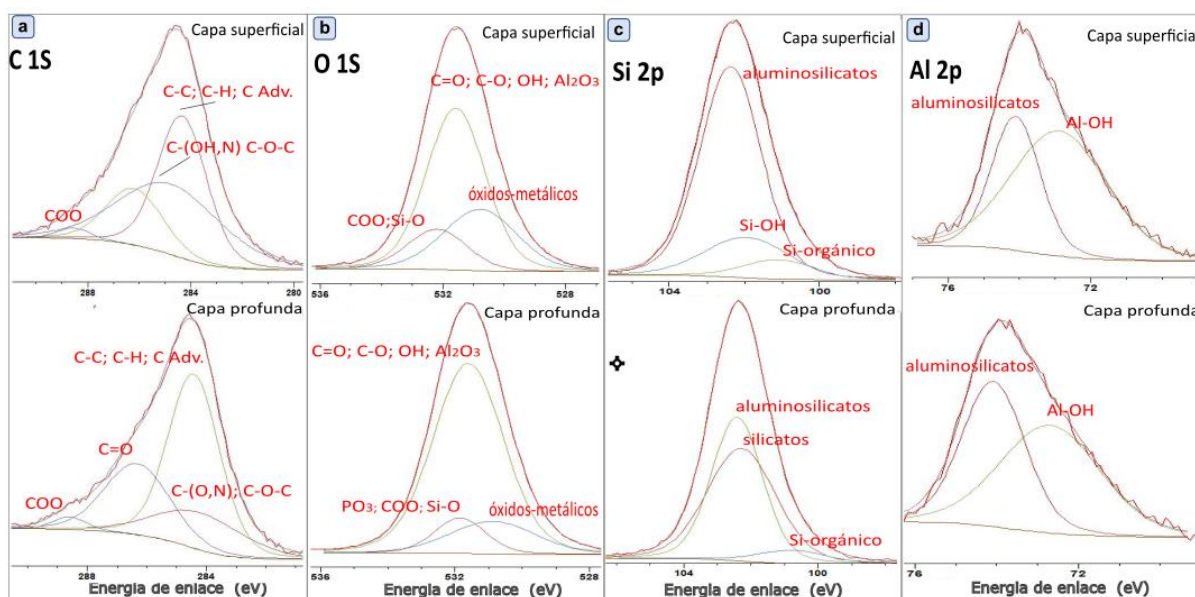


Fig. 3.12. Espectros de alta resolución mediante XPS para el a) C 1s, b) O 1s, c) Si 2p y d) Al 2p.

El **espectro de alta resolución para el Fe2p**, en ambas capas de la mata, contiene un doblete, el primero que corresponde al Fe2p 3/2 (energía de enlace entre los 706 y 718 eV) y el segundo, es un pico Fe2p 1/2 (energía de enlace entre los ~720 y ~730 eV) (Fig. 3.13 a). En general, el pico Fe2p 3/2 fue deconvolucionado en 3 componentes: el pico a 709,09 eV asociado con FeO [**Fe(II)**] y los picos a 711,36 eV y 712,52 eV asociados a **Fe(III)**. En particular, la ausencia del pico satélite entre 718,2 y 718,5 eV puede indicar la presencia de un compuesto con ambas valencias del Fe (FeO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> que también puede expresarse como Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) (Forero-López et al., 2021; Liu et al., 2013). Es importante mencionar que el FeOOH tiene una energía de enlace similar al Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, por lo tanto, en muchos casos no es posible diferenciarlos debido a la superposición de sus energías de enlace (~711 eV) (McCafferty et al., 1988; Salama et al., 2015).

El **hierro** puede precipitar en la mata microbiana en la forma de óxidos e hidróxidos, siderita (FeCO<sub>3</sub>) o como sulfuro de hierro (FeS) y pirita (FeS<sub>2</sub>). Es un micronutriente esencial para todos los organismos, se encuentra en una serie de enzimas que actúan como transportadores de electrones, como los citocromos y ferredoxinas que sirven

como donadores de electrones en una variedad de procesos (incluyendo fijación de  $N_2$ , nitrato, reducción de sulfato y fotofosforilación oxidativa) en la célula, e indirectamente en la fijación de  $CO_2$ . En los citocromos los cuatro átomos de nitrógeno están coordinados con un ion Fe central que puede ser Fe(II) o Fe(III) (Liu et al., 2013; Stal, 2012).

El hierro férrico (Fe(III)) es insoluble y puede precipitar en la vaina de las cianobacterias, donde por acción del EPS u otros procesos celulares, o incluso bajo la influencia de la luz puede reducirse a hierro ferroso (Fe(II)). El Fe(II) producido de esta manera puede ser absorbido por la célula, pero cuando está en exceso puede causar problemas de toxicidad. Se ha demostrado que la acumulación de hierro por las cianobacterias que forman matas microbianas protege a los microorganismos del sulfuro producido por ellas mismas o producido por las bacterias reductoras de sulfato. El azufre elemental es reducido para producir hierro ferroso y sulfuro de hierro (Stal, 2012).

Por otro lado, el **espectro de alta resolución del pico N1s** para la capa superior de la mata microbiana está centrado en 399,50 eV (Fig. 3.13 b). Este pico se puede ajustar en 2 componentes (397,67 eV y 399,51 eV) asociados a N-Si y a los grupos funcionales amidas y aminas (Forero-López et al., 2024; XPSfitting, 2023). La interacción entre nitrógeno y silicio corresponde a las diatomeas, las cuales requieren Si para la construcción de sus paredes celulares y las proporciones N:P:Si son un factor importante que regula su crecimiento (Ma et al., 2018). Por otro lado, los grupos amidas y aminas pueden formar parte de los aminoácidos que componen el EPS, los microorganismos y la MO (Braissant et al., 2009; Li et al., 2018; Oliveira et al., 2014; Zhadra et al., 2021).

En la capa inferior solo aparecen las energías de enlace asociadas a los grupos amida y amina, los cuales hacen una contribución importante a la concentración atómica del nitrógeno en dicha capa. No se detectó la interacción N-Si debido a que las diatomeas no se encuentran en las capas profundas de la mata microbiana. Por ende, la modificación del entorno químico del nitrógeno puede deberse a la ausencia de la comunidad microfitobentónica.

Finalmente, con respecto al **fósforo**, no se detectó señal en la capa superficial, pero sí se observó una señal débil en la capa profunda (Fig. 3.13 c). Este pico pudo ser deconvolucionado en 2 componentes, una en 133,31 eV asociada a los grupos fosfatos y otra a 135,79 eV que podría estar relacionada a uniones metal(Mn<sup>+</sup>)-O-P. Debido a la fuerte carga negativa del grupo fosfato, este contribuye a la estabilización de metales en sedimentos mediante la formación de precipitados de fosfatos con cationes metálicos (Liu et al., 2023; Navarathna et al., 2023). Los microorganismos presentes en las matas podrían mejorar este proceso debido a que los grupos funcionales de las paredes celulares proporcionan sitios específicos para la precipitación de fosfatos de metales, lo que estabiliza la coprecipitación (Liu et al., 2023; Qian y Zhan, 2016). Además, las bacterias pueden transferir fosfato a la membrana plasmática, por lo cual también es posible la combinación de fosfatos con metales en la superficie celular (Liu et al., 2023).

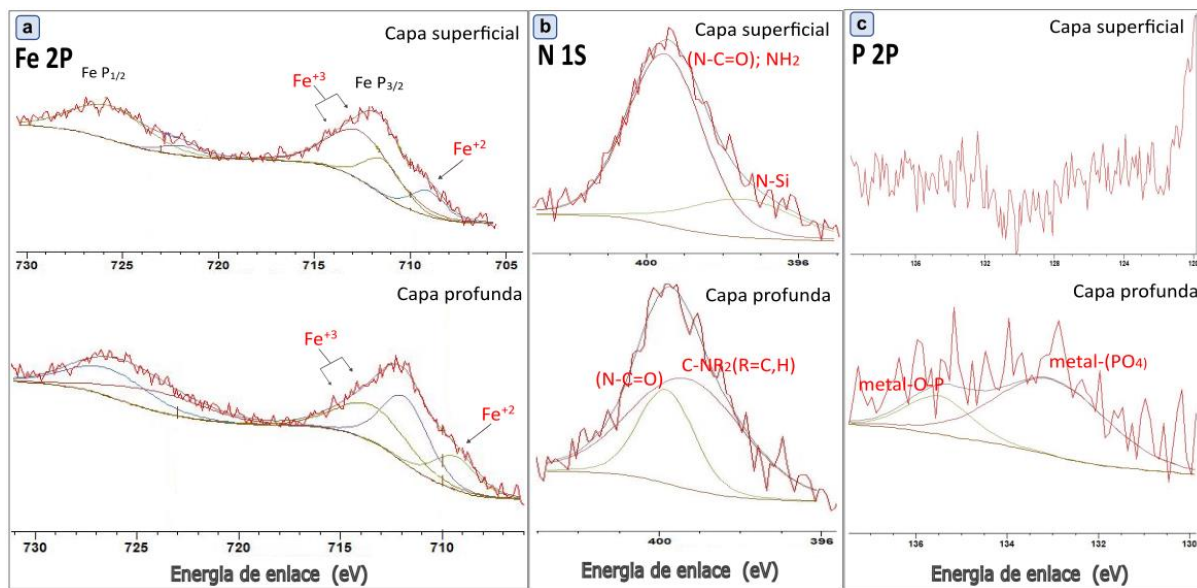


Fig. 3.13. Espectros de alta resolución mediante XPS para el a) Fe2p, b) N1s y c) P2p.



## CAPÍTULO 4

### REMOCIÓN DE Cr(III)

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Alrededor del 95% de los **recursos naturales** de Cr del mundo están geológicamente presentes en Sudáfrica y Kazajstán (Shahid et al., 2017). Adicionalmente, se libera una concentración significativa de este metal al ambiente por **actividades humanas**, por ejemplo, durante el curtido de pieles, la producción de pigmentos, textiles y colorantes, como así también por aplicaciones en la metalurgia, aleación, galvanoplastia, limpieza de metales, conservación de la madera y centrales nucleares (Aksu y Balibek, 2007; Ni et al., 2020; Pradhan et al., 2017; Shahid et al., 2017). Constituyen también fuentes importantes el uso de fertilizantes orgánicos (fosforados y biosólidos), las emisiones de Cr de las torres de refrigeración industrial y el polvo de las carreteras (Shahid et al., 2017). Las industrias del cuero y de galvanoplastia son los principales contribuyentes de Cr(III), con concentraciones en sus efluentes que pueden alcanzar hasta 8000 y 1495 mg Cr(III)/L, respectivamente (Figueirôa et al., 2021; Sarin et al., 2006; Shashirekha et al., 2015; Sibi, 2016; Sundar et al., 2011; Verma et al., 2013).

La mayor parte del Cr que llega al **mar** proviene de los ríos, de la oxidación del Cr(III) de las rocas de silicato, del vertido directo de desechos sólidos y líquidos, y por deposición atmosférica (Bonnand et al., 2013; Shahid et al., 2017). La concentración de Cr total en agua de mar varía de 0,20 a 50 µg/L (Li et al., 2009; Sun et al., 2006), mientras que en zonas costeras como son los estuarios las concentraciones pueden alcanzar los 57 µg/L (estuario de Bahía Blanca y costa sureste de la India) o los 100 µg/L (estuario Tajo en Portugal) (Kumar et al., 2020; La Colla et al., 2018). En la Fig. 4.1 se muestra el **diagrama de Pourbaix** para la especiación del Cr en agua de mar

(Bonnand et al., 2013). En el agua de mar óxica, el estado de oxidación dominante del Cr es el Cr(VI) y el porcentaje de Cr(III) suele ser inferior al 5%. Sin embargo, algunos autores han encontrado cantidades mucho mayores de Cr(III), que a veces representan más del 90% del total de Cr disuelto, y lo han correlacionado con la alta actividad biológica, especialmente por las floraciones de fitoplancton. La explicación más probable encontrada por Connelly et al. (2006) es que el fitoplancton y la biomasa bacteriana puedan utilizar Cr(VI) como aceptor de electrones en algunas reacciones químicas celulares, facilitando de este modo el proceso de reducción (Connelly et al., 2006; Sander et al., 2003).

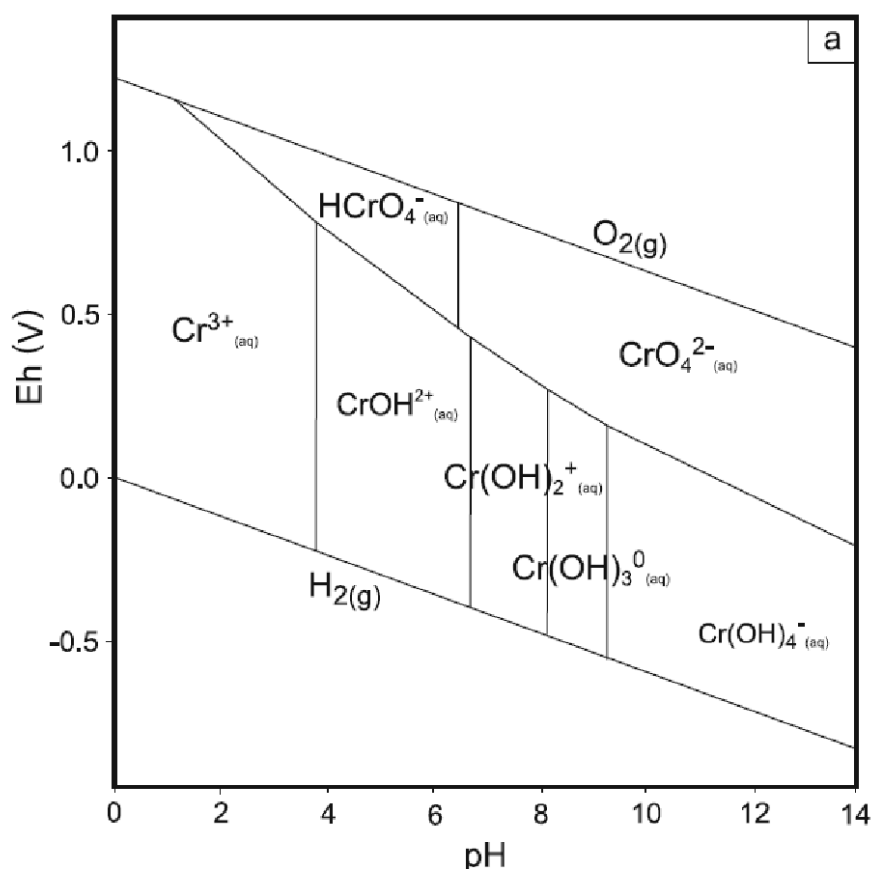


Fig. 4.1. Diagrama Eh-pH para la especiación del Cr en el agua de mar (Bonnand et al., 2013).

El enriquecimiento de Cr en el medio marino puede afectar en última instancia a la salud humana por medio de su paso a través de la cadena alimentaria (Tang et al., 2021). El Cr(III) es considerado por parte de la comunidad científica como metal esencial (Figueirôa et al., 2021; Jobby et al., 2018) y por otros como no-esencial (Qureshi et al., 2024), y por ello aun en la actualidad no se ha alcanzado un consenso definitivo en cuanto a sus beneficios y toxicidad en animales (Unceta et al., 2010; Yan et al., 2023). El metal en este estado de oxidación se emplea extensamente como suplemento nutricional tanto en animales como en seres humanos. Es valorado por su capacidad de mejorar la absorción de la glucosa, por medio de un aumento en la producción de insulina por el páncreas y por facilitar la unión de la insulina a los receptores de la superficie celular (Levina y Lay, 2008; Jobby et al., 2018; Sharma, 2009; Unceta et al., 2010). Con respecto a las plantas, aunque la mayoría de los estudios han informado efectos tóxicos causados por la exposición a Cr(III) (Qureshi et al., 2024; Shahid et al., 2017), existen investigaciones en los que han encontrado que concentraciones bajas de Cr(III) producen un efecto estimulante en el crecimiento, la síntesis de clorofila y la productividad, además de inducir efectos antifúngicos (Bhat et al., 2023; Srivastava et al., 2021). Contrariamente, hasta el momento no se ha identificado un papel biológicamente relevante para el Cr en el metabolismo de los microorganismos con relación a sus requerimientos nutricionales (Shahid et al., 2017; Jobby et al., 2018).

En cuanto a los efectos tóxicos reportados, se ha comprobado que el Cr(III) puede causar **daño al ADN** en sistemas de cultivo celular debido a su interacción electrostática con grupos fosfato con carga negativa del ADN, afectando la replicación, transcripción y causando mutaciones (Joutey et al., 2015; Raja y Nair, 2008; Unceta et al., 2010). Además, el Cr(III) puede interferir en procesos

metabólicos, alterando la estructura y la actividad de **biomoléculas** y **enzimas** al reaccionar con sus grupos carboxilo y tiol (Cervantes et al., 2001; Raja y Nair, 2008). En peces marinos, la exposición al Cr(III) en la dieta resultó en un aumento de peso, daño histológico al hígado y cambios en el metabolismo lipídico (Wei et al., 2022). Aunque no se han encontrado estudios que revelen los efectos adversos causados por el Cr(III) en microorganismos marinos, se ha observado disminución en el **rendimiento fotosintético** de microalgas verdes de agua dulce (*Dyctiosphaerium chlorelloides*) expuestas a Cr(III) (D'ors et al., 2010).

Numerosas investigaciones han demostrado que las microalgas y bacterias, secuestran metales por adsorción superficial a los componentes de la pared celular y en algunos casos incluso acumulan metales intracelularmente (Kumar et al., 2015; Subashchandrabose et al., 2011; Zhang y Majidi, 1994). Hace aproximadamente 30 años algunos investigadores comenzaron a estudiar la remoción y transformación de metales y metaloides por cepas microbianas aisladas de matas microbianas inoculadas en diversos sustratos como sedimentos, goma espuma, hierbas ensiladas flotantes y lana de vidrio (Bender et al., 1994a; Bender et al., 1989; Bender y Phillips, 2004; Fenchel, 1998b, 1998a). A diferencia de dichos trabajos, el enfoque de esta tesis es evaluar la remoción de metales por matas microbianas enteras, tal y como se las encuentra en el ambiente, incluyendo el sedimento, el detrito, las EPS y los microorganismos presentes en ellas y que integran el consorcio microbiano.

Los microorganismos usados en tecnologías de **biorremediación** normalmente requieren nutrientes, humedad, condiciones específicas de oxigenación y pH, y también la exclusión de sustancias químicas no deseadas que puedan afectar su metabolismo (Hughes et al., 2002). Por lo tanto, determinar las condiciones ideales

para que ocurran los procesos de biorremediación en las matas microbianas es crucial para la optimización de la tecnología.

En este capítulo se presentan los resultados de dos experimentos en los cuales se evalúa la remoción de Cr(III) en solución por matas microbianas.

## **4.2. ENSAYO DE REMOCIÓN DE Cr(III) CON Y SIN AIREACIÓN**

Este ensayo fue un experimento preliminar para cumplir con los siguientes objetivos:

- Evaluar la capacidad de las matas microbianas de remover Cr(III) del agua de mar con y sin un sistema de aireación del agua.
- Evaluar los efectos del Cr(III) y la aireación sobre la biomasa y composición de la comunidad microfitobentónica.
- Evaluar el contenido de materia orgánica y los parámetros físicoquímicos (pH, Eh y temperatura) de las matas microbianas y las soluciones de Cr(III) como condicionantes en la remoción de Cr.

### **4.2.1. Materiales y métodos**

#### *4.2.1.1. Diseño experimental*

Las soluciones de Cr(III) que se emplearon en este ensayo fueron preparadas a partir de una solución patrón de nitrato de cromo ( $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ ) de 1000 mg Cr/L (marca Merck) y agua de mar filtrada (ver metodología en inciso 2.3 del Capítulo 2). La concentración de Cr de las soluciones empleadas fue de 2000  $\mu\text{g Cr(III)/L}$ , se seleccionó ese valor por ser el límite admisible de vertido de Cr total en colectoras cloacales y cuerpos de agua superficiales según la autoridad del agua (ADA) de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Res. N° 336/2003).

Las muestras de matas microbianas para el ensayo de remoción de Cr (n=14) fueron recolectadas en julio del 2019 en Puerto Cuatrerros (ver metodología en inciso 2.4 del Capítulo 2). En la misma área donde se colectaron las matas se tomaron muestras (n=14) para analizar la composición y abundancia de la comunidad microfitobentónica inicial y la concentración inicial de clorofila a y feopigmentos.

Las matas microbianas, inmediatamente llegadas al laboratorio, fueron incubadas en cámara de cultivo bajo condiciones de luz y temperatura comparables a las observadas en el ambiente durante la estación de invierno. El rango de temperatura fue de 2 °C/h, siendo la temperatura mínima 5 °C y la máxima 17,5 °C. La iluminación tuvo una intensidad lumínica de 66  $\mu\text{moles/m}^2 \times \text{seg}^1$  y varió en un ciclo día/noche con 9 h de luz y 15 h de oscuridad.

Después de tres días de aclimatación, las matas microbianas se sumergieron en 650 mL de agua de mar filtrada (A) o en las soluciones de Cr (Cr), según el tratamiento correspondiente, durante 7 h al día por 5 días, con un total de 35 h de inundación.

Los tratamientos aplicados fueron: **Cr** (solución de 2000  $\mu\text{g Cr(III)/L}$  sin aireación, n = 5), **Cr + O<sub>2</sub>** (solución de 2000  $\mu\text{g Cr(III)/L}$  con aireación, n = 2) y **A + O<sub>2</sub>** (agua de mar filtrada con aireación, n = 2) y un control denominado **A** (agua de mar filtrada sin aireación, n = 5) (Fig. 4.1). El aire se suministró mediante mangueras de silicona de 3 mm de diámetro interno conectadas a un aireador de doble salida.

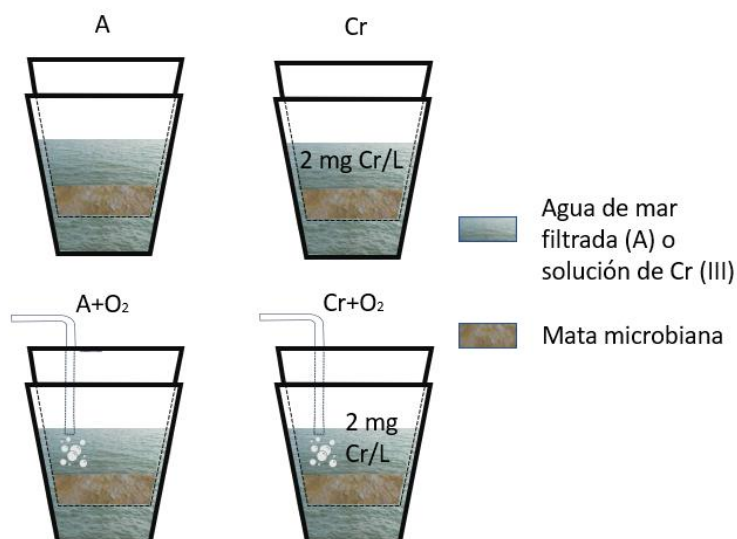


Fig. 4.1. Diseño experimental del ensayo de remoción de Cr(III) con y sin aireación.

Se utilizaron dos tipos de recipientes de acrílico para simular el efecto de la marea sobre la remoción de Cr, contenedores con pequeños agujeros en el fondo (I) y recipientes acrílicos sin perforar (II) que contenían sólo las soluciones de Cr o A (Fig. 4.2 a). Para simular el efecto de inundación, el recipiente perforado con la mata microbiana en su interior se colocó dentro del recipiente no perforado que contenía la solución del tratamiento correspondiente (Fig. 4.2. b). Para simular el período de emersión, el recipiente perforado que contenía la mata microbiana se separó dejándolo apoyado de manera cruzada sobre el recipiente inferior que contenía la solución de Cr (Fig. 4.2. c). El proceso de inmersión-emersión fue repetido manualmente cada día a la misma hora.

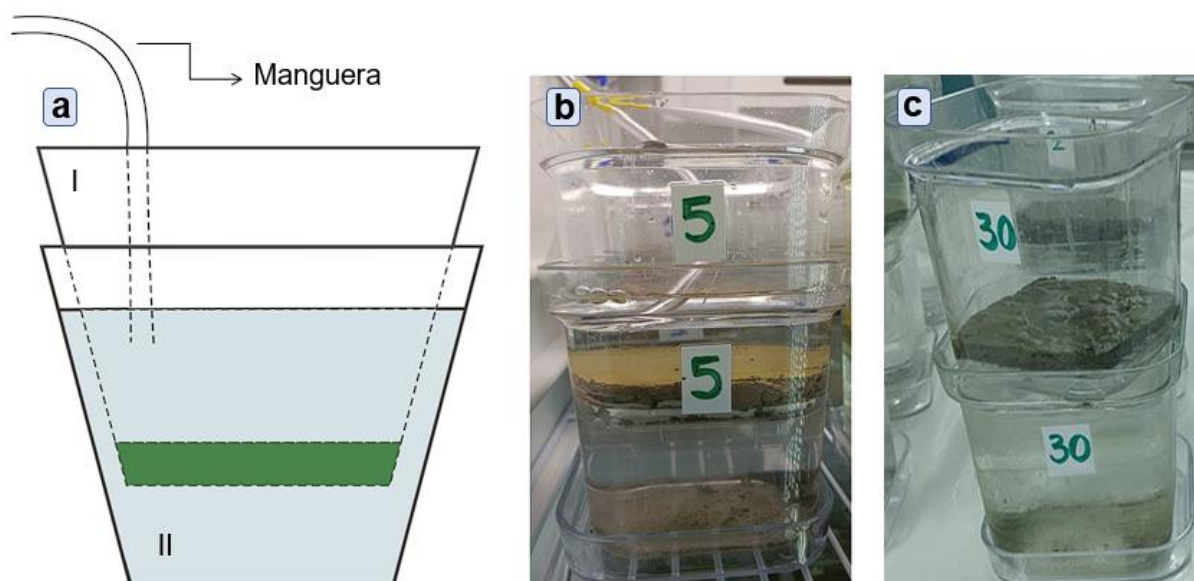


Fig. 4.2. a) Diagrama bidimensional del contenedor (base cribada) con mata microbiana (I) sumergido en otro contenedor con agua de mar o solución de Cr (II) y una manguera conectada a un aireador que suministra aire. b) Imagen del período de inmersión. c) Imagen del período de emersión.

Se midieron los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura y Eh) al inicio y al final del experimento en las matas microbianas y en las soluciones. Al final del ensayo, las soluciones se transfirieron a botellas de PET para la determinación de la concentración de Cr total. Las matas microbianas se dividieron en submuestras para realizar diferentes análisis: concentración de Cr total, contenido de MO, granulometría, concentración de clorofila *a* y feopigmentos y evaluación cuantitativa y cualitativa de la comunidad microfítobentónica.

#### 4.2.1.2. Análisis estadístico

Se comparó la eficiencia de remoción de Cr entre tratamientos mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución beta (ver, Capítulo 2, ítem 2.7). Para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad los datos de clorofila *a* fueron transformados con raíz cúbica y la variable feopigmentos fue transformada con la recíproca de dichos datos. Se llevó a cabo una prueba de ANOVA de una vía para detectar diferencias entre tratamientos con respecto a la concentración de Cr, contenido de MO, pH, temperatura, Eh, concentración de clorofila *a* y feopigmentos



en matas microbianas. Los análisis se realizaron teniendo en cuenta el error tipo III para tratamientos desbalanceados.

Se realizaron pruebas t aplicadas a muestras dependientes para comparar los valores medios de clorofila a, feopigmentos, abundancia de cianobacterias y diatomeas entre los días inicial y final del ensayo en cada tratamiento. Un análisis de similitud unidireccional (ANOSIM) con 105 permutaciones fue llevado a cabo con la finalidad de evaluar cómo los tratamientos afectaron a la estructura de la comunidad microfitobentónica con los datos cuantitativos de diatomeas y cianobacterias del día final del ensayo. En este análisis, se empleó una matriz de similitud de Bray Curtis sobre datos transformados de raíz cuadrada.

#### 4.2.2. Resultados y discusión

La reducción del contenido de Cr en las soluciones alcanzó el  $94,94 \pm 1,20\%$  en el tratamiento Cr y el  $99,09 \pm 0,05\%$  en el tratamiento Cr+O<sub>2</sub>, estas diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas considerando un valor crítico de 0,01 (GLM; Chisq=4,42; p=0,04). Sin embargo, la concentración de Cr en las soluciones del tratamiento Cr + O<sub>2</sub> alcanzó valores cercanos a 15 µg/L (Tabla 4.1), la cual es la concentración media anual de Cr disuelto recomendada para aguas estuarinas por la UK Environmental Quality Standard (Cole et al., 1999).

Las matas microbianas fueron eficientes en la eliminación del Cr presente en el agua de mar a la concentración empleada, independientemente de la aireación. Desde un punto de vista termodinámico, el oxígeno disuelto es capaz de oxidar Cr(III) a Cr(VI) en la interfase agua-sedimento, pero la reacción ocurre muy lentamente (Gorny et al., 2016). En efecto, Schroeder y Lee (1974) observaron que sólo se oxidó un 1-4% del Cr(III) en agua de un lago durante un período de 2 semanas. Por otro

lado, Wadhawan et al. (2013) mantuvieron sedimento suspendido en solución de Cr(III) bajo condiciones anaeróbicas durante 360 h y no observaron la formación de Cr(VI) durante ese período de tiempo. Sin embargo, dentro de las 24 horas de haber aireado la suspensión, observaron la formación de Cr(VI) y su concentración aumentó con el tiempo durante el período de aireación (33 días aproximadamente).

Tabla 4.1. Concentración de Cr(III) en las soluciones (Cr inicial y Cr final, en  $\mu\text{g/L}$ ), y en las matas microbianas (Cr en MM, en  $\text{mg/kg}$ ) al final del experimento y contenido de MO% en matas microbianas al final del ensayo. Media  $\pm$  error estándar.

	<b>Cr inicial</b>	<b>Cr final</b>	<b>Cr en MM</b>	<b>MO%</b>
<b>A</b>	0,00	<LOD	8,02 $\pm$ 0,19	6,63 $\pm$ 0,40
<b>Cr</b>	2000,00	101,20 $\pm$ 24,08	12,78 $\pm$ 0,35	6,78 $\pm$ 0,23
<b>A+O<sub>2</sub></b>	0,00	4,00 $\pm$ 2,80	7,95 $\pm$ 0,35	6,17 $\pm$ 0,15
<b>Cr+O<sub>2</sub></b>	2000,00	18,20 $\pm$ 1,10	13,50 $\pm$ 0,90	6,74 $\pm$ 1,09

El contenido de Cr en las matas microbianas fue más alto en los tratamientos Cr y Cr+O<sub>2</sub> con respecto a los tratamientos A y A+O<sub>2</sub> ( $F=57,57$ ;  $p<0,001$ ) (Tabla 4.1). Las matas microbianas de los dos tratamientos sin adición de Cr (A y A+O<sub>2</sub>) mostraron alrededor de 8 mg Cr/kg, indicando que esta concentración podría tomarse como valor de referencia para el Cr en el área de Puerto Cuatrerros del estuario de Bahía Blanca. Dicha concentración fue inferior a la encontrada previamente por Serra et al. (2017) en matas microbianas de otros sitios del estuario más impactados por actividades humanas, donde los valores oscilaron entre 9,18 y 14,45 mg Cr/kg de peso seco.

Los valores de contenido de MO en las matas microbianas al final del ensayo no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $F=0,28$ ;  $p=0,84$ ) (Tabla 4.1). A la vez, este contenido de MO es considerado alto en comparación al de otros sitios del estuario de Bahía Blanca (Serra et al., 2017), lo cual puede ser beneficioso en el proceso de remoción de Cr del agua de mar (Abbase et al., 2003; Watermann et al., 1999). Según Marcovecchio y Ferrer (2005) y Botté et al. (2010), la distribución de la partición geoquímica del Cr mostró los

valores más altos en la fracción residual y la fracción oxidable (metales unidos a MO/sulfuros) en los sedimentos del estuario de Bahía Blanca. Esto sugiere que el Cr podría estar unido principalmente a minerales y diferentes formas de MO (detritos, organismos vivos, entre otros) (Marcovecchio y Freije, 2013), incluyendo la que forma parte de las matas microbianas.

Respecto a las variables fisicoquímicas medidas en el experimento se observaron en general pocas variaciones (Tabla 4.2), con las siguientes particularidades. Los valores de pH y T (°C) en las soluciones y en las matas microbianas fueron similares entre los días inicial y final para cada tratamiento, y también, entre tratamientos para los valores del día final. No se encontraron diferencias significativas en la variable Eh medida en las matas microbianas del día final del ensayo entre tratamientos ni entre las mediciones del día inicial y final para cada tratamiento. El valor medio de Eh del tratamiento A+O<sub>2</sub> fue negativo en las matas microbianas al inicio del ensayo, pero todos los valores medios fueron positivos al final. En cambio, al comparar los datos de Eh de las soluciones del día final del ensayo entre tratamientos y entre las mediciones del día inicial y final para cada tratamiento se observaron diferencias (Tabla 4.2), las cuales no fueron estadísticamente significativas. Con los datos de pH y Eh, es posible estimar la forma química en la que se encuentra el Cr (u otro metal) en el ambiente utilizando diagramas de Pourbaix.

Tabla 4.2. Valores medios  $\pm$  error estándar de pH, T ( $^{\circ}$ C) y Eh (mV) en soluciones y matas microbianas (MM) de cada tratamiento en el día inicial (a) y final (b) del experimento. Se muestra el estadístico F y el valor p de la prueba estadística ANOVA para la comparación entre tratamientos de cada variable en el día final del ensayo.

	pH		T ( $^{\circ}$ C)		Eh (mV)	
	Soluciones	MM	Soluciones	MM	Soluciones	MM
<b>A (a)</b>	8,08 $\pm$ 0,07	8,13 $\pm$ 0,06	15,04 $\pm$ 0,23	14,20 $\pm$ 0,28	43,00 $\pm$ 13,68	29,80 $\pm$ 22,31
<b>A (b)</b>	8,09 $\pm$ 0,15	8,15 $\pm$ 0,14	13,96 $\pm$ 0,78	12,64 $\pm$ 0,65	141,00 $\pm$ 34,08	49,40 $\pm$ 30,19
<b>Cr (a)</b>	8,17 $\pm$ 0,04	8,16 $\pm$ 0,04	15,22 $\pm$ 0,25	14,12 $\pm$ 0,30	46,80 $\pm$ 20,88	50,00 $\pm$ 21,04
<b>Cr (b)</b>	8,21 $\pm$ 0,12	8,24 $\pm$ 0,12	12,74 $\pm$ 0,94	12,02 $\pm$ 0,87	79,86 $\pm$ 29,37	40,80 $\pm$ 32,59
<b>A+O<sub>2</sub> (a)</b>	7,83 $\pm$ 0,30	7,90 $\pm$ 0,27	15,70 $\pm$ 0,60	14,80 $\pm$ 0,30	5,00 $\pm$ 15,00	-3,00 $\pm$ 24,00
<b>A+O<sub>2</sub> (b)</b>	8,07 $\pm$ 0,07	8,14 $\pm$ 0,07	14,25 $\pm$ 1,05	13,05 $\pm$ 1,05	167,50 $\pm$ 28,50	10,00 $\pm$ 21,00
<b>Cr+O<sub>2</sub> (a)</b>	7,99 $\pm$ 0,21	7,97 $\pm$ 0,22	15,65 $\pm$ 0,15	15,05 $\pm$ 0,45	25,50 $\pm$ 5,50	29,00 $\pm$ 1,00
<b>Cr+O<sub>2</sub> (b)</b>	8,17 $\pm$ 0,06	8,21 $\pm$ 0,06	14,4 $\pm$ 0,80	12,00 $\pm$ 1,00	42,00 $\pm$ 8,00	31,00 $\pm$ 27,00
<b>ANOVA día final</b>	F=0,19; p=0,90	F=0,14; p=0,94	F=0,65; p=0,60	F=0,26; p=0,90	F=1,99; p=0,180	F=0,19; p=0,902

Los diagramas de Pourbaix, también llamados diagramas Eh-pH, son herramientas gráficas que muestran las condiciones termodinámicas bajo las cuales un elemento químico está en equilibrio con su entorno. Estos diagramas se ensamblan a partir de la energía de Gibbs de formación de especies y fases iónicas, combinan valores de pH (abscisas) y Eh (ordenadas) para indicar las regiones o dominios de estabilidad de un metal (o elemento) en particular en varias formas químicas posibles, incluidos iones y fases complejas, limitados, sin embargo, a aquellas formas químicas del metal que contienen sólo hidrógeno y/u oxígeno (Revie, 2011). Según el diagrama Eh-pH para la especiación del Cr en el agua de mar, la forma termodinámicamente posible en que se encontraría el Cr en las soluciones sería  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  y  $\text{Cr}(\text{OH})_2$  (ver Fig. 5.1 en Capítulo 5, ítem 5.1) (Bonnand et al., 2013).

Los valores más altos de la concentración de clorofila *a* se registraron al final del experimento en los tratamientos Cr y Cr+O<sub>2</sub> (Fig. 4.3 a). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de clorofila *a* entre tratamientos ( $F=1,24$ ;  $p=0,35$ ) ni entre los días inicial y final del ensayo (Tabla 4.3).

Los valores más altos de la concentración de feopigmentos se registraron al final del ensayo en el tratamiento A+O<sub>2</sub> (Fig. 4.3 b). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en las concentraciones de feopigmentos entre tratamientos ( $F=0,78$ ;  $p=0,53$ ) ni entre los días inicial y final del ensayo (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Valores del estadístico t y p de la prueba t para comparación de las variables clorofila *a*, feopigmentos, total de cianobacterias y total de diatomeas entre día inicial y final del experimento. Media  $\pm$  error estándar.

	Clorofila <i>a</i>		Feopigmentos		Cianobacterias		Diatomeas	
	t	p	t	p	t	p	t	p
<b>A</b>	0,48	0,66	0,70	0,52	0,77	0,58	0,54	0,68
<b>Cr</b>	2,25	0,09	0,95	0,40	1,78	0,33	0,89	0,54
<b>A+O<sub>2</sub></b>	3,05	0,20	2,94	0,21	3,34	0,19	5,00	0,13
<b>Cr+O<sub>2</sub></b>	0,37	0,77	0,14	0,91	0,30	0,82	0,28	0,83

El análisis cuantitativo de la comunidad microfitobentónica mostró una tendencia general a la disminución de la biomasa de cianobacterias y un aumento de la biomasa de diatomeas hacia el final del ensayo (Figs. 4.3 c, d). No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de cianobacterias y diatomeas entre los días inicial y final para ninguno de los tratamientos (Tabla 4.3). Licursi y Gómez (2013) observaron una tendencia similar en la composición de un biofilm epipsámico (asociado a sustrato arenoso) al exponerlo a Cr(VI). Los mismos autores destacan un aumento en la concentración de clorofila *a* y mayores tasas de crecimiento en *Nitzschia palea*. De forma similar, en el presente trabajo, *Nitzschia* sp. fue el grupo dominante entre las diatomeas observadas en las matas microbianas (ver Capítulo 3, ítem 3.3.1). Además, es importante mencionar que las condiciones de cultivo en este estudio fueron más favorables para las diatomeas, ya que tienen altas tasas de crecimiento a 10-15 °C, mientras que para las cianobacterias la temperatura óptima es de 25 °C (Watermann et al., 1999).

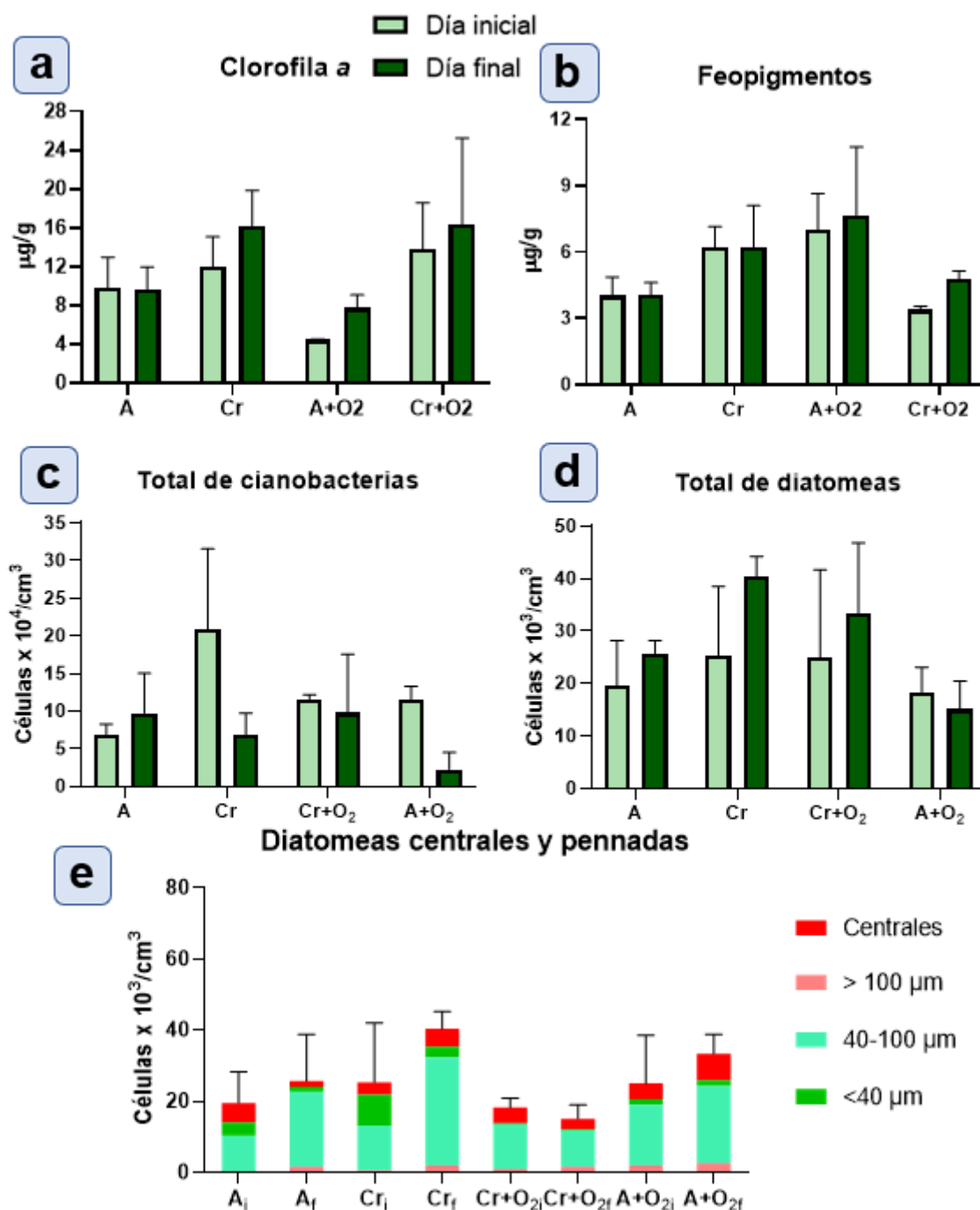


Fig. 4.3. a) Concentración de clorofila *a* y b) feopigmentos (µg/g de peso seco). c) Abundancia correspondiente al total de cianobacterias, d) total de diatomeas y e) diatomeas centrales y pennadas de diferentes rangos de tamaños (número de células/cm<sup>3</sup> de peso húmedo). Variables medidas el día inicial y final del experimento en las matas microbianas de cada tratamiento. Media ± error estándar. i: día inicial del experimento. f: día final del experimento.

La mayor biomasa de cianobacterias al final del ensayo se observó en el tratamiento Cr+O<sub>2</sub>, y la mayor biomasa de diatomeas se registró en el tratamiento sólo con Cr. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente

significativas entre tratamientos tanto para cianobacterias ( $F=0,49$ ;  $p=0,71$ ) como para diatomeas ( $F=2,03$ ;  $p=0,25$ ). Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la estructura de la comunidad entre tratamientos ( $R\text{-ANOSIM}=-0,35$ ;  $p=0,97$ ) (Fig. 4.3 e).

Aunque las matas microbianas incorporaron una elevada proporción de Cr, la exposición a 2 mg Cr(III)/L no afectó negativamente a la comunidad microfitobentónica, ya que no se observó una reducción significativa en el número de diatomeas y cianobacterias y la concentración de clorofila *a* no disminuyó en ninguno de los tratamientos. Además, un aumento de la concentración de feopigmentos puede indicar que la clorofila *a* está siendo dañada ya que son productos de su degradación (Sanmartín et al., 2011); sin embargo, en nuestro experimento, no se produjeron cambios en su concentración. Esto indica que, en este ensayo, el Cr(III) no actuó como micronutriente ni como tóxico en la comunidad microfitobentónica, lo cual es beneficioso para su potencial uso en la remoción de Cr.

La aireación no mostró beneficios claros sobre la comunidad microfitobentónica. Aunque existe una gran diversidad de microorganismos en las matas microbianas, la fotosíntesis es la principal fuente de energía para esta comunidad, siendo el  $\text{CO}_2$  indispensable. Los fotótrofos desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de los heterótrofos proporcionándoles oxígeno, nitrógeno y materia orgánica esencial para su actividad (Abed et al., 2020). Los ciclos biogeoquímicos y los procesos bioquímicos están acoplados de tal manera que un grupo de microorganismos utiliza los productos y residuos metabólicos de otro grupo (Prieto-Barajas et al., 2018). En este sentido, es probable que las interacciones entre los microorganismos que habitan las matas microbianas permitan su supervivencia dentro de la cámara de cultivo sin necesidad de modificar factores como la oxigenación o la incorporación de nutrientes.



La aireación quedó descartada para los siguientes ensayos, debido a que no se observaron beneficios significativos en la remoción de Cr del agua de mar ni sobre la biomasa de la comunidad microfitobentónica. Además, un ambiente aeróbico en la interfase agua-sedimento favorece la formación no deseada de Cr(VI) a partir de Cr(III), ya que el Cr(VI) es más soluble y tóxico para los organismos vivos (Gorny et al., 2016; Wadhawan et al., 2013).

Los prometedores resultados alcanzados en términos de eficiencia en la remoción de Cr y en la viabilidad de la comunidad microfitobentónica, tras su exposición a este metal durante el ensayo preliminar, nos permitió plantear un nuevo experimento con concentraciones de Cr(III) considerablemente más elevadas. Asimismo, el interés por identificar qué componentes de la mata microbiana son especialmente responsables de la acumulación de Cr fue planteado como un interesante interrogante a abordar.

### **4.3. ENSAYO DE REMOCIÓN DE Cr(III) A DIFERENTES CONCENTRACIONES**

El segundo ensayo tuvo como objetivos:

- Evaluar la eficiencia de las matas microbianas en la eliminación de Cr(III) a diferentes concentraciones (2-30 mg Cr/L) en agua de mar, y la interacción del Cr con otros metales (Cu, Pb, Zn) presentes en las matas.
- Evaluar el contenido de materia orgánica y los parámetros físicoquímicos (pH y Eh) de las matas microbianas y las soluciones de Cr(III) a diferentes concentraciones (2-30 mg Cr /L), como condicionantes en la remoción de Cr.
- Determinar el rol de los diferentes componentes de las matas en el proceso de remoción mediante la caracterización elemental y mineral de las matas expuestas a Cr(III).

### 4.3.1. Materiales y métodos

#### 4.3.1.1. *Diseño experimental*

Las soluciones de Cr(III) fueron preparadas a partir de la solución patrón de  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$  de 1000 mg Cr/L (Merck). A partir de dicha solución se prepararon las siguientes diluciones en agua de mar filtrada para cada tratamiento (Capítulo 2, ítem 2.3): **T2** (2 mg Cr(III)/L), **T10** (10 mg Cr(III)/L), **T15** (15 mg Cr(III)/L), **T20** (20 mg Cr(III)/L) y **T30** (30 mg Cr(III)/L) (Fig. 4.4). Estas diluciones fueron seleccionadas para evaluar concentraciones iguales y superiores al valor límite admisible de vertido de Cr total (2 mg/L) al alcantarillado o cuerpos de agua superficiales de acuerdo con ADA de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Res. N° 336/2003). Las concentraciones superiores al valor límite fueron seleccionadas en base a valores en los que se observaron alteraciones en la biota marina según la bibliografía consultada (Bere et al., 2012; Pellón et al., 2003; 2005).

El nitrógeno actúa como un nutriente esencial para el crecimiento de las microalgas (Andersen et al., 2020), y dado que se utilizó  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$  para preparar las soluciones de los diferentes tratamientos, se presentan a continuación para cada uno de ellos las concentraciones de nitrógeno (N): 1,08 mg N/L en T2; 5,38 mg N/L en T10; 8,07 mg N/L en T15; 10,76 mg N/L en T20 y 16,14 mg N/L en T30.

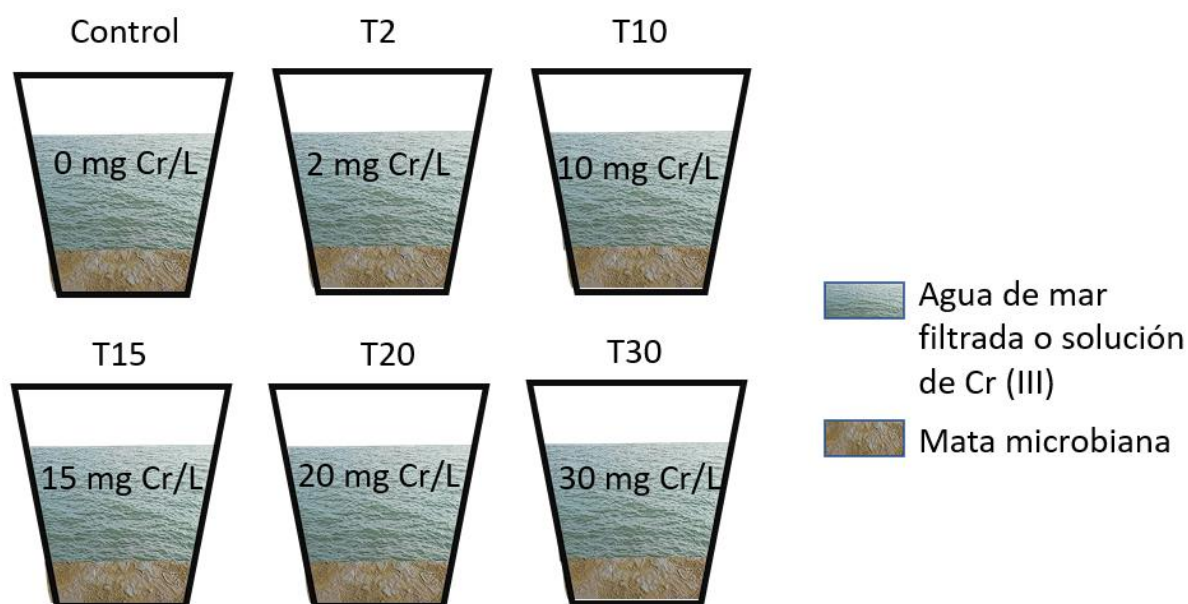


Fig. 4.4. Diseño experimental de remoción de Cr(III) a diferentes concentraciones.

Se juntaron 5 muestras de campo (F) en el área donde se recolectaron las matas microbianas para el ensayo de remoción (Capítulo 2, ítem 2.4), las cuales se usaron para comparar la concentración inicial de clorofila *a* y feopigmentos, y la abundancia de cianobacterias y diatomeas con los respectivos valores al final del experimento a fin de evaluar los efectos del metal sobre la comunidad microfitobentónica.

La incubación de las matas microbianas en la cámara de cultivo mantuvo condiciones de luz y temperatura comparables a las observadas en el ambiente durante la estación de verano debido a que las muestras fueron recolectadas en el mes de febrero. La temperatura se modificó diariamente ( $2\text{ }^{\circ}\text{C/h}$ ) desde un mínimo de  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta un máximo de  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El fotoperíodo fue de 13 horas de luz y 11 horas de oscuridad y tuvo una intensidad lumínica de  $66\text{ }\mu\text{moles/m}^2 \times \text{seg}^{-1}$ .

Las matas microbianas dispuestas en los contenedores acrílicos ( $n=18$ ) se inundaron con 300 mL de las soluciones de Cr correspondientes a cada tratamiento (T), mientras que el control (C) se inundó con 300 mL de agua de mar filtrada sin adición de Cr. Los tratamientos y el control se realizaron por triplicado. Cada réplica

se inundó durante tres horas al día durante cinco días (tiempo total de inundación: 15 horas), utilizando la misma solución durante todo el ensayo. El efecto de marea se simuló de una forma diferente a la del ensayo preliminar, las matas microbianas fueron inundadas lentamente con las soluciones y, después de cada período de inundación, cada solución fue extraída cuidadosamente con una jeringa y se almacenaron en botellas (total 18, una por cada réplica y tratamiento) de plástico de 0,5 L hasta el siguiente día de inundación en heladera y oscuridad (Fig. 4.5).



Fig. 4.5. Jeringa y botellas utilizadas para simular el efecto de marea en las matas microbianas. Soluciones en heladera y matas microbianas en cámara de cultivo.

Los parámetros fisicoquímicos pH y Eh fueron medidos al inicio y al final del ensayo en matas microbianas y soluciones. El día final del experimento cada una de las soluciones de Cr fueron trasvasadas a botellas plásticas, preservadas con HCl a pH 2 y almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento para la determinación analítica del metal de interés. Una vez extraída la totalidad de la solución de inundación y quedando las matas microbianas expuestas, se tomaron submuestras superficiales de las mismas y se fijaron con glutaraldehído al 2,5% para su observación por SEM-

EDS al igual que en el Capítulo 3 (Fig. 3.1). También se tomaron muestras de las matas microbianas al final del ensayo para determinar la concentración total de Cr, en conjunto con los contenidos naturales en las matas de Cu, Pb y Zn, el contenido de MO (%), la concentración de clorofila *a* y feopigmentos, y la abundancia de cianobacterias y diatomeas. Se realizaron análisis de DRX de la mata microbiana completa y homogeneizada.

#### 4.3.1.2. *Análisis estadísticos*

Se realizó un GLM con distribución Beta para comparar la eficiencia de remoción de Cr (%) y el contenido de MO (%) entre tratamientos al final del ensayo. Además, con el mismo modelo se compararon los valores de % en peso de Cr (%p/p) entre los diferentes componentes de las matas microbianas y los mapeos de %p/p de Cr entre tratamientos. Las pruebas de Tukey se utilizaron para las comparaciones por pares.

Los datos de concentraciones de Cr se transformaron con logaritmo natural para cumplir con los supuestos antes mencionados. Se realizaron pruebas ANOVA de una vía para comparar los siguientes parámetros entre tratamientos en las matas microbianas al final del ensayo: Cr, clorofila *a*, feopigmentos, cianobacterias y abundancia de diatomeas, pH y Eh, y, al comienzo del ensayo, solo pH. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar Eh entre tratamientos en matas microbianas al inicio del ensayo debido a que la variable no cumplió con los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

También se realizaron pruebas ANOVA de una vía para comparar las concentraciones de Cr y el pH en las soluciones entre los tratamientos al final del ensayo y Eh entre los tratamientos al final y al comienzo del ensayo. Se completó el análisis con pruebas LSD Fisher para comparaciones *a posteriori* cuando se encontraron diferencias significativas en las pruebas ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Se realizó un ANOSIM con 999 permutaciones para analizar la estructura de la comunidad microfitobentónica después de los tratamientos con Cr. En estos análisis se empleó una matriz de similitud de Bray Curtis sobre datos transformados por raíz cuadrada.

### 4.3.2. Resultados y discusión

#### 4.3.2.1. *Eliminación de Cr a diferentes concentraciones*

En el presente estudio las matas microbianas fueron expuestas a soluciones de Cr(III) de 2 a 30 mg/L, en todos los tratamientos se obtuvieron valores altos de eficiencia de remoción del metal (%): T2 (93,67±0,95%); T10 (93,97±0,82%); T15 (88,03±3,82%); T20 (88,61±2,94%) y T30 (87,05±1,22%). Estos valores no fueron estadísticamente diferentes entre tratamientos a un valor crítico de 0,01 (GLM; Chisq=11,04; Df=4; p=0,03).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de Cr total en las soluciones (F=129,93; p<0,001) y en las matas microbianas (F=18,25; p<0,001) entre tratamientos al final del ensayo (Fig. 4.6). Cuanto mayor fue la concentración de Cr aplicada, mayor fue la concentración de Cr encontrada en las matas microbianas y en las soluciones al final del ensayo.

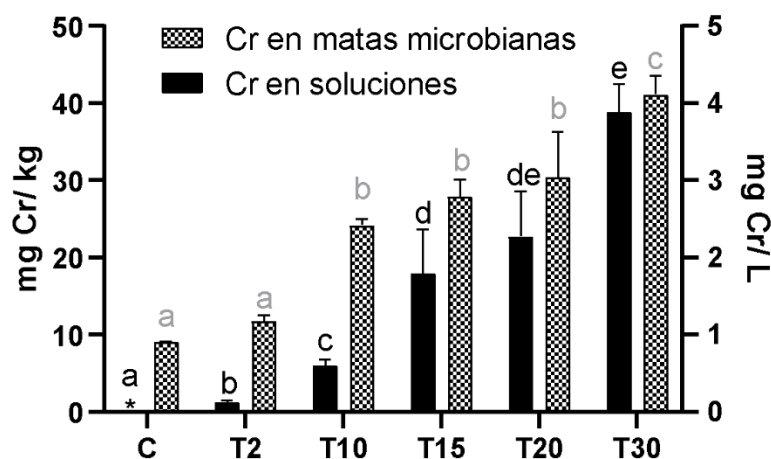


Fig. 4.6. Concentración de Cr total en las matas microbianas (mg Cr/kg de peso seco) y en las soluciones (mg Cr/L) al final del ensayo. Los valores medios con letras diferentes en cada conjunto de datos son significativamente diferentes ( $p < 0,05$  LSD Fisher). \*: solución control con  $0,005 \pm 0,0005$  mg Cr/L. Media  $\pm$  error estándar.

La concentración de Cr total en las soluciones de 2 a 15 mg/L al final del ensayo fue inferior a la concentración máxima admisible para el vertido a cuerpos de agua superficiales según ADA de la provincia de Buenos Aires, Argentina, mientras que las soluciones de Cr de 20 y 30 mg/L mostraron concentraciones superiores a 2 mg Cr/L. Estos resultados indican que las matas microbianas evaluadas podrían ser adecuadas para la remediación de efluentes con una concentración de hasta 15 mg Cr(III)/L. Además, ninguna de las soluciones finales superó el valor agudo (10,30 mg Cr(III)/L) recomendado por la NOAA (Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica de los Estados Unidos) para la detección de sustancias inorgánicas en aguas superficiales marinas (Buchman, 2008).

La concentración de Cr en las matas microbianas al final del ensayo mostró un aumento en comparación con los valores de campo, esto pone en evidencia que las matas pueden incorporar este metal desde la solución de inundación hacia algunos de sus componentes (microorganismos, EPS, detritos, sedimento). En cambio, las concentraciones de Cu, Pb y Zn se mantuvieron relativamente constantes, indicando que su concentración no se ve afectada por el aumento de Cr ni en la solución ni en

la mata (Tabla 4.4). Las concentraciones de Cr no superaron el valor recomendado por la legislación holandesa para mantener una calidad sostenible del sedimento (valor objetivo: 100 mg Cr/kg). Dicho valor representa el nivel necesario para recuperar totalmente las propiedades funcionales de un suelo (Van Volkshuisvesting, 2000). Tampoco superaron el valor TEL (nivel de efecto mínimo= 52,30 mg/kg) recomendado para sedimentos marinos por la NOAA. Esto indicaría que las concentraciones halladas no inducen efectos biológicos adversos (Buchman, 2008).

Tabla 4.4. Concentraciones (mg/kg en peso seco) de Cr, Cu, Pb y Zn en las matas microbianas procedentes del campo (F) y del control (C) y los tratamientos al final del ensayo (T). Media  $\pm$  error estándar a excepción de los valores de Cu, Pb y Zn en C y T que fueron medidos en una única réplica.

	Cr	Cu	Pb	Zn
<b>F</b>	7,92 $\pm$ 0,05	13,76 $\pm$ 0,08	4,15 $\pm$ 0,24	43,05 $\pm$ 0,60
<b>C</b>	9,07 $\pm$ 0,06	14,24	3,90	46,71
<b>T2</b>	11,75 $\pm$ 0,80	14,21	3,63	46,89
<b>T10</b>	24,20 $\pm$ 0,82	14,36	4,65	47,43
<b>T15</b>	27,92 $\pm$ 2,18	14,40	3,79	46,96
<b>T20</b>	30,43 $\pm$ 5,93	14,10	4,32	46,54
<b>T30</b>	41,14 $\pm$ 2,51	14,41	4,14	47,66

A pesar de la alta eficiencia de las matas microbianas en la eliminación del Cr del agua de mar, hay que tener en cuenta que un efluente es una mezcla compleja de sustancias en la que otros compuestos, incluyendo otros metales, podrían influir negativa o positivamente en la eliminación del Cr. La concentración de Cu, Pb y Zn en las matas microbianas expuestas a diferentes concentraciones de Cr fue similar, lo que indica que no hubo interacción entre estos metales y el Cr a las concentraciones utilizadas en el presente estudio. El Cr(III) es capaz de adsorberse fuertemente a las matas microbianas debido a su alta valencia y afinidad para desplazar protones de los hidroxilos superficiales (Huang et al. 2016). Sin embargo, el aumento de la concentración de Cr en la mata microbiana no indujo una liberación de Cu, Pb y Zn, probablemente porque no compiten por los sitios de unión en la mata



microbiana (Miranda et al., 2021). Además, los metales acumulados en los sedimentos pueden ser alterados químicamente por los organismos y convertidos en complejos organometálicos, por ejemplo, el Pb forma compuestos metilados en los sistemas acuáticos (Maccotta et al., 2016; Mason, 2012). Según otros investigadores, el Pb tiende a acumularse en el sedimento mediante formación y precipitación de compuestos carbonatados y adsorción a óxidos de Fe y Mn, por lo cual es posible que no compita con el Cr por los sitios de unión a los componentes de las matas microbianas (Dang et al., 2020; Tabelin et al., 2018).

En el espectro de **DRX** de las matas microbianas de los tratamientos con Cr se encontraron cuatro picos indexados a  $24,47^\circ$ ,  $33,12^\circ$ ,  $36,58^\circ$  y  $50,17^\circ$  (Fig. 4.7), los cuales coinciden con los principales picos encontrados para  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en los trabajos de Pilco Arias y Miranda Jinde (2020) y Habtemariam y Kereta (2020). Esta interpretación está respaldada por los diagramas de Pourbaix para Cr, publicados por Marimuthu et al. (2016) (Fig. 4.8) y Bonnand et al. (2013) (ver ítem 4.1), quienes determinaron que el Cr se encuentra en forma  $\text{Cr}_2\text{O}_3 / \text{Cr}(\text{OH})_3$  cuando el pH está entre 7 y 10 y el Eh entre -0,5 y 0,35 V. Por lo tanto, en base a las condiciones de pH y Eh medidas en las matas de los tratamientos con Cr ( $\sim 7,64$  pH y  $\sim -0,02$  V) y de acuerdo con los diagramas de Pourbaix, es termodinámicamente posible que el metal evaluado se encuentre en forma de óxido/hidróxido de Cr en las matas microbianas después de la exposición a Cr(III). Esta forma de Cr comúnmente exhibe baja movilidad y biodisponibilidad limitada, lo que lleva a la formación de complejos escasamente solubles con ligandos orgánicos o su adsorción en las superficies de óxidos de manganeso y hierro (Bruggmann et al., 2023; Cao et al., 2021). En las aguas superficiales se generan (hidr)óxidos de Fe y Mn, los cuales poseen una notable

capacidad de adsorción y coprecipitación de metales traza y, en consecuencia, tienden a precipitar en el fondo de la columna de agua (Forero-López et al., 2021).

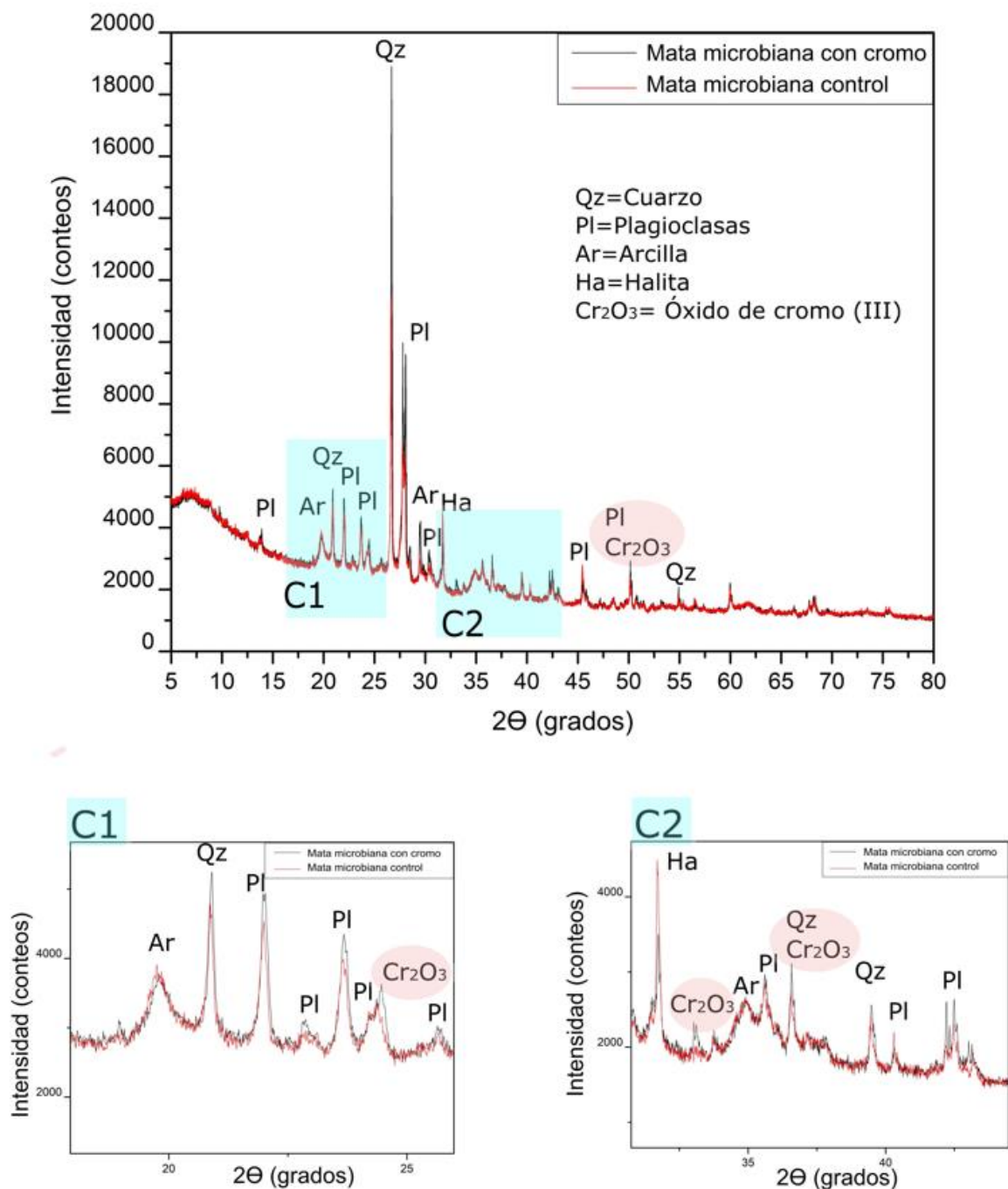


Fig. 4.7. Difracción de rayos X (DRX) en matas microbianas con y sin Cr añadido. C1 y C2 son la magnificación de las dos zonas sombreadas de color celeste en el espectro general.

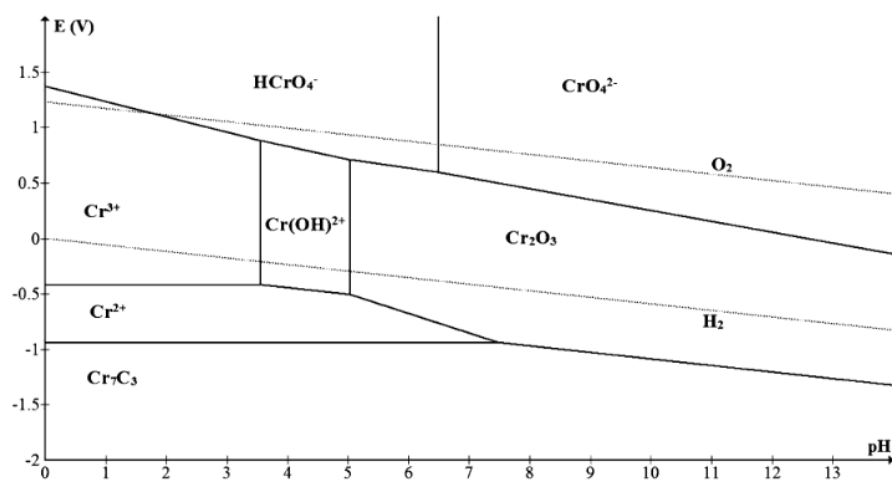


Fig. 4.8. Diagrama de Pourbaix para para carburo de Cr ( $\text{Cr}_7\text{C}_3$ ) en soluciones acuosas a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) (Marimuthu et al., 2016).

#### 4.3.2.2. El rol de los diferentes componentes de las matas microbianas en la eliminación de Cr(III)

El mapeo SEM-EDS de las muestras del control y del T2 no detectó Cr en la superficie de las matas microbianas. El tratamiento T15 mostró Cr depositado heterogéneamente sobre toda la superficie de la mata, con acumulaciones en zonas de la muestra donde se observaron diatomeas y detritos (Figs. 4.9 a, b; esquina superior derecha y una pequeña región central del área mapeada).

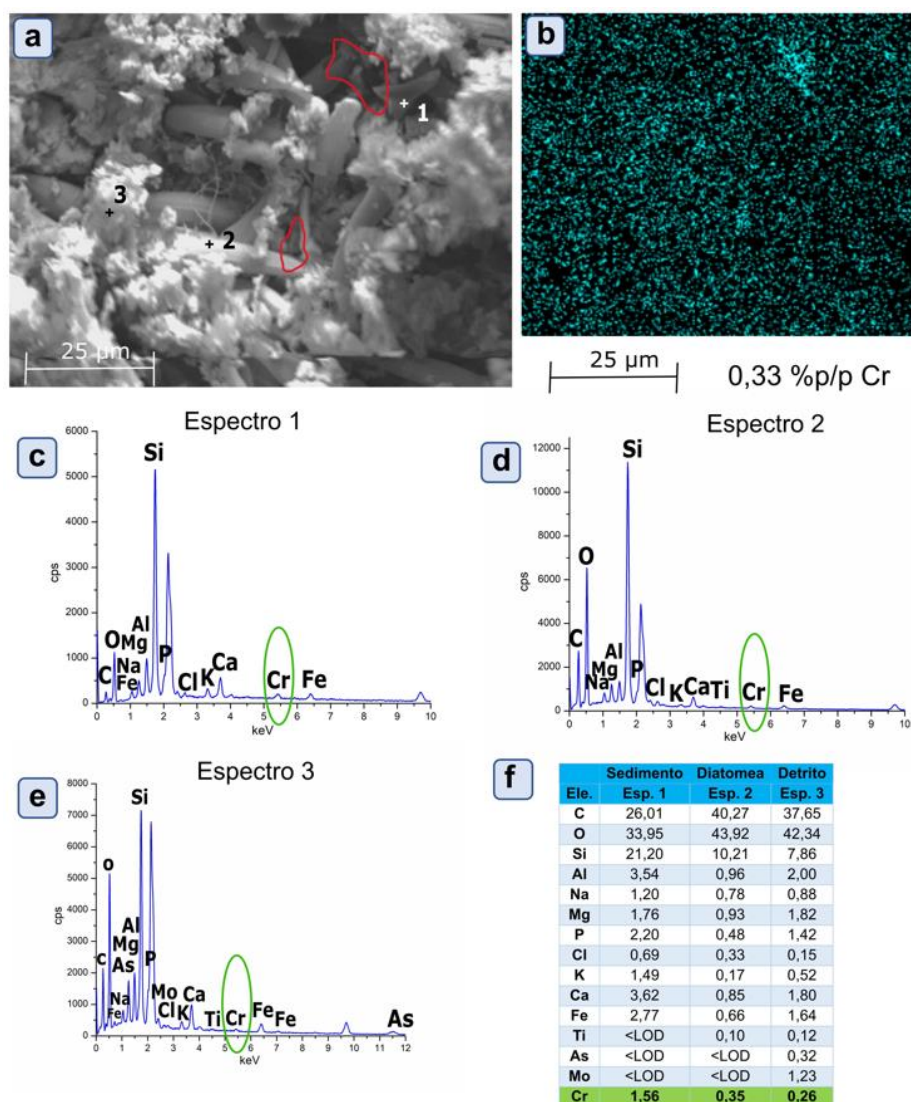


Fig. 4.9. Análisis SEM-EDS de la superficie de las matas microbianas del tratamiento T15. a) Imagen de barrido electrónico de la zona donde se realizaron el mapeo y los espectros. b) Mapeo de Cr en la superficie de las matas microbianas mostrando una mayor intensidad de azul en la esquina superior derecha y en una pequeña región central. c) Espectro 1 realizado sobre una partícula de sedimento. d) Espectro 2 realizado sobre una diatomea. e) Espectro 3 realizado sobre detrito. f) Datos semicuantitativos de la composición elemental de los diferentes componentes de la mata microbiana. Valores expresados en % en peso (%p/p). <LOD: valor por debajo del límite de detección.

Las áreas mapeadas de las matas microbianas para los tratamientos T10, T20 y T30 no mostraron acumulaciones evidentes de Cr en lugares específicos de las mismas, por lo que en las figuras sólo se muestran ejemplos para T30 (Figs. 4.10 a-d y Figs.4.11 b-d). Sin embargo, el Cr fue detectado como elemento minoritario en las áreas mapeadas de los tratamientos T10 (0,04-0,13 %p/p), T15 (<LOD-0,33 %p/p), T20 (<LOD-0,29 %p/p) y T30 (<LOD-0,16 %p/p), y los mapeos de Cr no mostraron

diferencias estadísticamente significativas en Cr %p/p entre tratamientos (GLM;  $\text{Chisq}=3,18$ ;  $\text{Df}=3$ ;  $p=0,36$ ).

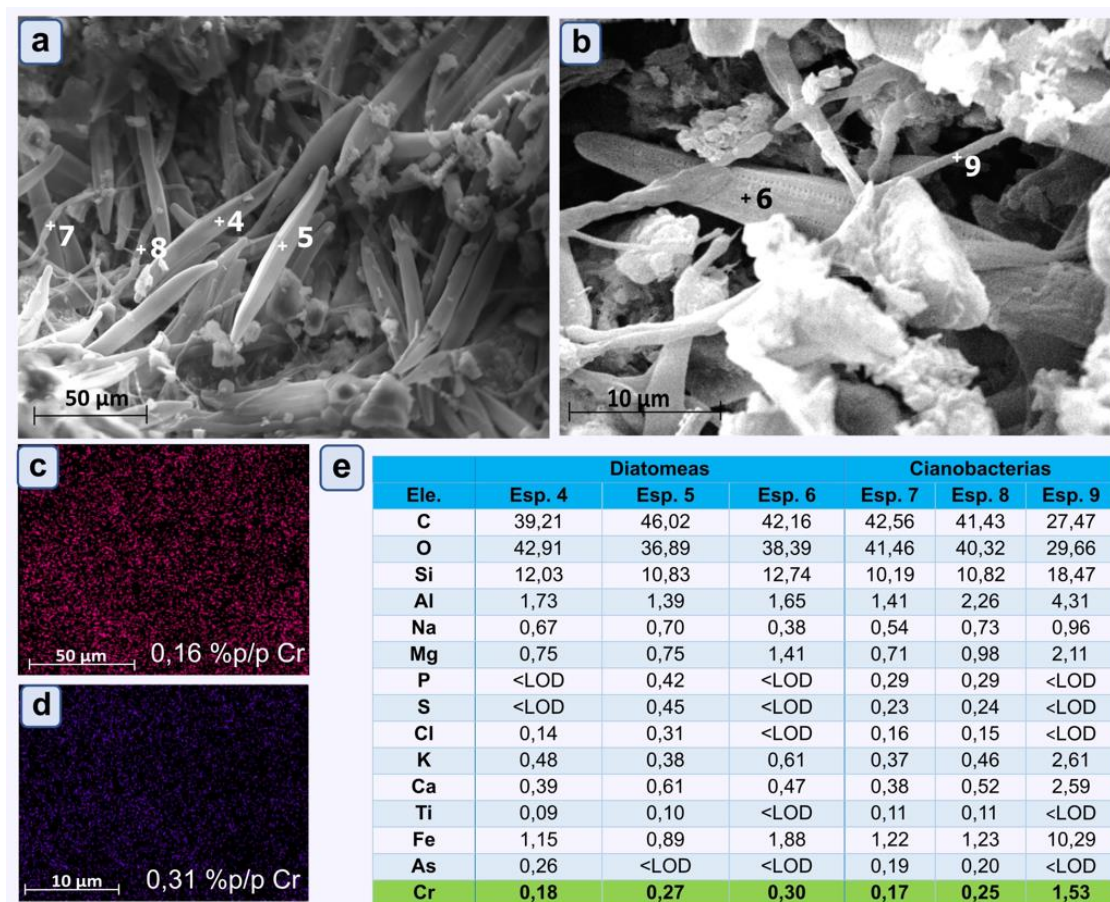


Fig. 4.10. Análisis SEM-EDS de la superficie de las matas microbianas tratadas con 30 mg Cr(III)/L (T30). a y b) Imágenes de barrido electrónico de las zonas donde se realizaron los mapeos y espectros. c) Mapeo de Cr en el área de la imagen a. d) Mapeo de Cr en el área de la imagen b. e) Datos semicuantitativos de la composición elemental de los diferentes componentes de las matas microbianas. Espectros 4, 5 y 6 realizados sobre diatomeas. Espectros 7, 8 y 9 realizados sobre cianobacterias. Valores expresados en % en peso (%p/p). <LOD: valor por debajo del límite de detección.



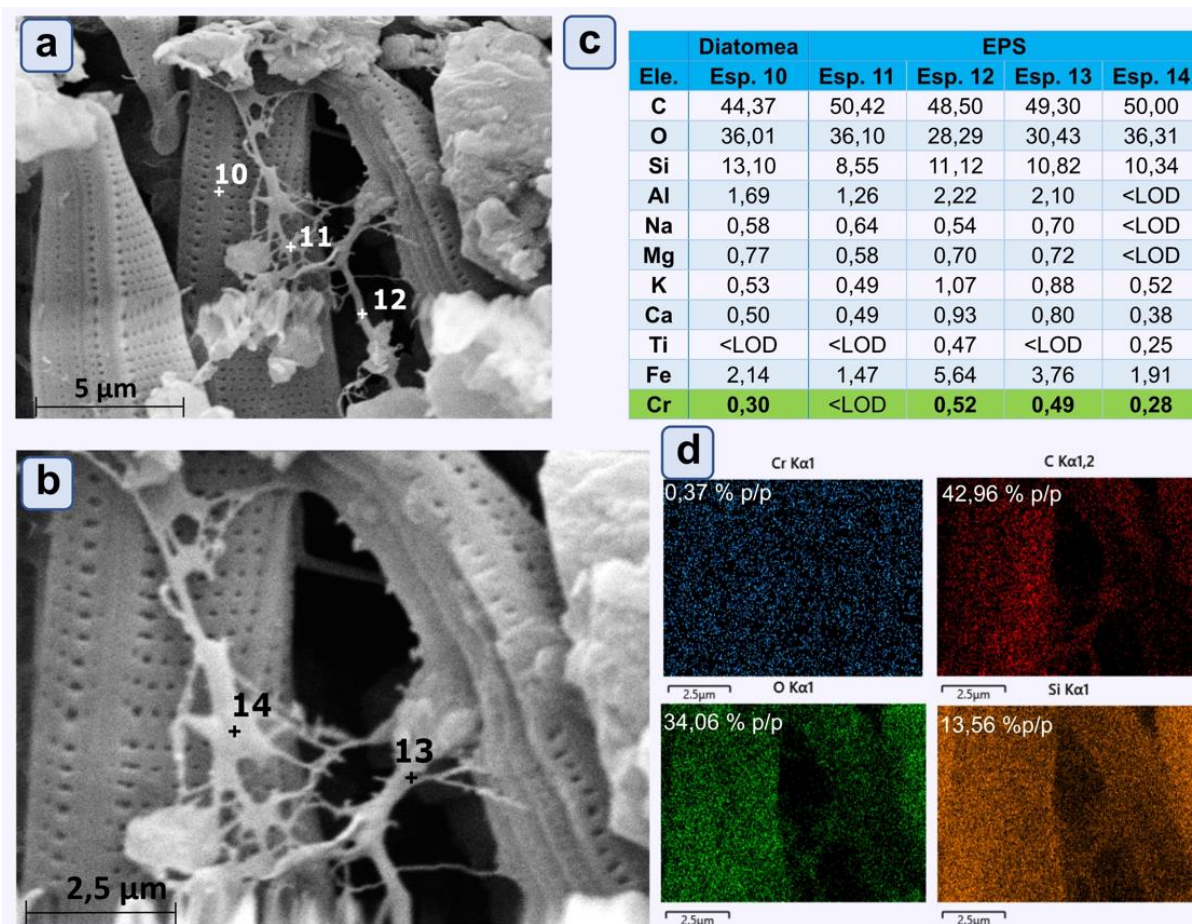


Fig. 4.11. Análisis SEM-EDS sobre la superficie de las matas microbianas tratadas con 30 mg Cr(III)/L (T30). a y b) Imágenes de barrido electrónico de las zonas donde se realizaron los mapeos y espectros. c) Datos semicuantitativos de la composición elemental de los diferentes componentes de la mata microbiana. d) Imágenes de mapeo de Cr, C, O y Si de la imagen b. Espectro 10 realizado sobre una diatomea. Espectros 11, 12, 13 y 14 realizados sobre EPS a diferente magnificación. Valores expresados en % en peso (%p/p). <LOD: valor por debajo del límite de detección.

A partir del análisis de espectros en puntos específicos de matas microbianas para los tratamientos T15, T20 y T30 (Tabla 4.3) se observó la distribución del Cr en los distintos componentes. En T15, los espectros mostraron la presencia de Cr sobre células de diatomeas y sobre detrito y partículas de sedimento, con el mayor %p/p en el sedimento (Fig. 4.9). En T20, se detectó Cr sobre un filamento de cianobacteria y en partículas de sedimento, sin detección positiva de presencia de Cr al mapear zonas con diatomeas y detritos (Tabla 4.3). En T30, se encontró Cr sobre diatomeas, cianobacterias y EPS (Fig. 4.10 e y Fig. 4.11 c), pero no se detectó sobre detritos o partículas de sedimento en ninguno de los espectros realizados (Tabla 4.3). No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas en el %p/p de Cr entre los diferentes componentes de las matas microbianas (GLM; Chisq=4,13; Df=4, p=0,39).

Tabla 4.3. Datos semicuantitativos de Cr de los análisis SEM-EDS en puntos específicos de cada componente de las matas microbianas. Los valores indican la media  $\pm$  error estándar del %p/p de Cr excepto para las cianobacterias de T20 donde se encontró un único filamento de cianobacteria. <LOD: valor por debajo del límite de detección. Media  $\pm$  error estándar.

	T15	T20	T30
<b>Sedimento</b>	0,83 $\pm$ 0,73	0,24 $\pm$ 0,14	<LOD
<b>Detritos</b>	0,18 $\pm$ 0,05	<LOD	<LOD
<b>Diatomeas</b>	0,16 $\pm$ 0,06	<LOD	0,30 $\pm$ 0,08
<b>Cianobacterias</b>	<LOD	1,07	0,43 $\pm$ 0,28
<b>EPS</b>	<LOD	<LOD	0,35 $\pm$ 0,10

El Cr se encontró depositado sobre diatomeas, cianobacterias, EPS, detritos y partículas de sedimento, sin mostrar preferencias entre estos componentes de las matas microbianas. Li et al. (2018) observaron que el Cr(III) podía unirse a la superficie de las células de *Bacillus* sp. por coordinación con grupos funcionales carboxilo o hidroxilo. Zhadra et al. (2021) revelaron que los principales grupos funcionales responsables de la unión de los iones Cr(III) son los grupos carboxilo, hidroxilo, amino y fosfato en la superficie de la cianobacteria *Spirulina platensis*. De este modo, las interacciones electrostáticas y la variedad de grupos funcionales presentes en la superficie celular y los componentes abióticos de las matas microbianas, como los grupos carboxilo, amina e hidroxilo permitirían la unión del metal mediante el proceso de adsorción (Li et al., 2021; Ma et al., 2018).

El análisis EDS del EPS mostró una composición elemental parecida a la de las cianobacterias y diatomeas. La similitud puede atribuirse a la capacidad de las EPS para atrapar y aglutinar partículas de sedimentos, minerales y gran cantidad de MO descompuesta por bacterias heterótrofas (Stal, 2012). Blanco et al. (2019), tras aislar y purificar EPS de matas microbianas, demostraron mediante análisis de espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) que C, O, N, S y Ca son

los elementos constituyentes. Sin embargo, otros elementos (Si, Al, S y Mg) pueden estar presentes también en las EPS de muestras ambientales de matas microbianas debido a sus propiedades adhesivas (Del Buey et al., 2021; Perri et al., 2017; Shi y Liu, 2021).

Según los mapeos realizados en este trabajo, el patrón de distribución de Si, C y O fue similar en diatomeas y EPS. En este sentido, es importante destacar que los sedimentos de la planicie de marea del estuario de Bahía Blanca están compuestos predominantemente por cuarzo y feldespato, los cuales contienen Si en su estructura cristalina (Cuadrado y Pizani, 2007; Forero-López et al., 2021) y podrían ser los responsables de la presencia de Si en las EPS y en la superficie de las cianobacterias. Según Ma et al. (2018) el Si encontrado en la superficie de las diatomeas corresponde a enlaces Si-O-C, O-Si-C y Si-OH, y los  $\text{SiO}^-$  cargados negativamente y disociados del Si-OH, los cuales son asociados a la unión a metales tales como Ca, Al, Ti (Huang et al., 2007; Reid et al., 2021).

#### 4.3.2.3. *Parámetros fisicoquímicos y contenido de MO*

Los valores de **pH en las matas microbianas** no mostraron diferencias significativas entre tratamientos al inicio del ensayo ( $F=0,122$ ;  $p=0,98$ ) ni al final del mismo ( $F=3,041$ ;  $p=0,05$ ). Aunque se puede observar una leve tendencia a un aumento de pH al final del ensayo para todos los tratamientos (Tabla 4.7).

Respecto al **pH de las soluciones**, las correspondientes al control permanecieron alcalinas durante todo el ensayo, mientras que en las soluciones de Cr el pH fue más ácido a mayor concentración de Cr, tanto al principio como al final del ensayo (Tabla 4.7). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el pH de las soluciones al final del ensayo entre los tratamientos ( $F=18,883$ ;  $p<0,0001$ ), fueron significativamente más bajos en los tratamientos T20 y T30 que en el control y en los



restantes tratamientos ( $p < 0,005$ ). Bajo condiciones de pH entre 4 y ~9 y valores de Eh similares a los observados en este ensayo, el Cr tiende a formar compuestos de hidróxido de Cr(III) estables ( $\text{Cr(OH)}_2^+$ ,  $\text{Cr(OH)}_2^{2+}$  y  $\text{Cr(OH)}_3$ ) mediante el proceso de hidrólisis (Bonnand et al., 2013).

Tabla 4.7. Valores de pH y Eh (mV) en las matas microbianas (MM) y en las soluciones (sol.) al principio (a) y al final (b) del ensayo, contenido de MO % en las matas microbianas al final del ensayo, y valores de Eh y contenido de MO en las matas microbianas de muestras de campo. Los valores indican la media  $\pm$  error estándar para todas las variables excepto para el pH inicial de las soluciones.

	pH MM	pH sol.	Eh MM	Eh sol.	MO
<b>Campo</b>	-	-	-35,2 $\pm$ 65,52	-	8,778 $\pm$ 1,122
<b>Control-a</b>	7,40 $\pm$ 0,41	7,89	141,00 $\pm$ 34,20	124,67 $\pm$ 29,33	-
<b>Control-b</b>	7,64 $\pm$ 0,20	7,93 $\pm$ 0,06	-348,33 $\pm$ 40,42	152,33 $\pm$ 2,40	11,75 $\pm$ 3,75
<b>T2-a</b>	7,68 $\pm$ 0,19	7,04	178,00 $\pm$ 28,92	2,00 $\pm$ 32,96	-
<b>T2-b</b>	7,91 $\pm$ 0,15	7,99 $\pm$ 0,01	-88,33 $\pm$ 75,61	142,00 $\pm$ 7,51	6,23 $\pm$ 0,51
<b>T10-a</b>	7,68 $\pm$ 0,30	2,49	361,00 $\pm$ 12,74	-117,33 $\pm$ 52,82	-
<b>T10-b</b>	7,80 $\pm$ 0,09	7,73 $\pm$ 0,04	-77,33 $\pm$ 38,83	135,00 $\pm$ 13,11	8,06 $\pm$ 1,20
<b>T15-a</b>	7,64 $\pm$ 0,50	2,17	423,33 $\pm$ 5,84	50,00 $\pm$ 48,50	-
<b>T15-b</b>	7,64 $\pm$ 0,11	6,97 $\pm$ 0,31	-16,00 $\pm$ 44,77	145,67 $\pm$ 11,46	7,03 $\pm$ 0,50
<b>T20-a</b>	7,37 $\pm$ 0,47	1,91	441,33 $\pm$ 4,62	43,67 $\pm$ 60,38	-
<b>T20-b</b>	7,64 $\pm$ 0,09	6,09 $\pm$ 0,62	-30,00 $\pm$ 58,77	187,00 $\pm$ 15,82	7,75 $\pm$ 0,74
<b>T30-a</b>	7,43 $\pm$ 0,57	1,60	458,33 $\pm$ 6,69	68,00 $\pm$ 26,16	-
<b>T30-b</b>	7,64 $\pm$ 0,06	4,39 $\pm$ 0,39	-19,67 $\pm$ 63,25	216,00 $\pm$ 10,69	7,71 $\pm$ 0,46

Se observó un aumento del pH en las soluciones de Cr al final del ensayo en todos los tratamientos (Tabla 4.7). El metabolismo microbiano desempeña un papel importante en la modificación del pH del medio, ya que varios procesos implican la producción o el consumo de protones (Srinivasan y Mahadevan, 2010). En la respiración celular durante el metabolismo aeróbico, los protones intracelulares junto con los electrones transferidos por la cadena de transporte de electrones se combinan con el oxígeno dando lugar a la producción de agua. Además, la producción de ácidos orgánicos y bicarbonato por parte de los microorganismos puede amortiguar los cambios de pH (Jin y Kirk, 2018; Srinivasan y Mahadevan, 2010).

Los valores de **Eh** medidos en **matas microbianas** en muestras de **campo** (n=5) variaron de -244 a 137 mV. El potencial redox es una variable dinámica en sedimentos costeros y estuarinos ya que varía como resultado de los cambios en el nivel del agua (Catallo, 1999). La superficie de contacto entre un sólido y un fluido da lugar a la llamada **doble capa eléctrica**, este es un modelo que permite explicar que la interacción entre las partículas del sólido y los iones de la solución está gobernada por las fuerzas electrostáticas. El fluido conduce corriente eléctrica a través del movimiento de iones llevando a la adsorción química de los iones presentes en el fluido a la superficie del sólido. En el modelo se considera que la carga superficial del sólido es negativa y un exceso neto de cationes quedan distribuidos cerca del contacto entre el sólido y el fluido. Esta doble capa, donde las cargas del electrolito se separan, se subdivide en una capa adsorbida o capa de Stern y una capa difusa. En la capa de Stern las moléculas e iones quedan inmobilizadas, mientras que en la capa difusa las cargas son móviles (Gauzellino et al., 2010).

Los valores medios de **Eh** en las **matas microbianas** fueron positivos al principio del **ensayo** y negativos al final del mismo, indicando que las matas microbianas se convierten en un medio reductor al finalizar el experimento (Tabla 4.7). Esto ocurre debido a que durante el período de aclimatación las matas microbianas sólo se mantienen húmedas pero no inundadas, entonces no ocurre la formación de la doble capa al momento inicial de medir los parámetros. Luego, la medición de Eh al final del período de inundación representa lo ocurrido en el modelo de la doble capa (superficie de la mata microbiana cargada negativamente).

Al principio del ensayo se encontraron valores de Eh estadísticamente más altos en T20 y T30 que en las muestras de campo ( $H=20,568$ ;  $p<0,01$ ). Al final del ensayo se encontraron valores menos negativos en los tratamientos con Cr que en el control

( $F=5,284$ ;  $p<0,01$ ). El Cr(III) se comporta como un catión en la solución, lo que significa que puede ser atraído hacia la superficie de las partículas de la mata con carga negativa. Esta interacción electrostática puede influir en la distribución de cargas de la doble capa eléctrica y, por lo tanto, en el potencial de la interfase sólido-líquido.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el **Eh de la solución** entre los tratamientos al principio del ensayo ( $F=3,518$ ;  $p<0,05$ ) y al final del ensayo ( $F=8,256$ ;  $p<0,01$ ). El Eh en las soluciones al inicio del ensayo fue significativamente menor en el tratamiento T10 que en el control y que en los restantes tratamientos ( $p<0,05$ ). El Eh en las soluciones al final del ensayo fue significativamente mayor en los tratamientos T20 y T30 que en el control y los tratamientos restantes ( $p<0,05$ ). En este caso los valores de Eh medidos dependen principalmente del pH, la mayor protonación ocurrida en soluciones ácidas determina valores más altos de Eh (Straub et al., 2001).

El contenido de MO en las matas microbianas no fue estadísticamente diferente entre los tratamientos, el control y las muestras de campo (GLM,  $\text{Chisq}=9,97$ ;  $\text{Df}=6$ ;  $p=0,13$ ) (Tabla 4.7). El Cr(III) tiende a precipitar y/o adsorberse en los minerales, especialmente en los aluminosilicatos pudiendo formar complejos con la materia orgánica. Estos procesos controlan la movilidad del Cr(III) y dependen del pH (Gorny et al., 2016).

#### 4.3.2.4. *Efectos sobre la comunidad microfitobentónica*

La concentración de **clorofila a** fue significativamente mayor en las matas microbianas de todos los tratamientos en comparación con las muestras de campo ( $F=15,550$ ;  $p<0,0001$ ) (Fig. 4.12 a). Los tratamientos T15 y T20 mostraron un

contenido de clorofila *a* significativamente mayor que los tratamientos control y T2 ( $p < 0,05$ ).

Tanto el nitrógeno como el fósforo son nutrientes limitantes de la producción primaria en ambientes marinos costeros (Andersen et al., 2020; Donald et al., 2011; Fernández, 2017), y las matas microbianas a menudo experimentan deficiencia de nitrógeno debido a su densa biomasa (Fernández, 2017). Todas las formas de nitrógeno aumentan la abundancia de algas y la producción de clorofila *a*, por lo tanto, es probable que el aumento significativo de la concentración de clorofila *a* observado haya sido generado por el nitrógeno suministrado en forma de nitrato, ya que en este ensayo se utilizó nitrato de Cr como fuente de Cr y cada tratamiento recibió una concentración de nitrógeno diferente y mayor cuando mayor era la concentración de Cr (ver inciso 4.3.1.1).

Contrariamente, otros autores han afirmado que la exposición a metales, incluidos Cr(VI), Zn y Pb, puede disminuir la absorción de nutrientes como nitratos y fosfatos en las cianobacterias (Tiwari et al. 2020; Yadav et al. 2016). Sin embargo, estos estudios se realizaron con cultivos unialgales, a diferencia de nuestro trabajo en el que utilizamos matas microbianas completas con sedimento y todo su consorcio microbiano tal como se encuentra en el ambiente. Es probable que el sedimento, la MO y las EPS proporcionen protección a las cianobacterias y diatomeas.

La concentración de clorofila *a* en el tratamiento T30 fue significativamente menor que en el tratamiento T15 ( $p < 0,05$ ) y no se encontraron diferencias significativas con respecto al control. Esta observación sugiere la posibilidad de que la aplicación de una concentración más alta de Cr (30 mg/L) haya ejercido efectos adversos más prominentes que los beneficios derivados de la adición de nitrato.

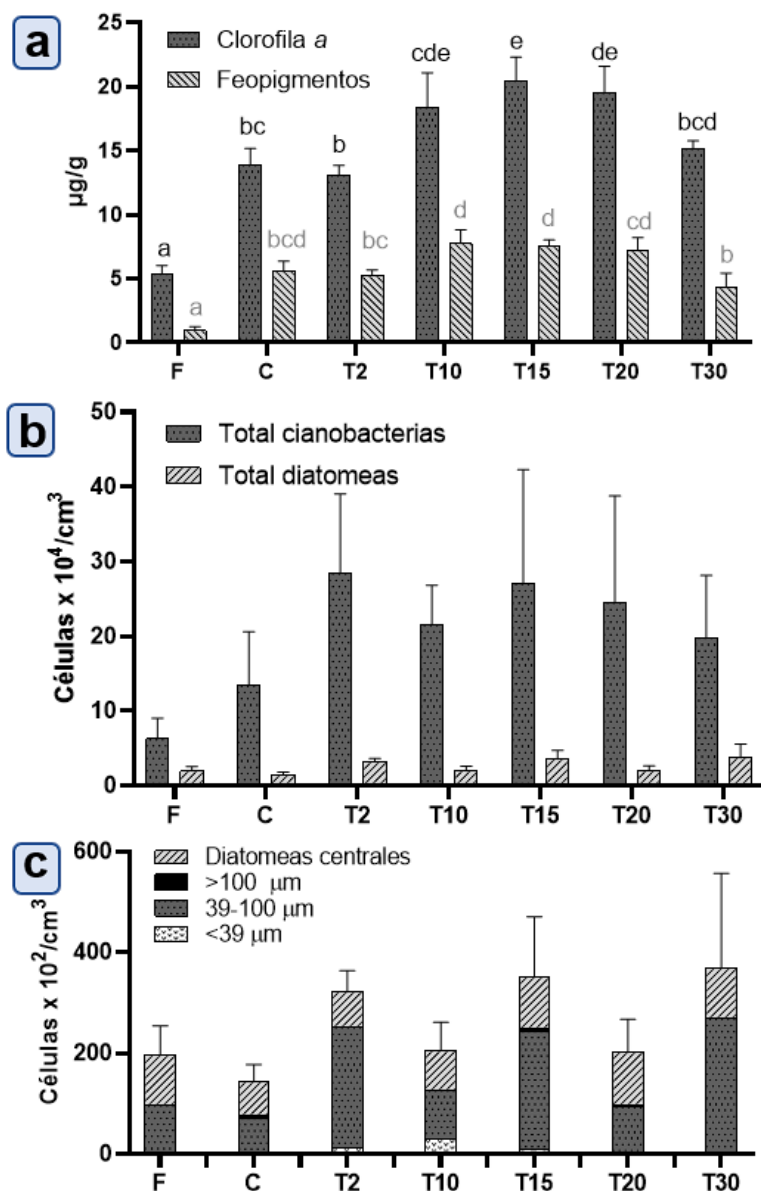


Fig. 4.12. Biomasa microfítobentónica en muestras de matas microbianas de campo (F), control (C) y tratamientos (T). a) Concentraciones de clorofila *a* y feopigmentos (µg/g de peso seco), b) Abundancia de diatomeas y cianobacterias (número de células x 10<sup>4</sup>/cm<sup>3</sup> de peso húmedo). c) Abundancia de diatomeas céntricas y diatomeas pennadas de los rangos de tamaño <39µm, 39-100µm y >100µm (número de células x 10<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> de peso húmedo). Letras diferentes en cada conjunto de datos indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05 LSD Fisher). Media ± error estándar.

Bere et al. (2012) observaron una disminución en la concentración de clorofila *a* en comunidades perifíticas expuestas a una mezcla de Cr(III) y Cd (10 mg/L de cada metal) utilizando cloruro de Cr hexahidratado (CrCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) como fuente de Cr(III). Sin embargo, el Cr(III) atenuó los efectos tóxicos producidos por el Cd en la comunidad perifítica. Por otro lado, Shokravi y Bahavar (2021) observaron un aumento del

crecimiento, la producción de pigmentos y la actividad de los fotosistemas y ficobilisomas en la cianobacteria *Synechocystis* sp. a una concentración de 0,03 mg/L Cr(VI). Sin embargo, descubrieron que concentraciones mayores dañan temporalmente la estructura de los fotosistemas y de los ficobilisomas. Por ende, los efectos del Cr pueden ser variables dependiendo de las concentraciones aplicadas y de la resistencia de los organismos que son expuestos al metal.

En nuestro estudio, el aumento de clorofila *a* en los tratamientos con Cr estuvo acompañado por un aumento de la concentración de **feopigmentos**, que es un producto de degradación de la clorofila. Del mismo modo, se encontraron diferencias significativas en la concentración de feopigmentos ( $F=13,652$ ;  $p<0,01$ ), que mostró valores más bajos en las matas microbianas de campo que en las muestras de todos los tratamientos ( $p<0,01$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con Cr (Fig. 4.12 a).

Aunque la abundancia de **cianobacterias totales** (c) y **diatomeas totales** (d) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $(F(c)=0,909$ ;  $p(c)=0,513$  y  $F(d)=0,942$ ;  $p(d)=0,493$ ), pudo observarse un aumento del número total de cianobacterias en los tratamientos con Cr, lo que podría explicar el aumento de la clorofila *a* (Figs. 4.12 b, c). La estructura de la comunidad no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de campo y los tratamientos (ANOSIM;  $R=0,10$ ;  $p=0,16$ ).

Los resultados obtenidos claramente indican que no se observa un efecto tóxico del Cr(III) para la comunidad microfitobentónica considerando las concentraciones empleadas en este ensayo. Esto posiblemente se debe a que el Cr en su estado trivalente es insoluble, lo que impide su ingreso a las células. Además, su capacidad de adsorción a todos los componentes de las matas microbianas (EPS, pared celular

de todos los microorganismos, detritus y sedimento), junto con su tendencia a formar óxidos e hidróxidos de Cr en el sedimento, contribuyen a reducir su disponibilidad para la biota.

## CAPÍTULO 5

### REMOCIÓN DE Cr(VI) BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y SALINIDAD

#### 5.1. INTRODUCCIÓN

El agua de mar en condiciones naturales usualmente presenta **concentraciones** trazas de **Cr(VI)**, con valores que pueden alcanzar hasta 0,36 µg/L (Bonnand et al., 2013). No obstante, la contaminación industrial y urbana ha provocado un aumento de la concentración de Cr en ríos y áreas costeras. En ríos y estuarios, el Cr(VI) constituye entre el 27% y el 100% del Cr total presente con un valor medio del 54% (Comber y Gardner, 2003). Las industrias que frecuentemente exhiben elevadas concentraciones de Cr(VI) en sus efluentes incluyen las fábricas de automóviles (12,2 - 488,5 mg Cr(VI)/L) y las plantas de galvanoplastia (227 - 887 mg Cr(VI)/L) (Sarin et al., 2006; Sibi, 2016; Verma et al., 2013). El Cr(VI) es soluble en agua en la forma oxidada de  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{CrO}_3\text{Cl}^-$ , lo que lo hace biológicamente disponible en los ecosistemas debido a su permeabilidad en las membranas biológicas (Ni et al., 2020; Wang et al., 2016). La acumulación de Cr en el medio afecta a los organismos acuáticos y a la dinámica y estructura de los ecosistemas, lo que podría tener repercusiones indirectas en la salud del hombre (Tang et al., 2021).

Los compuestos hexavalentes de Cr pueden formar parte de los efluentes, ríos y arroyos que finalmente terminan su curso en zonas costeras marinas o incluso mar abierto. Estos compuestos, tales como el cromato de sodio, el cromato de potasio, el dicromato de potasio, el dicromato de amonio y el trióxido de cromo, fueron clasificados como **cancerígenos** para el ser humano por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (El Nemr et al., 2015; IARC, 1990). La causa de la carcinogénesis



del Cr(VI) en mamíferos terrestres es la destrucción de los dobles enlaces en el ADN de células pulmonares y la inhibición de su reparación (Browning et al., 2016; Tang et al., 2021). Además, durante la reducción del Cr(VI) dentro de las células se producen radicales Cr(V) altamente inestables y especies reactivas de oxígeno (ROS). El estrés oxidativo generado puede inducir daños en el ADN y formar aductos de Cr-DNA (Chakraborty et al., 2022; Mitra et al., 2017; Tang et al., 2021). En mamíferos marinos, como por ejemplo en las ballenas, es difícil detectar el cáncer debido a lo reducidas que son sus poblaciones. Sin embargo, se han realizado estudios con células pulmonares y testiculares en las que se observaron aberraciones cromosómicas durante la división celular inducidas por Cr(VI) (Wise et al., 2008). En algas y bacterias, el Cr(VI) suele producir cambios en la densidad celular, en el tamaño celular, en la reproducción, en la concentración de pigmentos fotosintéticos, en la capacidad fotosintética y cambios en la estructura comunitaria (Sathicq y Gómez, 2018; Oliveira de Souza et al., 2022).

Ante tantos efectos adversos, es una necesidad urgente la remoción de Cr(VI) de los efluentes urbanos e industriales antes de que sean liberados al ambiente. Los efluentes industriales que contienen Cr, como los generados por curtiembres y procesos de galvanoplastia, suelen tener bajos pH (2,3 - 4,95), salinidades bajas a intermedias (1,48 - 47,50 UPS) y concentraciones de Cr(VI) muy variables (25 - 1000 mg/L) (Cavaco et al., 2007; Sarin et al., 2006; Shashirekha et al., 2015; Sibi, 2016; Verma et al., 2013). Por lo tanto, es de vital importancia evaluar la eficiencia de remediación de una tecnología ante diversas **condiciones fisicoquímicas**, ya que permitirían predecir su comportamiento ante diferentes tipos de efluentes.

Por lo general, las **matas microbianas** situadas en la región intermareal alta toleran salinidades elevadas (es decir, 60 - 200 UPS) y poseen valores de pH de entre

7,95 y 8,26 (Abed et al., 2007; Morales Pontet et al., 2023). Estas características las hacen adecuadas para la remediación de efluentes con niveles elevados de salinidad y ligeramente alcalinos, pero se desconoce su capacidad para tolerar condiciones de bajo pH y salinidad, como las presentes en los efluentes con alto contenido de metales (Adakole y Abolude, 2009; Sarin et al., 2006). Por tal motivo, este es el primer estudio que evalúa la exposición de las matas microbianas a Cr(VI) bajo diferentes condiciones de pH y salinidad con la finalidad determinar su capacidad de tolerar dichas condiciones fisicoquímicas a las que podrían exponerse al usarlas como agente de remediación de metales.

La **salinidad** es un factor importante que afecta el movimiento y la redistribución de los metales. Un aumento de la salinidad puede conducir a una disminución en la acumulación de metales pesados, principalmente porque los cationes primarios como Ca y Mg en la solución salina pueden reemplazar a los metales adsorbidos en el sedimento, lo que lleva a originarse el proceso de desorción (Liu et al., 2023). Las variaciones en las condiciones de pH y Eh pueden modificar el estado de oxidación de los metales, dando lugar a la formación de diversas especies químicas (El Nembr et al., 2015; Mohapatra et al 2017; Sapyen et al., 2022; Unceta et al., 2010), el Cr en particular es muy sensible a las alteraciones de estas variables. Las condiciones ácidas y el alto Eh contribuyen a la estabilización del Cr(III), mientras que en condiciones alcalinas el Eh disminuye, conduciendo así a la estabilización del Cr(VI) (Unceta et al., 2010). El cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) predomina en un rango de pH de 6,5 a 14, mientras que el cromato de hidrógeno ( $\text{HCrO}_4^-$ ) y el dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) predominan a valores de pH <6,5 (Bonnand et al., 2013; Unceta et al., 2010). Por lo tanto, las condiciones de pH y Eh, que influyen en la forma en la que el Cr se encuentra, pueden

afectar la eficiencia de remoción y deben considerarse al seleccionar una tecnología adecuada para tratar los efluentes contaminados con Cr(VI).

Los **objetivos** de este capítulo fueron:

- Evaluar el efecto de diferentes condiciones de pH (2, 4 y 8) y salinidad (2, 15, 33 UPS) en la remoción de Cr(VI) por las matas microbianas.
- Evaluar los efectos combinados de la exposición a Cr(VI) y las diferentes condiciones de pH (2, 4 y 8) y salinidad (2, 15 y 33 UPS) sobre la comunidad microfitobentónica.
- Evaluar el contenido de materia orgánica y los parámetros físicoquímicos (pH, Eh y salinidad) de las matas microbianas y las soluciones de Cr(VI) como condicionantes en la remoción de Cr.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Preparación de soluciones de Cr(VI)

Una solución madre de 500 ppm de Cr(VI) fue preparada a partir de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) (ANEDRA). Para ello se secó aproximadamente 1 g de  $K_2Cr_2O_7$  en estufa a 60 °C durante 2 - 3 horas. Posteriormente se pesaron 141,45 mg del reactivo y se disolvió con agua bidestilada. Se llevó la dilución a un matraz de 100 mL, se le añadieron 5 gotas de HCl para llevarlo a  $pH \leq 2$  y se aforó con agua bidestilada.

Se preparó agua a diferentes salinidades (2, 15 y 33 UPS) mediante dilución de agua de mar filtrada (ver Capítulo 2, ítem 2.3) con agua bidestilada hasta alcanzar las condiciones de salinidad deseadas.

A partir de la solución madre de Cr y el agua a diferentes salinidades se prepararon soluciones de 15 mg Cr(VI)/L. El valor mencionado fue elegido por ser la concentración máxima en la cual el Cr fue óptimamente eliminado durante el ensayo de remoción de Cr(III) a diferentes concentraciones (Capítulo 4, ítem 4.3.2.1). Posteriormente, las soluciones resultantes fueron subdivididas en botellas donde los valores de pH fueron ajustados a 2, 4 y 8 usando HCl y NaOH, y se conservaron en heladera hasta su uso. Se generaron un total de nueve soluciones de 15 mg Cr(VI)/L por la combinación de las tres condiciones tanto de pH (2, 4 y 8) como de salinidad (2, 15 y 33 UPS).

### 5.2.2. Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en cámara de cultivo bajo condiciones de luz y temperaturas similares a la registradas en el estuario de Bahía Blanca durante el invierno, debido a que las matas microbianas fueron recolectadas en el mes de julio del 2021. Se mantuvo una temperatura mínima de 5 °C y una máxima de 18 °C y se ajustó a un ciclo de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad (detalles en Capítulo 2, ítem 2.4).

Luego de tres días de aclimatación, las matas microbianas (n=30) fueron expuestas a las soluciones de Cr(VI) en sus diferentes combinaciones de pH y salinidad indicadas anteriormente. Se evaluó la interacción entre las variables resultando en un total de 9 tratamientos y un control. Todas las condiciones se ensayaron por triplicado (Fig. 5.2). Cada réplica del control se inundó con agua de mar filtrada bajo condiciones normales de pH (8,2) y salinidad ( $\approx$  34 UPS) mientras que cada réplica de los tratamientos fue inundada con 200 mL de la solución correspondiente. Las matas del control y los tratamientos se inundaron durante tres horas al día por cinco días (tiempo

total de inundación: 15 horas). Después de cada inundación se extrajo la solución Cr con una jeringa y se guardó en botella de plástico (una por cada réplica) hasta el siguiente día de inundación (Capítulo 4, Fig. 4.5). Las soluciones fueron las mismas durante todo el ensayo. Diariamente se midió el pH de las soluciones, el cual fue modificado con HCl o NaOH cuando fuera necesario para restaurar la solución al pH correspondiente (2, 4 u 8). Tanto los parámetros de salinidad, Eh y pH en matas microbianas, como la salinidad y el Eh de las soluciones fueron medidos los días inicial y final del ensayo.

Al finalizar el experimento, todas las soluciones (n=30) fueron almacenadas en botellas debidamente acondicionadas, llevadas a pH 2 o menor con HCl para su preservación y mantenidas a 4° C hasta la posterior determinación analítica de Cr total (ver Capítulo 2, ítem 2.5.1). Una vez extraídas las soluciones de inundación en cada réplica, las matas microbianas se dividieron en submuestras para los análisis de concentración de Cr total, contenido de MO, concentración de clorofila a, feopigmentos y abundancia de cianobacterias y diatomeas (ver Capítulo 2, ítems 2.5 y 2.6).

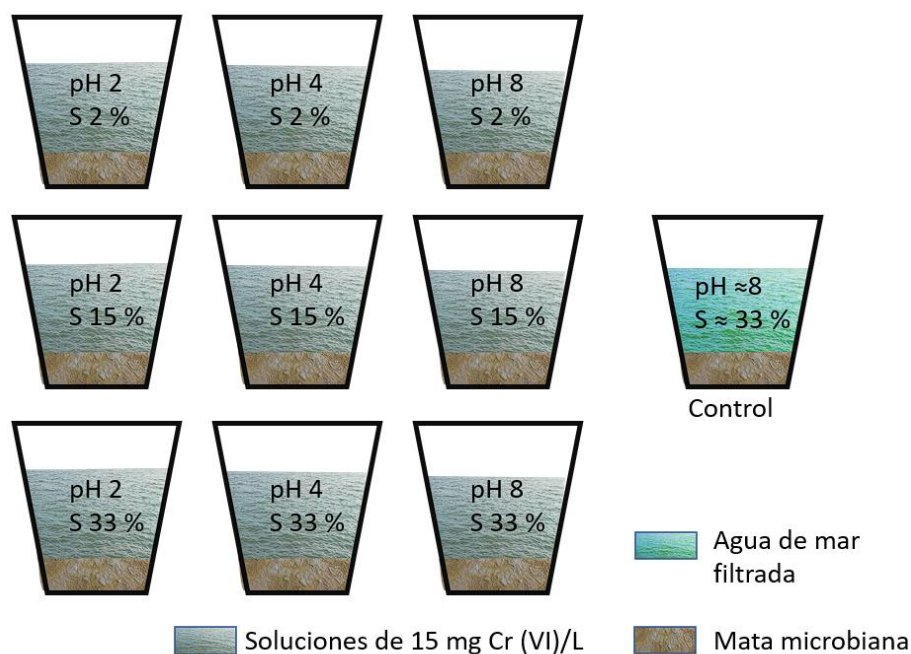


Fig. 5.2. Diseño experimental para evaluar la remoción de Cr(VI) bajo diferentes condiciones de pH y salinidad.

### 5.2.3. Análisis estadísticos

El modelo GLM con distribución Beta fue realizado para comparar la eficiencia de remoción de Cr total y el contenido de MO (%) ante las diferentes condiciones de pH y de salinidad; las comparaciones *a posteriori* se realizaron con la prueba de Tukey.

Se empleó ANOVA de dos vías para comparar la concentración de Cr total en las soluciones y matas microbianas, la concentración de clorofila *a* y feopigmentos, y la abundancia de cianobacterias y diatomeas en matas microbianas con respecto a las dos variables fisicoquímicas seleccionadas: salinidad y pH. Se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para comparar el Eh final en las soluciones y en las matas microbianas entre las diferentes condiciones de salinidad y pH. Los datos de abundancia de cianobacterias y diatomeas se transformaron empleando la raíz cúbica, mientras que los de clorofila *a* y feopigmentos se transformaron con la función logarítmica para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Finalmente, para evaluar los efectos de los tratamientos sobre la estructura de la comunidad microfítobentónica se realizó un análisis de similitud cruzada de dos vías (ANOSIM). En este análisis, se transformaron los datos con raíz cuadrada, se empleó una matriz de similitud de Bray Curtis y se realizaron 999 permutaciones.

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.3.1. Eliminación de Cr(VI) a diferentes salinidades y pH

La remoción de Cr(VI) por las matas microbianas expuestas a diferentes condiciones de pH y salinidad mostró eficiencias entre 59,27% y 76,53% (Fig. 5.3). La eficiencia del proceso de eliminación se vio influenciada significativamente por la variación del pH (GLM;  $\text{Chisq}=32,76$ ;  $p<0,01$ ) pero no por la salinidad (GLM;  $\text{Chisq}=1,10$ ;  $p=0,58$ ). Las matas microbianas removieron el Cr de las soluciones a pH 2 más eficientemente que a pH 4 y 8 ( $p<0,01$ ).

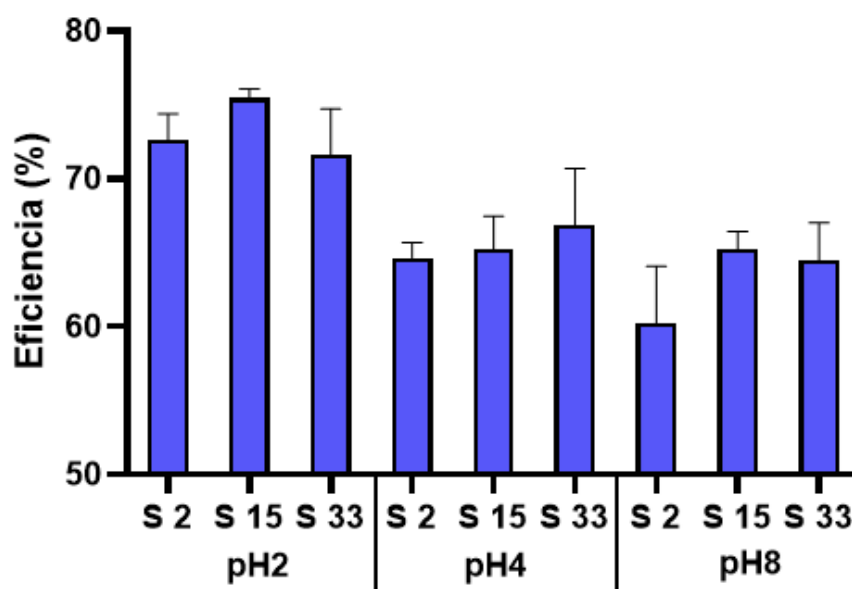


Fig. 5.3. Eficiencia de remoción de Cr (%) por las matas microbianas tras la exposición a diferentes condiciones de salinidad (S2, S15, S33) y pH (2, 4, 8). Media  $\pm$  error estándar.

La concentración de Cr(VI) en las soluciones del día final del ensayo no mostró interacción significativa entre las dos variables fisicoquímicas analizadas (Tabla 5.1).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de Cr entre las tres salinidades evaluadas, mientras que sí se encontraron diferencias entre los tres pH, con una menor concentración del metal en las soluciones de pH 2 que en las soluciones de pH 4 y 8 ( $p < 0,05$ ).

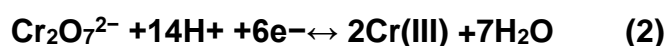
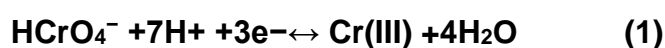
Tabla 5.1. Comparación de los resultados para Cr en solución, y para Cr, pH, clorofila *a*, feopigmentos, cianobacterias y diatomeas en las matas microbianas (MM) al final del ensayo entre las diferentes combinaciones de pH y salinidad (F y p del ANOVA de dos vías).

	pH		Salinidad		Interacción	
	F	p	F	p	F	p
<b>Cr en soluciones</b>	13,05	<0,01	0,97	0,40	0,52	0,73
<b>Cr en MM</b>	2,12	0,15	0,96	0,40	0,52	0,72
<b>pH en MM</b>	2,45	0,11	0,09	0,91	0,08	0,99
<b>Clorofila <i>a</i> en MM</b>	2,30	0,13	0,10	0,90	1,35	0,29
<b>Feopigmentos en MM</b>	0,74	0,66	0,06	0,94	1,21	0,34
<b>Cianobacterias en MM</b>	1,22	0,32	1,32	0,29	0,79	0,55
<b>Diatomeas en MM</b>	0,40	0,68	1,19	0,33	0,11	0,98

A partir de estos resultados se puede inferir que las matas microbianas son adecuadas para la remoción de Cr(VI) en soluciones con un amplio rango de salinidades (2-33) y que tienen una mayor eficiencia de eliminación en condiciones de pH 2. La pared celular de la mayoría de los microorganismos en ambientes neutros o alcalinos permanece con cargas superficiales negativas, mientras que estas cargas se vuelven positivas cuando se exponen a condiciones ácidas debido a la protonación (Loukidou et al., 2003; Seki et al., 2005; Sibi, 2016). Los iones dicromato existen principalmente como aniones ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), lo que lleva a una **atracción electrostática** entre ellos y los grupos funcionales cargados positivamente en la mata microbiana, favoreciendo el **intercambio iónico** entre cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) e hidroxilo (-OH) (Barrera et al., 2006). En consecuencia, la biosorción de iones cromato aumenta en la mata microbiana bajo condiciones ácidas.



Graham y Bouwer (2010) demostraron que en sedimentos estuarinos anóxicos la eficiencia de eliminación de Cr(VI) era mayor cuando el pH disminuía de 8 a 6, dado que cuanto más bajo es el pH hay mayor cantidad de protones lo que favorece la **reducción de Cr(VI) a Cr(III)** (Barrera et al., 2006; Mitra et al., 2017; Park et al., 2004). En las matas microbianas expuestas a soluciones de pH ácido (pH 2 y 4) los protones disponibles pueden ser consumidos durante las reacciones de reducción (1) y (2) (Barrera et al., 2006):



De hecho, según el diagrama Eh-pH para la especiación de Cr en agua de mar (Fig. 5.1) las especies de Cr termodinámicamente favorecidas en las soluciones de este ensayo serían: **Cr<sup>3+</sup>** a pH 2 y Eh ~0,52 V; **CrOH<sup>2+</sup>** a pH 4-6 y Eh ~0,34 V; y **Cr(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup>** a pH 8 y Eh ~0,23 V (Bonnand et al., 2013, Tang et al., 2021). Todos ellos corresponden al estado de oxidación del Cr(III), que puede precipitar como Cr(OH)<sub>3</sub> en soluciones alcalinas o, dado que, la mata microbiana presenta un alto contenido de materia orgánica, podría formar productos finales de Cr(III) orgánico (Mitra et al., 2017; Sapyen et al., 2022; Wang et al., 2016; Zhao et al., 2023). Bonnand et al. (2013) determinaron que las especies de cromato (CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) son dominantes en condiciones típicas de pH del agua de mar (~ 8) y con un Eh superior a 0,4 V, siendo este último valor superior a los registrados en el ensayo, tanto al inicio como al final del mismo.

La concentración inicial de 15 mg Cr/L en las soluciones disminuyó hasta valores que oscilaban entre 3,52 y 7,11 mg/L al final del ensayo (Fig. 5.4). La mayoría de estas concentraciones superan los límites legales establecidos para el vertido de Cr total a aguas superficiales por leyes medioambientales provinciales (Prov. Neuquén

0,5 mg/L, Res. N° 181/00 y Prov. BsAs 2 mg/L Res. N° 336/2003) e internacionales (0,5-4 mg/L según el país) (Magro et al., 2012).

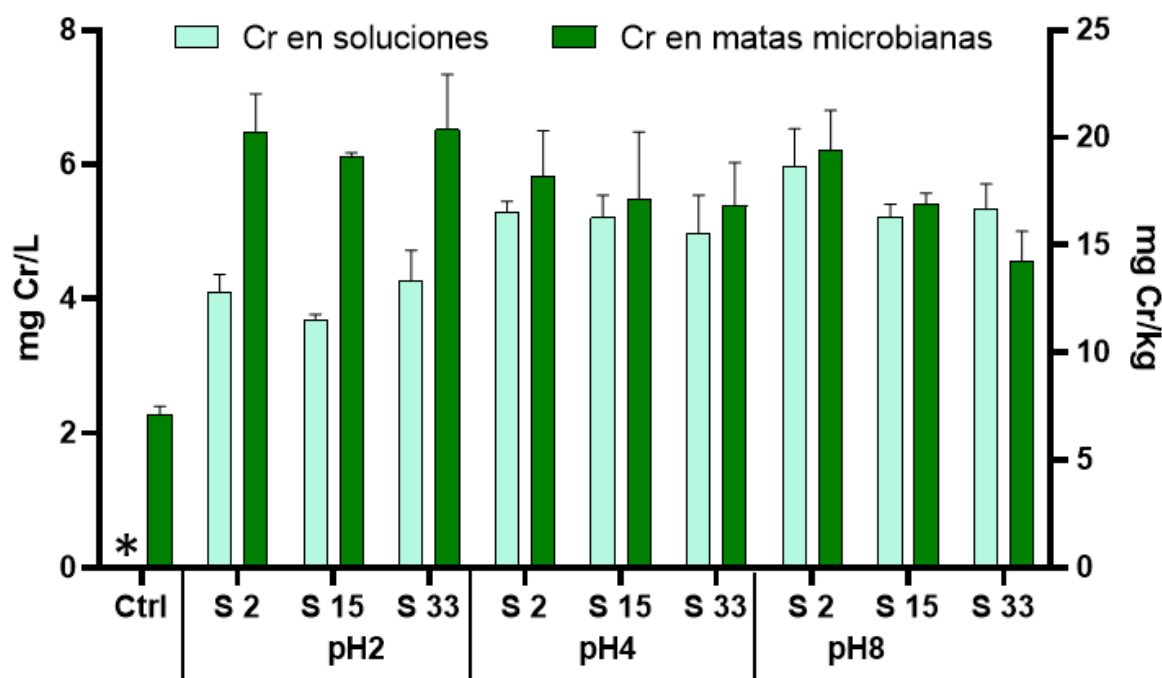


Fig. 5.4. Concentración total de Cr en las soluciones (mg Cr/L) y en las matas microbianas (mg Cr/kg) al final del ensayo. Media ± error estándar. S: salinidad. Ctrl: control. \*: solución control con  $0,014 \pm 0,003$  mg Cr/L.

A nivel mundial existen leyes ambientales estrictas respecto a las concentraciones máximas permitidas de Cr, especialmente en su estado de oxidación Cr(VI) en el medio acuático (Wang et al., 2016). En Argentina, el límite de descarga en colectores cloacales o cuerpos de agua superficiales es de 2 mg de Cr total/L y 0,20 mg de Cr(VI)/L (Res. N° 336/2003 de la autoridad del agua de la provincia de Buenos Aires, Argentina). En Brasil, la Resolución CONAMA 397/2008 establece valores máximos de concentración de Cr en aguas residuales de 1 mg/L para Cr(III) y 0,10 mg/L para Cr(VI) (Magro et al., 2012). En Italia, Portugal, Reino Unido y España, el límite legal de vertido en aguas superficiales es de 2 mg de Cr total/L, pero los límites de vertido en el alcantarillado son superiores y varían en cada país (2-10 mg de Cr total/L) (Tahir y Naseem, 2007). Con respecto a los niveles máximos establecidos para proteger la vida acuática las concentraciones son aún más estrictas (Pawlisz et al., 1997;

Vaiopoulou y Gikas, 2020). Filipinas establece el límite en 0,05 mg Cr(VI)/L para aguas marinas, criaderos comerciales de mariscos, turismo, zonas de parques marinos y parques de arrecifes de coral, y en 0,10 mg Cr(VI)/L para aguas marinas destinadas a usos recreativos o industriales (Vaiopoulou y Gikas, 2020). Indonesia también implementa un límite de 0,05 mg Cr(VI)/L para aguas marinas, pero se aplican límites más estrictos de 2 y 5 µg Cr(VI)/L para aguas marinas utilizadas para actividades de turismo marino y biota marina, respectivamente (Vaiopoulou y Gikas, 2020).

Teniendo en cuenta los límites mencionados previamente y los resultados obtenidos en el experimento de remoción de Cr(VI) por las matas microbianas, sería apropiado complementar con otras tecnologías (físicas y/o químicas), como por ejemplo las vistas en el Capítulo 1 (ítem 1.3) con la finalidad de alcanzar valores legalmente aceptables. Estas aplicaciones podrían emplearse de manera secuencial. Asimismo, la evaluación de otros factores, diferentes a los hasta acá evaluados, como por ejemplo variaciones en la temperatura, la incorporación de nutrientes como fósforo, diferentes tiempos de exposición o la inundación permanente de las matas resultan ser significativos porque pueden afectar la eliminación del metal en estudio. Shukla et al. (2012) obtuvieron mejores eficiencias de eliminación de Cr(VI) exponiendo las matas microbianas de forma continua a soluciones de 2-30 ppm a pH 5,5-6,2 durante toda la noche. En cambio, Abed et al. (2020), trabajando con soluciones a concentraciones más bajas (1 mg Cr(VI)/L), lograron la eliminación completa de Cr(VI) manteniendo la incubación de las matas microbianas en la oscuridad durante 7 días consecutivos.

La concentración de Cr en las matas microbianas al final del ensayo osciló entre 24,97 y 35,73 mg Cr/kg y ninguna superó el nivel de efecto mínimo (TEL=52,30 mg/kg)

recomendado para sedimentos marinos por la NOAA (Buchman, 2008). Estas concentraciones de Cr no mostraron diferencias estadísticas respecto a las salinidades y pH evaluados (Tabla 5.1), sin embargo, resulta importante mencionar que gráficamente se observa una mayor concentración de Cr en las matas microbianas inundadas con soluciones a pH 2 que en las inundadas con soluciones a pH 4 y 8 (Fig. 5.4).

Las matas microbianas que no fueron expuestas a las soluciones de Cr contenían  $12,51 \pm 2,48$  mg Cr/kg, mientras que las concentraciones de Cr en las matas en los tratamientos al final del ensayo fueron estadísticamente superiores a las concentraciones ambientales ( $F=10,72$ ,  $p<0,01$ ). Dado que las matas microbianas constituyen un medio muy heterogéneo con agua intersticial, partículas sólidas inorgánicas, MO y organismos vivos pueden tener lugar numerosas transferencias entre las diferentes fases y pueden aparecer fuertes gradientes redox que alteren el equilibrio entre los distintos estados de oxidación del Cr (Gorny et al., 2016).

### **5.3.2. Parámetros fisicoquímicos**

Los valores de salinidad de las soluciones aumentaron a lo largo del ensayo debido a la resuspensión salina desde las matas microbianas, por lo cual las salinidades en las soluciones al final del ensayo oscilaron entre los 14,34 y los 49,47 UPS. Las soluciones de los tratamientos a pH 4 experimentaron un rápido aumento de esta variable hasta alcanzar un valor aproximado de 6 (Tabla 5.2), lo que requirió ajustar diariamente el pH mediante la adición de HCl. Este aumento del pH puede haber sido consecuencia del metabolismo microbiano (Srinivasan y Mahadevan, 2010), por la liberación de hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ) como resultado de la adsorción del Cr(VI) a la mata

microbiana y por la utilización de protones durante el proceso de reducción de Cr(VI) a Cr(III) (Barrera et al., 2006; Shukla et al., 2002).

Por otro lado, en las soluciones de los tratamientos de pH 2 y 8 los cambios en el pH ocurrieron de manera más lenta, lo que resultó en la necesidad ocasional de realizar ajustes en sus valores. En una solución a pH 2 se requiere mayor consumo de protones o mayor liberación de hidróxidos para neutralizar los iones de hidrógeno presentes en el medio que cuando el pH es 4. El equilibrio ácido-base en la interfase agua-sedimento ocurre por el proceso de difusión-migración de sustancias disueltas, la fotosíntesis, la respiración y la disolución del carbonato de calcio (Cui et al., 2024). En el trabajo de Cui et al. (2024), asociaron los cambios en el pH del medio a las actividades metabólicas de las microalgas en sedimento ya que la liberación de oxígeno y de carbonatos durante la fotosíntesis y la respiración aumentaba el pH, mientras que cuando ambos procesos estaban inhibidos se producía una disminución en el pH. El pH en las matas microbianas al final del ensayo no presentó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Tablas 5.1 y 5.3).

El Eh de las soluciones al final del ensayo mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones de pH ( $H=23,16$ ,  $p<0,01$ ), pero no entre las diferentes salinidades ( $H=0,01$ ,  $p=0,99$ ). El Eh fue claramente mayor cuanto menor fue el pH ( $p<0,05$ ). Estudios previos han demostrado un Eh positivo muy elevado en soluciones ácidas de Cr(VI), indicando un medio fuertemente oxidante (Gode y Pehlivan, 2005) que podría favorecer la transformación de Cr(VI) a Cr(III) por las matas microbianas. Por otra parte, en las matas microbianas, las diferencias observadas en el Eh al final del ensayo no fueron estadísticamente significativas entre los diferentes pH ( $H=6,03$ ,  $p=0,05$ ) ni entre las diferentes salinidades ( $H=3,15$ ,  $p=0,21$ ) (Tabla 5.3).

Tabla 5.2. Parámetros fisicoquímicos (salinidad, pH y Eh) en las soluciones al inicio (Inicial), después de un día de incubación (Día 1) y al final de la exposición (Final) de las matas microbianas en cada tratamiento. Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de las tres réplicas, excepto para el Eh inicial que se basó en una sola medición.

		Salinidad (ups)			pH			Eh (mV)	
		Inicial	Día 1	Final	Inicial	Día 1	Final	Inicial	Final
	<b>Ctrl</b>	34,01 $\pm$ 0,15	38,72 $\pm$ 1,09	44,46 $\pm$ 2,53	8,21 $\pm$ 0,01	8,18 $\pm$ 0,03	8,13 $\pm$ 0,03	302	248,00 $\pm$ 4,73
	<b>S2</b>	5,87 $\pm$ 0,12	14,59 $\pm$ 1,56	23,64 $\pm$ 3,19	2,19 $\pm$ 0,07	2,38 $\pm$ 0,02	2,79 $\pm$ 0,01	613	512,33 $\pm$ 8,74
<b>pH 2</b>	<b>S15</b>	17,98 $\pm$ 0,10	24,62 $\pm$ 0,73	31,57 $\pm$ 0,44	2,14 $\pm$ 0,04	2,42 $\pm$ 0,01	2,82 $\pm$ 0,05	583	522,00 $\pm$ 6,81
	<b>S33</b>	36,16 $\pm$ 0,26	38,06 $\pm$ 0,30	41,94 $\pm$ 0,78	2,12 $\pm$ 0,03	2,33 $\pm$ 0,06	2,58 $\pm$ 0,08	571	527,00 $\pm$ 10,15
	<b>S2</b>	2,45 $\pm$ 0,09	13,21 $\pm$ 1,21	23,08 $\pm$ 2,98	4,11 $\pm$ 0,06	6,60 $\pm$ 0,30	6,8 $\pm$ 0,05	510	350,33 $\pm$ 12,88
<b>pH 4</b>	<b>S15</b>	15,04 $\pm$ 0,07	21,10 $\pm$ 2,12	27,56 $\pm$ 4,04	4,12 $\pm$ 0,02	6,24 $\pm$ 0,16	6,4 $\pm$ 0,15	492	339,67 $\pm$ 13,32
	<b>S33</b>	32,30 $\pm$ 1,56	37,44 $\pm$ 0,80	42,11 $\pm$ 1,09	4,08 $\pm$ 0,01	6,37 $\pm$ 0,29	6,5 $\pm$ 0,43	472	340,67 $\pm$ 16,68
	<b>S2</b>	2,20 $\pm$ 0,20	9,15 $\pm$ 1,40	15,34 $\pm$ 0,94	7,91 $\pm$ 0,07	8,22 $\pm$ 0,13	8,3 $\pm$ 0,04	333	230,67 $\pm$ 30,87
<b>pH 8</b>	<b>S15</b>	14,40 $\pm$ 0,39	20,18 $\pm$ 1,00	26,88 $\pm$ 1,87	7,80 $\pm$ 0,02	8,12 $\pm$ 0,04	8,18 $\pm$ 0,03	342	231,33 $\pm$ 29,17
	<b>S33</b>	32,38 $\pm$ 1,04	38,63 $\pm$ 1,82	44,18 $\pm$ 3,54	7,97 $\pm$ 0,02	8,04 $\pm$ 0,04	8,12 $\pm$ 0,10	325	223,33 $\pm$ 37,18

Tabla 5.3. Valores de pH en las matas microbianas al final del ensayo (Final pH) y valores de Eh (mV) en las matas microbianas al principio (Inicial Eh) y al final (Final Eh) del ensayo. Media  $\pm$  error estándar.

		Final pH	Inicial Eh (mV)	Final Eh (mV)
	<b>Ctrl</b>	7,76 $\pm$ 0,25	392,67 $\pm$ 25,41	49,33 $\pm$ 88,73
	<b>S2</b>	7,28 $\pm$ 0,54	378,67 $\pm$ 48,60	62,33 $\pm$ 52,37
<b>pH 2</b>	<b>S15</b>	7,31 $\pm$ 0,59	348,33 $\pm$ 30,31	120,67 $\pm$ 8,99
	<b>S33</b>	7,23 $\pm$ 0,29	385,67 $\pm$ 34,60	129,00 $\pm$ 56,89
	<b>S2</b>	7,74 $\pm$ 0,26	430,33 $\pm$ 23,13	110,67 $\pm$ 28,26
<b>pH 4</b>	<b>S15</b>	7,53 $\pm$ 0,18	322,67 $\pm$ 48,09	88,67 $\pm$ 45,39
	<b>S33</b>	7,55 $\pm$ 0,23	297,67 $\pm$ 48,75	120,67 $\pm$ 35,36
	<b>S2</b>	7,89 $\pm$ 0,33	323,67 $\pm$ 27,76	-99,67 $\pm$ 91,60
<b>pH 8</b>	<b>S15</b>	8,06 $\pm$ 0,37	371,33 $\pm$ 23,81	-133,00 $\pm$ 101,60
	<b>S33</b>	7,80 $\pm$ 0,13	353,00 $\pm$ 47,29	97,67 $\pm$ 33,05

### 5.3.3. Efectos de los tratamientos sobre la comunidad microfítobentónica y la materia orgánica

La concentración de clorofila *a* en las matas microbianas no mostró diferencias estadísticamente significativas bajo las diferentes condiciones de salinidades y pH (Tabla 5.1), aunque gráficamente se observa una disminución en el tratamiento a pH 2 (Fig. 5.5). Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de feopigmentos entre las diferentes salinidades y pH (Tabla 5.1), demostrando que no hubo efectos negativos que condujeran a una mayor degradación de la clorofila durante la remoción de Cr(VI).

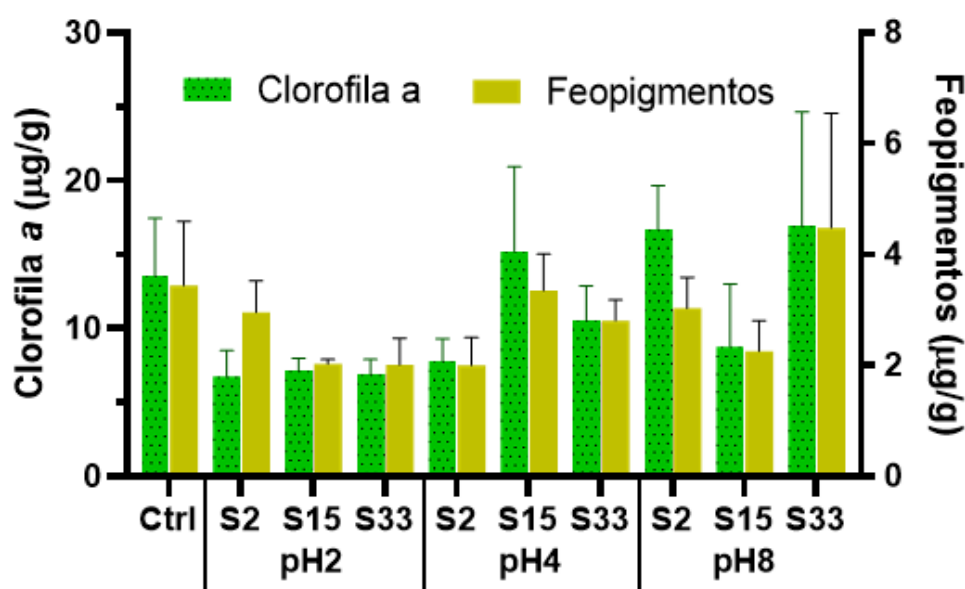


Fig. 5.5. Concentración de clorofila *a* y feopigmentos ( $\mu\text{g/g}$  de peso seco) en las matas microbianas al final del ensayo. Media  $\pm$  error estándar. S: salinidad. Ctrl: control

La mayor abundancia de cianobacterias se encontró en las matas microbianas expuestas a soluciones con salinidad 15 UPS y pH 8. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de cianobacterias y diatomeas entre las diferentes salinidades y pH (Fig. 5.6 y Tabla 5.1). En este sentido, algunos autores han encontrado una tasa de crecimiento reducida en las cianobacterias del fitoplancton en condiciones ácidas (Eichner et al., 2014; Hinnert et

al., 2015). La disminución del pH en los sistemas acuáticos, incluido el mar, afecta a muchos procesos celulares como el funcionamiento de las enzimas, los procesos de transporte y el equilibrio iónico, así como la especiación de nutrientes (Eichner et al., 2014).

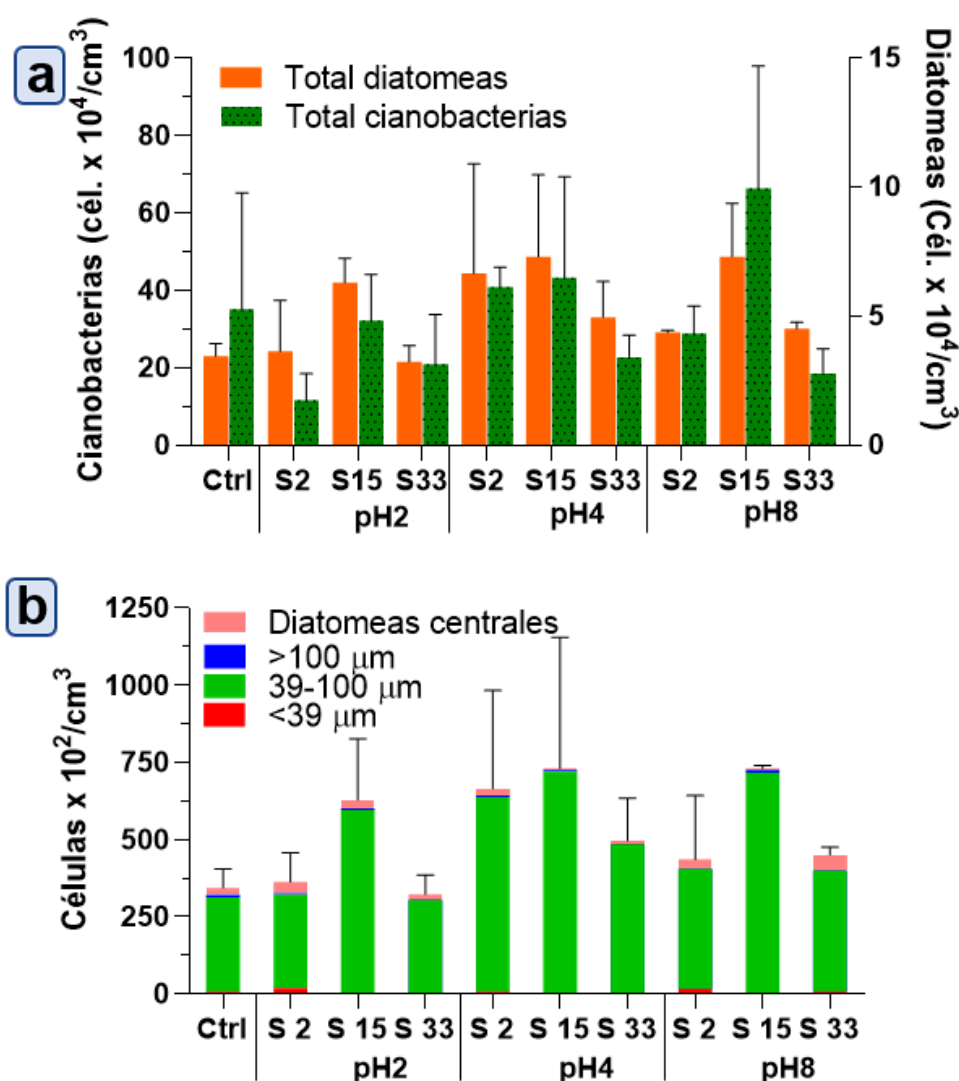


Fig. 5.6. a) Abundancia de cianobacterias y diatomeas totales (células x 10<sup>4</sup>/cm<sup>3</sup>) en las matas microbianas al final del ensayo, b) abundancia de diatomeas céntricas y diatomeas pennadas de los rangos de tamaño: <39µm, 39-100µm y >100µm (número de células/cm<sup>3</sup> de peso húmedo) en las matas microbianas al final del ensayo. Media ± error estándar. S: salinidad. Ctrl: control.

De manera similar, la estructura de la comunidad microfítobentónica después de la exposición al Cr no mostró cambios significativos entre tratamientos para el factor pH (ANOSIM, R=0.003, p=0,45) y para el factor salinidad (ANOSIM, R=0,08, p=0,24).



Las comunidades microbianas que habitan las matas poseen entornos protectores, lo que les permite responder eficazmente a los desafíos ambientales (Shammi et al., 2017). Las EPS son responsables de la protección frente a diferentes estresores ambientales, incluyendo la desecación, la salinidad, la temperatura o la contaminación por metales (Blanco et al., 2019).

Los mecanismos implicados en la resistencia al Cr por la biota que integra las matas microbianas pueden ser la reducción de Cr(VI) a Cr(III) menos tóxico, la compartimentación dentro de la célula y la biosorción en paredes celulares y EPS (Cui et al., 2021; Singh et al., 2011). Dentro de las células, el Cr(VI) puede ser reducido por la enzima reductasa y el Cr(III) resultante puede ser excretado fuera de la célula o acumulado en cuerpos de polifosfato (Connelly et al., 2006; Cui et al., 2021; Villagrasa et al., 2020; Zhao et al., 2023).

La materia orgánica de los sedimentos juega un papel importante en la retención y liberación de contaminantes en el medio ambiente (Sevastyanov et al., 2020; Simonetti et al., 2017). En este estudio, el contenido de MO en las matas microbianas osciló entre 6,05 y 8,21% (Fig. 5.7) y los valores fueron altos en comparación con los encontrados en otros sitios del estuario de Bahía Blanca por Serra et al. (2017) (0,68-5,60%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de MO entre las diferentes salinidades (GLM, Chisq=0,19, p=0,91) y pH evaluados (GLM, Chisq=0,20, p=0,90). Además, la interacción entre ambos factores no resultó significativa (GLM, Chisq=1,62, p=0,80).

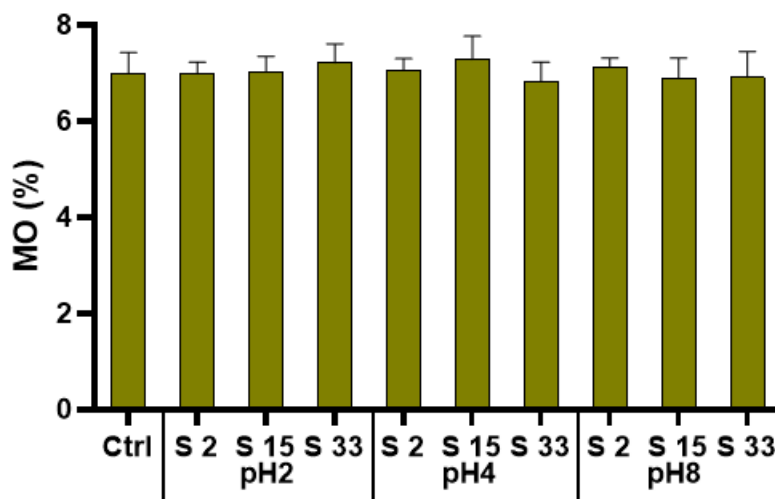


Fig. 5.7. Contenido de MO (%) en las matas microbianas al final del ensayo. Media  $\pm$  error estándar. S: salinidad. Ctrl: control.

Si bien hubo diferencias en la eficiencia de remoción de Cr(VI) bajo diferentes condiciones de pH, el contenido de MO no difirió entre tratamientos y esto podría estar asociado a que el Cr no afectó a la comunidad microfítobentónica. El análisis de esta variable es importante porque en las microzonas ricas en MO puede darse una elevada tasa de actividad microbiana, que puede eliminar rápidamente el oxígeno y dar lugar a ambientes intensamente reductores, ideales para los procesos de reducción del Cr(VI) (Connelly et al., 2006).

## CAPÍTULO 6

### REMOCIÓN DE Cr(VI) USANDO BIOCHAR Y MATAS MICROBIANAS MODIFICADAS

#### 6.1. INTRODUCCIÓN

El biochar (biocarbón) es un material carbonoso poroso generado mediante conversión termoquímica de biomasa en un entorno con alta temperatura y baja disponibilidad de oxígeno (Biswal y Balasubramanian, 2023; Yin et al., 2024; Zhao et al., 2019). Varios tipos de biomasa, incluyendo aserrín, biomasa de microalgas, lodos de plantas depuradoras y desechos agrícolas y de alimentos se han utilizado como materia prima para la producción de biochar (Biswal y Balasubramanian, 2023). Este producto ha sido sintetizado e investigado para diversas aplicaciones como mejorar las funciones del suelo (ciclo de nutrientes, estructura, metabolismo microbiano), como componente activo en el desarrollo de materiales sostenibles para el procesamiento y envasado de alimentos, y para usarlo como adsorbente de metales y contaminantes orgánicos (Bhattacharya et al., 2024; Biswal y Balasubramanian, 2023; Yin et al., 2024). Dado que el biocarbón es un material complejo muy poroso y rico en carbono, se han propuesto varios mecanismos para la eliminación de metales, incluido el llenado de poros, la complejación, el intercambio iónico, la precipitación y la atracción electrostática (Biswal y Balasubramanian, 2023).

Eliminar la MO en las matas microbianas, mediante pirólisis podría generar un producto similar al biochar, ya que contendrá una mezcla de carbono residual con minerales inorgánicos. La comparación de la remoción de metales por las matas microbianas con la remoción por este producto podría ser útil para explicar el grado de contribución de los sedimentos y minerales inorgánicos en la remoción de Cr(VI).

Evaluar los mecanismos de remoción de metales en las matas microbianas no es una tarea sencilla, dado que, como se expuso en el Capítulo 3, constituyen sistemas complejos y heterogéneos con una amplia variedad de componentes orgánicos e inorgánicos. Además del sedimento asociado, los detritos, las EPS y los microorganismos, ya sean vivos o muertos, podrían estar involucrados en la adsorción superficial e intercambio iónico de metales. Sin embargo, ciertos mecanismos son específicos para cada componente de la mata, incluida la reducción extra e intracelular de cromato por enzimas reductasas liberadas por bacterias (*Pseudomonas ambigua*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi* y *Serratia* sp.), la bioacumulación en orgánulos intracelulares (cuerpos polifosfatos, cloroplastos y mitocondrias), la formación de complejos organometálicos y la precipitación sobre óxidos de Fe y Mn (Botté et al., 2013; Kalita y Baruah, 2023; Kwak et al., 2003; Tang et al., 2021; Zhao et al., 2023). En búsqueda de explicar los mecanismos de remoción de Cr(VI) por matas microbianas, Abed et al. (2020) atribuyeron a las bacterias heterótrofas aeróbicas el papel principal en la eliminación de Cr(VI), ya que al incubar matas microbianas en oscuridad inhibió el proceso de fotosíntesis por los microorganismos fotosintéticos.

Con la finalidad de dilucidar el grado de intervención de los distintos componentes de las matas microbianas en la remoción de Cr y corroborar la hipótesis de que las matas microbianas remueven con mayor eficiencia los metales en comparación a sedimentos inertes (Capítulo 1, ítem 1.5) se llevó a cabo un ensayo con los siguientes

**objetivos:**

- Determinar y comparar la eficiencia de remoción de Cr(VI) por el biochar de matas microbianas y por matas autoclavadas, matas expuestas a oscuridad permanente y matas incubadas bajo ciclos de luz/oscuridad similares a los ambientales.

- Evaluar los parámetros físicoquímicos (pH, Eh y salinidad) de las matas microbianas y las soluciones como condicionantes en la remoción de metales.
- Determinar el rol de los diferentes componentes de las matas en el proceso de remoción de Cr(VI) mediante la caracterización elemental, mineral y de grupos funcionales presentes en el biochar y las matas microbianas sometidas a diferentes tratamientos.

## 6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.1 Preparación de soluciones y diseño experimental

Se prepararon soluciones de 15 mg/L de Cr(VI) a partir de una solución madre de 500 ppm de Cr(VI) y agua bidestilada. Tanto las soluciones de Cr como el agua destilada para el control fueron ajustadas a un pH 2. Estos parámetros fueron establecidos a partir de los resultados obtenidos en el Ensayo de remoción de Cr(VI) bajo diferentes condiciones de salinidad y pH, donde se concluyó que la remoción de Cr(VI) por las matas microbianas no variaba por cambios en la salinidad y la eliminación fue más eficiente a pH 2.

Para dar cumplimiento al objetivo del presente capítulo se recolectaron muestras de matas microbianas (n=15) en las planicies de Puerto Cuatrerros en agosto del 2023. En el laboratorio las mismas fueron sometidas a cuatro tratamientos diferentes (Fig. 6.1). En el **tratamiento A** se utilizaron matas autoclavadas a 120 °C y a 1 atm durante 20 minutos en una autoclave Arcano LDZX-50KBS. La finalidad de dicho tratamiento fue eliminar o disminuir la biomasa de microorganismos presentes en la mata microbiana, mientras se conservaba la MO en descomposición, frústulos de diatomeas y las EPS. En el **tratamiento B** se utilizó como agente biorremediador biochar formado

a partir de matas microbianas calcinadas a 450 °C por 4 horas en un horno mufla. En este tratamiento se pretendía obtener sedimento libre de MO proveniente de las matas microbianas. En el **tratamiento L** se emplearon matas microbianas intactas incubadas con un ciclo de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad para evaluarlas completas y en condiciones similares a las ambientales. En el **tratamiento O** se emplearon matas microbianas intactas incubadas en oscuridad durante todo el experimento para inhibir los procesos fotosintéticos y evaluar la actividad de las bacterias heterótrofas.

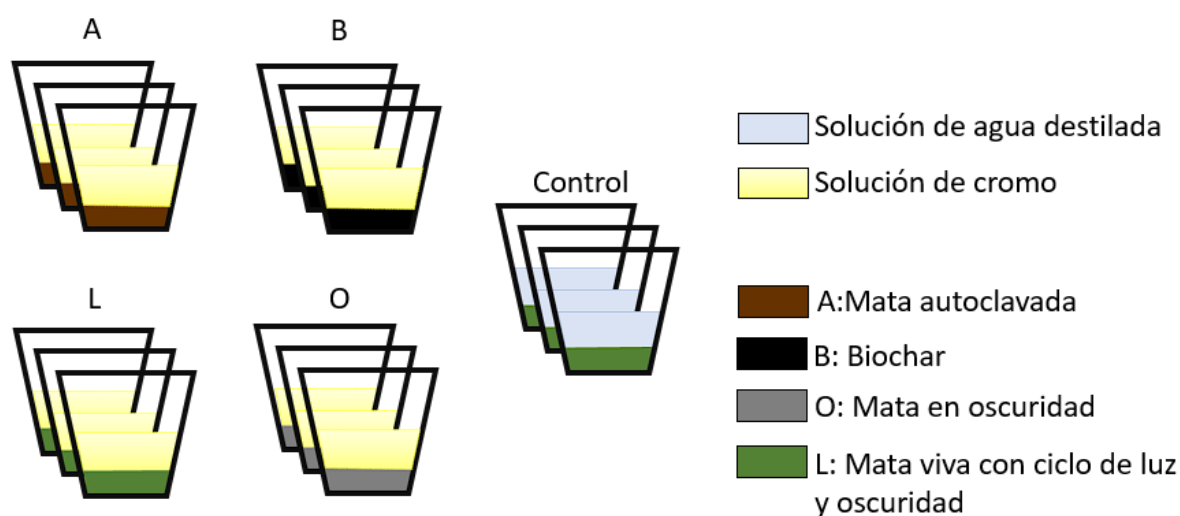


Fig. 6.1. Diseño experimental para evaluar remoción de Cr(VI) por el biochar (B) y las matas microbianas modificadas (autoclavada (A), mata viva con ciclo luz-oscuridad (L) y oscuridad total (O)).

Los ensayos se realizaron en cámara de cultivo y las condiciones de temperatura fueron las mismas para todos los tratamientos, con una mínima de 5 °C y una máxima de 18 °C. Todos los tratamientos fueron inundados con 250 ml de una solución de 15 mg/L de Cr(VI) de manera permanente hasta que la concentración de Cr(VI) en las soluciones alcanzó un valor constante en el tiempo. Para el control se utilizó una mata microbiana de iguales características a la del tratamiento L pero fue inundada con agua bidestilada. Tanto el control como los tratamientos se realizaron por triplicado.

Los parámetros fisicoquímicos (pH, Eh) fueron medidos al inicio y al final del ensayo en las soluciones y matas microbianas. La conductividad se midió en las soluciones

al inicio y al final del ensayo. Con los datos de conductividad se calculó la salinidad (ver, Capítulo 2, ítem 2.2). Diariamente se tomaron muestras de las soluciones de todos los tratamientos y réplicas para la determinación de Cr(VI) por el método colorimétrico (Capítulo 2, ítem 2.5.2). Una vez finalizado el ensayo, se procedió a almacenar las soluciones en botellas PET refrigeradas para la determinación de Cr total con ICP OES (Capítulo 2, ítem 2.5.1).

Las muestras de matas microbianas fueron divididas en submuestras para la determinación de Cr total (con ICP OES), la concentración de clorofila *a* y feopigmentos. Para los análisis SEM-EDS, DRX y ATR-FTIR se realizaron cortes paralelos a la superficie de la mata a diferentes profundidades como los indicados en el esquema de la Fig. 3.1 (Capítulo 3, ítem 3.2). Para SEM-EDS se analizó la capa superficial (0-2 mm) de todos los tratamientos, mientras que para DRX y ATR-FTIR se analizó la capa superficial y profunda (4-6 mm) del control y el tratamiento L, y la capa superficial de los tratamientos A y B.

### 6.2.2. Análisis estadísticos

Para comparar las concentraciones de Cr total, clorofila *a* y feopigmentos en las matas microbianas entre tratamientos el día final del experimento, se aplicó ANOVA de una vía. Cuando se detectaron diferencias se aplicaron Tests LSD Fisher para comparaciones *a posteriori*.

Se utilizó un GLM con distribución Tweedie para comparar la concentración de Cr total en agua entre los tratamientos el día final del experimento. Los análisis se realizaron utilizando un paquete Tweedie en R (Dunn, 2017). Se realizó un GLM con distribución Beta para comparar la eficiencia de remoción de Cr total y de Cr(VI) (%) utilizando el paquete glmmTMB (Magnusson et al., 2017). Se evaluaron las diferencias

significativas entre los tratamientos con la prueba HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey utilizando los paquetes multcomp (Hothorn et al., 2016) para el GLM con distribución Tweedie y lsmeans (Lenth y Lenth, 2018) para el GLM con distribución Beta.

### 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.3.1. Remoción de Cr

La inundación permanente en el ensayo tuvo una duración total de 425 horas, es decir 17 días fueron necesarios para que la remoción de Cr(VI) se volviera constante en todos los tratamientos. La Fig. 6.2 muestra la eficiencia de remoción y la concentración de Cr(VI) en las soluciones a lo largo del tiempo. En ella se puede observar que el **biochar** al inicio del ensayo presentó una mayor eficiencia de remoción con respecto a los demás tratamientos, alcanzando el  $54,76 \pm 3,39\%$  en las primeras 70 horas (6.2 a). Sin embargo, en las siguientes 355 horas se mantuvo relativamente constante llegando a retener sólo un 12% más del Cr en solución (6.2 a).



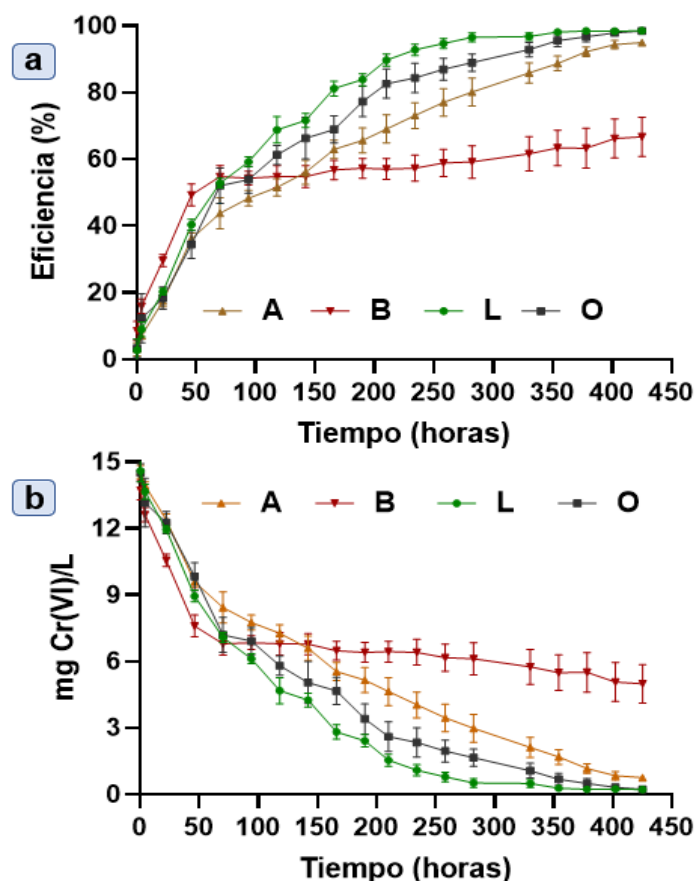


Fig. 6.2. a) Eficiencia de remoción de Cr(VI) (%) y b) concentración de Cr(VI) en las soluciones a lo largo del tiempo (425 hs). Media  $\pm$  error estándar.

El rápido secuestro del metal por el biochar al inicio del experimento podría deberse a que, al haber eliminado toda la materia orgánica mediante la calcinación, provocó la desaparición de la barrera semipermeable que forman los biofilms y matas microbianas en la superficie del sedimento, permitiendo la libre adsorción a las partículas del biochar (Ennaceri et al., 2023).

En las **matas microbianas vivas expuestas a condiciones de luz y oscuridad similares a las ambientales** la eficiencia de remoción de Cr fue mayor con respecto a los demás tratamientos a partir de las 70 hs de iniciado el experimento hasta que alcanzó un valor constante luego de 354 horas (15 días) de incubación (Fig. 6.2 a).

Las **matas microbianas expuestas a oscuridad total y las autoclavadas** acompañaron de manera similar el recorrido cinético de las matas microbianas del

**tratamiento L**, aunque con una eficiencia levemente menor a lo largo del tiempo. Sin embargo, al final del experimento las matas vivas, tanto en un ciclo de luz y oscuridad ( $98,51 \pm 0,56\%$ ) como las de oscuridad total ( $98,47 \pm 0,52\%$ ) alcanzaron los mismos porcentajes de eficiencia de remoción de Cr(VI).

Con respecto a los datos del día final del experimento, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la **eficiencia de remoción de Cr total** (GLM;  $\text{Chisq}=101$ ,  $p < 0,0001$ ) **y Cr(VI)** (GLM;  $\text{Chisq}=131,88$ ,  $p < 0,0001$ ) entre los tratamientos, siendo significativamente menor la eficiencia del biochar para ambas variables ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 6.3 a). Incluso esta diferencia fue observada en la coloración de las soluciones al final del ensayo, siendo amarilla la que estuvo expuesta al biochar (similar a la solución de dicromato de potasio inicial) y transparentes las de los Tratamientos A, L y O (similar al control). También se encontraron diferencias significativas en la **concentración de Cr total** en las **matas microbianas** ( $F=16,82$ ;  $p < 0,01$ ) y en las **soluciones** (GLM, deviance=26,22,  $p < 0,0001$ ) entre los tratamientos el día final del experimento. La concentración de Cr en las matas control fue significativamente menor a los demás tratamientos ( $p < 0,01$ ) y, además, fue significativamente mayor en el biochar con respecto a lo acumulado en las matas en oscuridad ( $p < 0,05$ ). La concentración de Cr total fue significativamente mayor en la solución del biochar que en las soluciones de los demás tratamientos ( $< 0,001$ ) (Fig. 6.3 b).

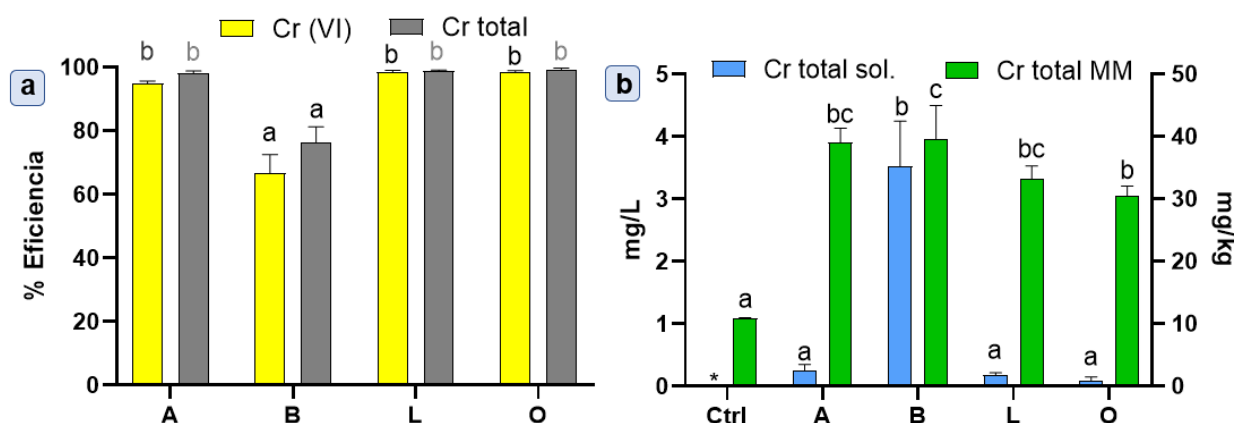


Fig. 6.3. a) Eficiencia de remoción (%) de Cr(VI) (determinado con técnica colorimétrica) y Cr total (determinado con ICP OES) en los diferentes tratamientos al final del experimento. b) Concentración de Cr total en soluciones y matas microbianas al final del experimento. Media  $\pm$  error estándar. Los valores medios con letras diferentes en cada conjunto de datos son significativamente diferentes ( $p < 0,05$  LSD Fisher). \*: solución control con  $< 0,020$  mg Cr total/L. A: tratamiento A (matas autoclavadas), B: tratamiento B (matas calcinadas), L: tratamiento L (matas intactas sometidas a un ciclo de luz y oscuridad), O: tratamiento O (matas sometidas a oscuridad permanente).

La concentración de Cr(VI) una vez finalizado el experimento tanto en las soluciones de los tratamientos con matas expuestas a un ciclo de luz y oscuridad ( $0,22 \pm 0,08$  mg Cr(VI)/L) como las del tratamiento en oscuridad continua ( $0,23 \pm 0,08$  mg Cr(VI)/L) estuvieron muy próximos a los valores límites establecidos por el ADA de la provincia de Buenos Aires ( $0,2$  mg Cr(VI)/L). En cambio, en las matas autoclavadas la concentración fue de  $0,75 \pm 0,11$  y del biochar fue de  $4,99 \pm 0,87$  al día final del ensayo. Con respecto a los valores de Cr total en las soluciones resultantes del tratamiento con biochar estuvieron por encima de los límites máximos permitidos por el ADA. Únicamente las soluciones de los tratamientos L, O y A serían admisibles como efluentes para la descarga en agua superficial.

A partir de estos resultados, se puede inferir que las matas microbianas vivas, ya sea sometidas a un ciclo de luz y oscuridad o expuestas a completa oscuridad, eliminan el Cr de las soluciones acuosas más eficientemente que las autoclavadas y el biochar. Por lo tanto, el efluente resultante podría ser descargado de manera segura, ya sea en la colectora cloacal o en un cuerpo de agua superficial, cumpliendo con las regulaciones vigentes.

### 6.3.2. Parámetros fisicoquímicos: pH, Eh y salinidad

En las matas microbianas, el pH se mantuvo alcalino tanto al inicio como al final del experimento excepto en las matas autoclavadas, que al inicio del ensayo presentaron un pH ligeramente ácido. No obstante, en las soluciones, el pH fue cambiando gradualmente desde un valor ácido (~ pH 2) hasta uno alcalino durante los primeros cuatro días del experimento y se mantuvo en la misma condición hasta el día final (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Parámetros fisicoquímicos pH y Eh (mV) en las matas microbianas (MM) y soluciones (sol.) al inicio (a) y al final (b) del ensayo, y salinidad (UPS) en soluciones al final del ensayo. Media  $\pm$  error estándar.

	pH MM	Eh MM	pH sol.	Eh sol.	Salinidad sol.
<b>Ctrl-a</b>	7,57 $\pm$ 0,18	189,00 $\pm$ 14,01	2,04 $\pm$ 0,02	506,00 $\pm$ 5,57	-
<b>Ctrl-b</b>	7,93 $\pm$ 0,22	64,33 $\pm$ 24,83	8,55 $\pm$ 0,04	187,00 $\pm$ 3,06	28,01 $\pm$ 1,19
<b>A-a</b>	6,85 $\pm$ 0,03	50 $\pm$ 9,50	2,56 $\pm$ 0,49	454,33 $\pm$ 63,02	-
<b>A-b</b>	7,23 $\pm$ 0,02	-57 $\pm$ 10,58	7,95 $\pm$ 0,01	96,33 $\pm$ 7,36	32,49 $\pm$ 1,43
<b>B-a</b>	7,44 $\pm$ 0,14	104,00 $\pm$ 3,61	2,73 $\pm$ 0,30	533,33 $\pm$ 21,31	-
<b>B-b</b>	7,63 $\pm$ 0,24	-15,33 $\pm$ 6,39	8,01 $\pm$ 0,05	128,00 $\pm$ 2,08	28,12 $\pm$ 4,49
<b>L-a</b>	7,33 $\pm$ 0,04	121,33 $\pm$ 7,86	2,24 $\pm$ 0,10	546,67 $\pm$ 19,95	-
<b>L-b</b>	7,80 $\pm$ 0,10	-183,67 $\pm$ 23,5	8,40 $\pm$ 0,04	174,33 $\pm$ 4,37	24,32 $\pm$ 2,85
<b>O-a</b>	7,40 $\pm$ 0,02	87,67 $\pm$ 8,29	1,96 $\pm$ 0,00	555,33 $\pm$ 23,17	-
<b>O-b</b>	8,39 $\pm$ 0,05	-174,67 $\pm$ 49,15	7,96 $\pm$ 0,01	68,33 $\pm$ 19,94	23,40 $\pm$ 2,36

En las matas microbianas control, el Eh presentó valores positivos tanto al inicio como al final del experimento. Sin embargo, en los cuatro tratamientos con agregado de la solución de Cr el Eh en las matas presentó valores negativos al final del ensayo, indicando que el medio pasó de ser oxidante a reductor. En cambio, en las soluciones el Eh del día final mostró un valor positivo pero menor al día inicial, indicando que el medio (las soluciones) fue más oxidante al inicio que al final del ensayo.

A pesar de haber empleado agua destilada para preparar las soluciones de Cr, la salinidad de las mismas aumentó durante el transcurso del experimento debido a la

salinidad inherente a las matas microbianas provenientes de la planicie intermareal del estuario.

### 6.3.3. Evaluación de la comunidad microfítobentónica

#### 6.3.3.1. Concentración de clorofila *a* y feopigmentos

En el **biochar** no se detectó clorofila *a* ni feopigmentos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de clorofila *a* ( $F=4,03$ ;  $p=0,05$ ) y en la de feopigmentos ( $F=4,39$ ;  $p=0,04$ ) en las matas microbianas del día final del experimento (Fig. 6.4). A pesar de que gráficamente se observa una mayor concentración de clorofila *a* en las matas del **tratamiento L**, esta solo fue significativamente mayor a la de las matas del tratamiento A ( $p<0,05$ ), mientras que ningún tratamiento presentó diferencias significativas con el control (Fig. 6.4).

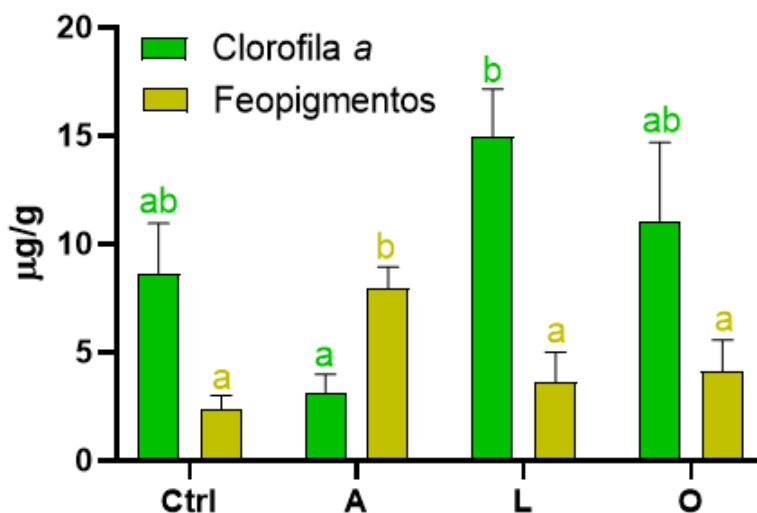


Fig. 6.4. Concentración de clorofila *a* y feopigmentos en las matas microbianas del día final del experimento. Media  $\pm$  error estándar. Los valores medios con letras diferentes en cada conjunto de datos son significativamente diferentes ( $p<0,05$  LSD Fisher). A: tratamiento A (matas autoclavadas), L: tratamiento L (matas intactas sometidas a un ciclo de luz y oscuridad), O: tratamiento O (matas sometidas a oscuridad permanente).

La concentración de **feopigmentos** fue significativamente mayor en las matas **autoclavadas** con respecto al control y a los demás tratamientos ( $p<0,05$ ). Este

incremento es atribuido al proceso de autoclavado, donde la presión y alta temperatura elimina a los microorganismos de la mata microbiana, incluidas las diatomeas y cianobacterias, permitiendo la degradación del contenido de clorofila *a*.

Se esperaría una disminución en la concentración de clorofila *a* en el tratamiento O con respecto al tratamiento L debido a que cuando la mata microbiana se encuentra en oscuridad cesa la fotosíntesis y, sumado a la inmersión permanente que evita la difusión de oxígeno hacia la superficie, se genera un entorno anaeróbico para todos los organismos que la integran (Stal, 2012). Sin embargo, el hecho de no haber detectado diferencias significativas en la concentración de clorofila *a* entre las matas microbianas de los tratamientos L y O puede ser explicado por los mecanismos de resistencia que le permite a la comunidad microfitobentónica soportar el estrés ambiental.

Muchas diatomeas forman **esporas** o **células en fase de reposo**, que aseguran una alta viabilidad en entornos costeros variables, permitiéndoles persistir durante períodos prolongados sin experimentar divisiones celulares. Ambas estructuras tienen casi las mismas características fisiológicas pero se diferencian en que las esporas son morfológicamente distintas de las células vegetativas, mientras que las células en reposo son externamente similares a las células vegetativas (Tsukazaki et al., 2018). Al igual que las esporas, las células en fase de reposo exhiben una serie de características distintivas, entre ellas se incluyen un citoplasma condensado, un elevado contenido de material de almacenamiento, tasas bajas de fotosíntesis, una proporción carbono:clorofila elevada y una tasa reducida de respiración (Montresor et al., 2013). Tsukazaki et al. (2018) determinaron que algunas especies de diatomeas planctónicas de la región ártica que forman células en estado de reposo son capaces de permanecer viables en condiciones de oscuridad y frío durante más de 6 meses y

reproducirse cuando las condiciones se vuelven favorables. Sin embargo, no hay información sobre la viabilidad de las diatomeas presentes en matas microbianas de zonas costeras templadas sometidas a largos períodos de oscuridad.

Las cianobacterias filamentosas formadoras de matas microbianas son capaces de sobrevivir incluso varios días en condiciones de oscuridad y anoxia al cambiar el metabolismo respiratorio aerobio por el anaeróbico con la degradación del glucógeno almacenado a través de la fermentación (Stal, 2012). El glucógeno es uno de los principales sumideros de carbono donde las cianobacterias depositan el carbono fijado en condiciones de luz. Cuando las cianobacterias se encuentran en oscuridad comienzan a utilizar el glucógeno almacenado para generar energía, permitiéndoles sobrevivir hasta que estas reservas se agoten (Chuang y Liao, 2021).

#### 6.3.3.2 *Composición biológica y elemental por SEM-EDS*

En las matas microbianas **control** se pudo observar una gran cantidad de diatomeas y cianobacterias con muchos filamentos de mucílago entrelazados (Fig. 6.5). La composición elemental fue similar a la descrita para las matas microbianas del Capítulo 3 (ítem 3.3.4) a excepción de que se detectó Cr sobre una diatomea (0,03 %p/p) a pesar de que estas muestras no estuvieron expuestas a soluciones de Cr(VI) durante el experimento. El Cr detectado corresponde al presente en las matas en el área de muestreo, como puede observarse en el control ( $10,95 \pm 0,07$  mg/kg) de la Fig. 6.3 b. La presencia de Cr en las matas microbianas sin tratar puede ser atribuido a diversas fuentes difusas de contaminación que recibe el estuario de Bahía Blanca (complejo petroquímico, parque industrial, actividades agrícolas-ganaderas y efluentes urbanos) (Forero-López et al., 2021; Negrin et al., 2021).

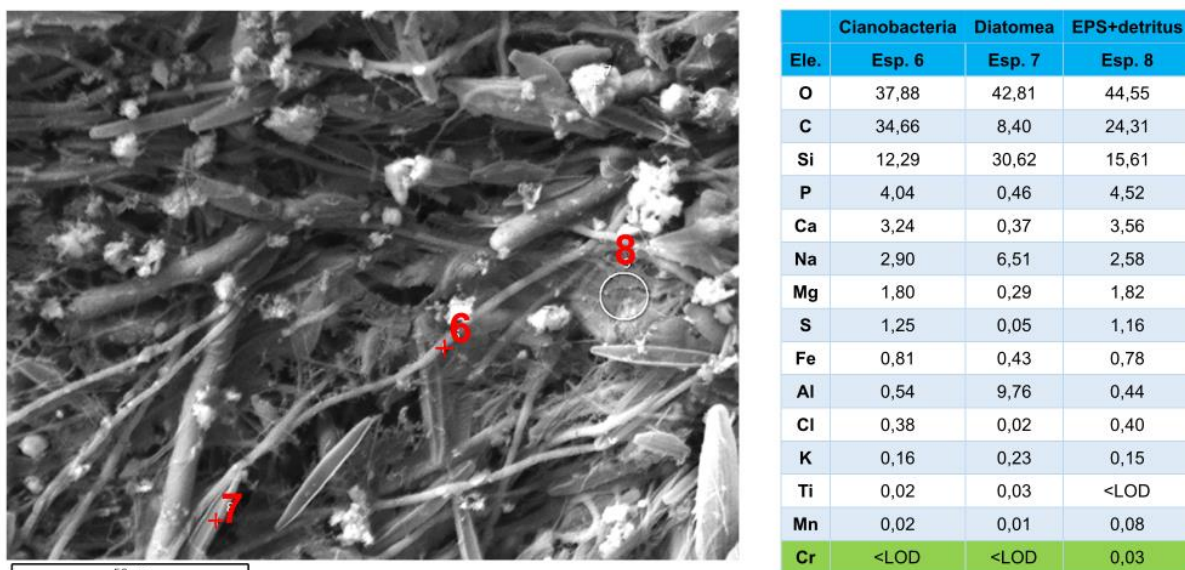


Fig. 6.5. Fotomicrografía SEM y análisis de la composición de los elementos (Ele.) en las matas microbianas control. Datos semicuantitativos de los espectros (Esp.) puntuales expresados en porcentaje en peso (%p/p). <LOD: valor por debajo del límite de detección.

En el **tratamiento A**, el propósito de autoclavar las matas microbianas fue destruir los organismos vivos sin alterar los EPS ni destruir la MO presente en la muestra. Si bien la carga microfítobentónica disminuyó notablemente, fue posible observar bajo microscopio óptico y electrónico algunos filamentos de cianobacterias. Cabe destacar que la coloración observada de dichas cianobacterias fue amarronada, en contraste al verde brillante de las cianobacterias de las matas sin autoclavar. Por el contrario, la mayor parte de los frústulos de las diatomeas se observaron fragmentados y aquellos que se encontraban enteros estaban vacíos, con lo que se pudo confirmar la muerte de estas microalgas.

La concentración de clorofila *a* inicial, luego de autoclavar las matas, fue de 2 µg/g, mientras que una vez finalizado el experimento con Cr fue de 3,15±0,82 µg/g, con lo cual es posible que las cianobacterias además de haber sobrevivido se hayan reproducido durante el experimento. En la Figs. 6.6 a y b se puede observar el aspecto y la composición elemental de las matas autoclavadas al final del experimento. Una mayor proporción de O:Si y una menor cantidad de C es evidente en la mayoría de



los espectros puntuales, debido a la menor biomasa microbiana en las muestras. Se destaca en las matas autoclavadas la presencia del metal Zn, el cual no había aparecido en matas microbianas intactas de los capítulos 3 y 4. Con respecto al Cr, este se detectó sobre la superficie de los frústulos de las diatomeas muertas, sobre las cianobacterias y sobre el sedimento, con valores de %p/p levemente variables.

En el **biochar** murieron todos los microorganismos y se desintegró toda la MO presente al momento de muflar las matas microbianas, por lo cual en el **tratamiento B** fue mayor el %p/p de O y Si, mientras que el de C fue menor al registrado en los demás tratamientos. Al igual que las matas autoclavadas, en el biochar también apareció la señal de Zn. El Zn es un micronutriente esencial, con diversas funciones metabólicas en los organismos fotosintéticos, por lo cual es probable que se encuentre presente en el interior de las células y que durante los procesos de autoclavado y muflado se haya liberado del material biológico, quedando expuesto y libre en el sedimento.

En los análisis SEM-EDS sobre el biochar, se encontró mayor %p/p de Cr en el sedimento fino que en el grueso (Fig. 6.6 c y d), lo cual coincide con el conocimiento generalizado que se tiene sobre la adsorción de metales en esta matriz, donde las partículas finas tienen mayor superficie de adsorción que las gruesas (Watermann et al., 1999, Botté et al., 2013).

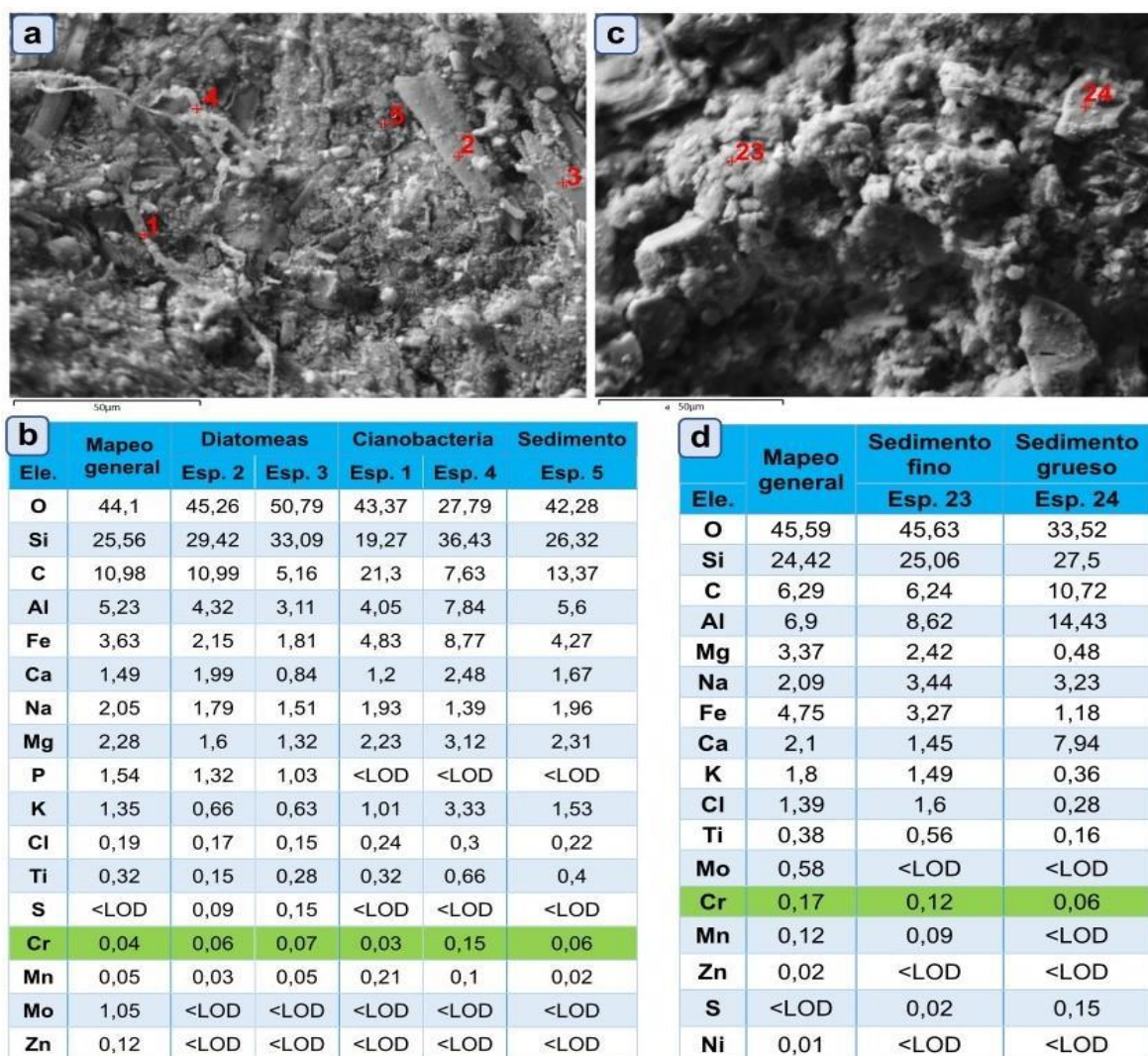


Fig. 6.6. Fotomicrografía SEM y composición elemental de las matas microbianas autoclavadas del tratamiento A (a,b) y del biochar del tratamiento B (c,d) al final del experimento con Cr. Datos semicuantitativos de los espectros (Esp.) puntuales expresados en porcentaje en peso (%p/p). <LOD: valor por debajo del límite de detección.

En las matas microbianas del **tratamiento L**, expuestas a un ciclo de luz y oscuridad similar al ambiental, se observó una gran cantidad de filamentos de cianobacterias entrelazados formando una red que cubrió toda la muestra (Figs. 6.7 y 6.8). Al observar las muestras al microscopio óptico se detectó que los frústulos de las diatomeas estaban vacíos, mientras que las cianobacterias se encontraban vivas con una coloración verde brillante. Es probable que el Cr(VI) haya tenido efectos tóxicos sobre las diatomeas. Sin embargo, también es posible que las cianobacterias les hayan ganado a las diatomeas en competencia bajo las condiciones dadas en el tratamiento y que la densa red de filamentos formada por su proliferación excesiva no

haya permitido la migración de las diatomeas a la superficie para fotosintetizar eficientemente. Las cianobacterias podrían contener genes de resistencia a Cr, como en el caso de *Synechococcus elongatus* que posee un gen que codifica la proteína SrpC, homóloga de ChrA de la superfamilia de transportadores de iones cromato y son responsables de la salida de Cr al exterior celular (Aguilar-Barajas et al., 2012; Lee et al., 2013).

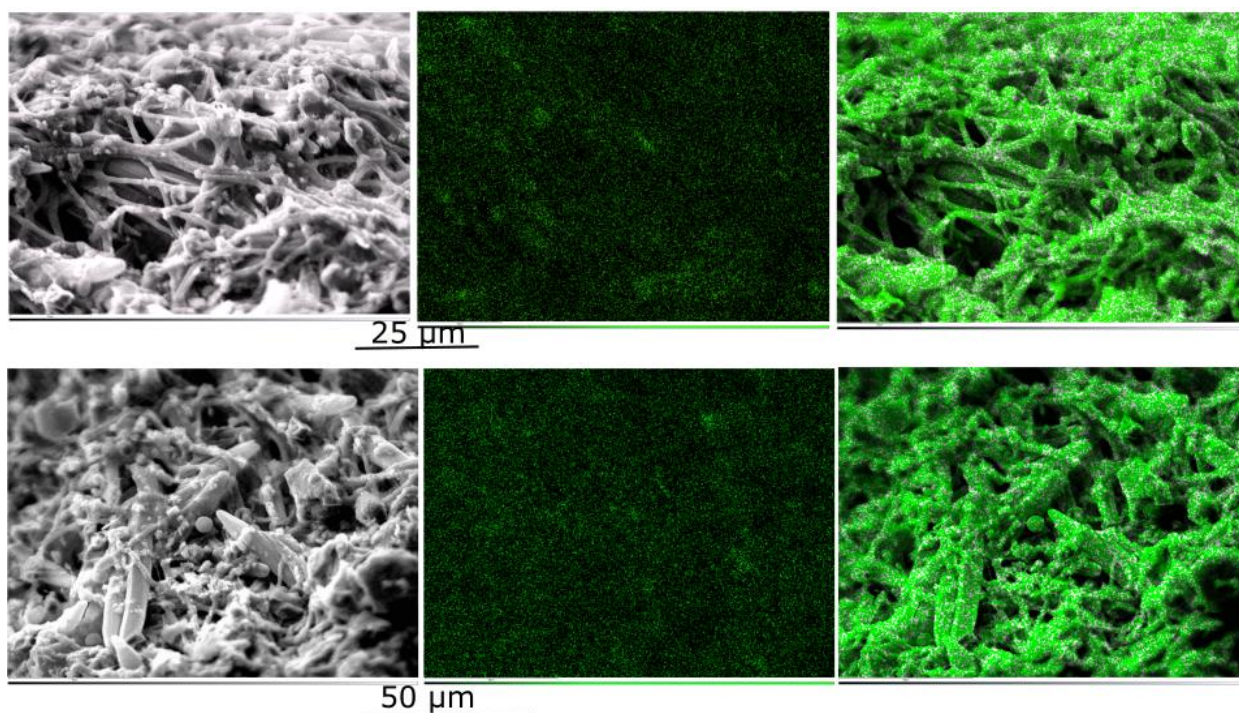
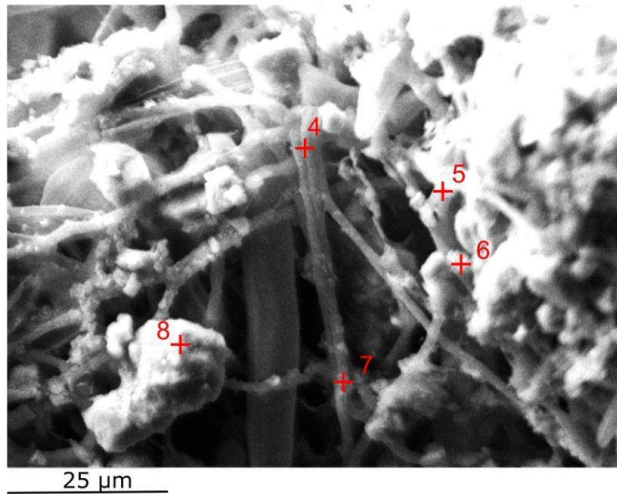


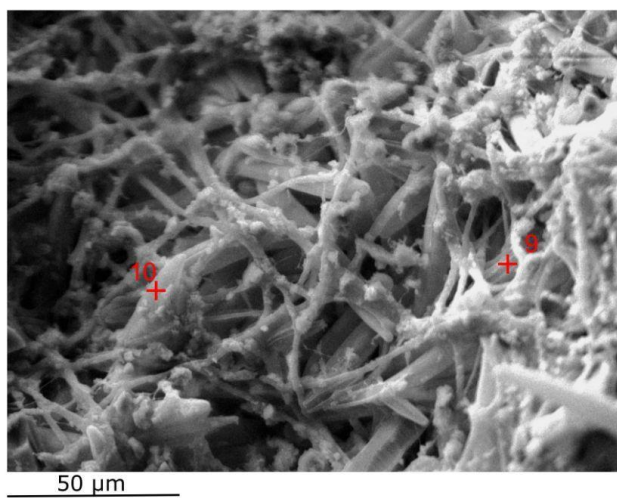
Fig. 6.7. Análisis SEM-EDS en matas microbianas del tratamiento L, mostrando dos sitios diferentes de mapeo en la misma muestra. Fotomicrografías (izquierda), mapeos de Cr (centro) y superposición de ambos (derecha).

En los mapeos de Cr superpuestos sobre las fotomicrografías se puede observar que el metal se depositó sobre frústulos de diatomeas, a lo largo de las cianobacterias y sobre el detrito, formado por restos de MO y EPS secretado por el microfitobentos (Fig. 6.7).

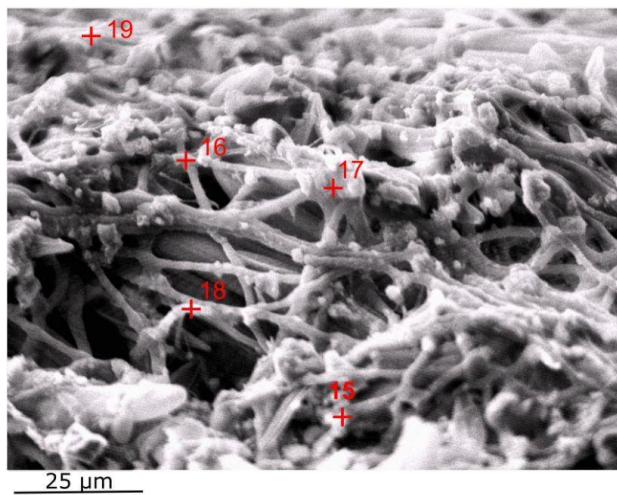




Cianobacterias con detritus					Mineral
Ele.	Esp. 4	Esp. 5	Esp. 6	Esp. 7	Esp. 8
C	48,54	34,75	24,38	23,75	<LOD
O	37,03	50,99	43,9	56,97	47,22
Si	8,29	12,08	19,34	<LOD	<LOD
Na	2,56	<LOD	3,04	<LOD	26,12
Mg	1,81	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ca	1,3	0,64	1,49	5,78	0,98
Cr	0,13	0,06	0,04	0,97	0,01
Fe	0,33	0,96	1,16	9,17	3,33
K	<LOD	0,51	<LOD	3,36	5,67
Al	<LOD	<LOD	6,64	<LOD	<LOD
Br	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	16,67



Diatomeas		
Ele.	Esp. 9	Esp. 10
C	39,32	25,79
O	38,07	48,05
Si	9,48	21,58
Mg	2,83	<LOD
Na	2,24	<LOD
Ti	3,97	<LOD
Al	2,12	<LOD
Ca	1,08	1,79
Fe	0,82	1,9
Cr	0,06	0,89



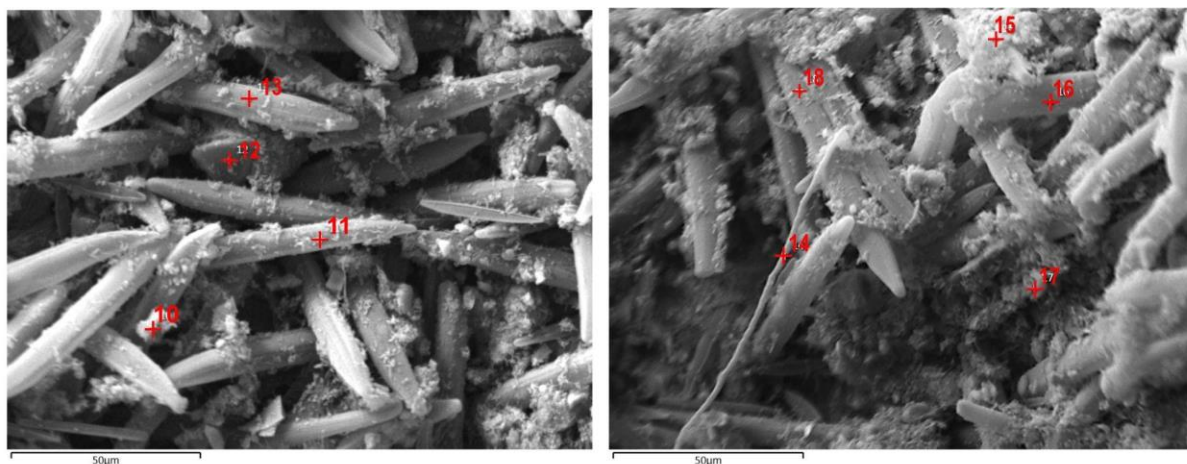
Cianobacterias					
Ele.	Esp. 15	Esp. 16	Esp. 17	Esp. 18	Esp. 19
C	39,13	50,99	30,89	45,4	33,75
O	46,36	33,35	46,96	36,51	34,98
Si	12,63	9,51	17,84	13,83	16,64
Ca	0,64	1,2	0,92	0,67	3,05
Fe	1,12	0,43	0,58	0,25	<LOD
Cr	0,12	0,12	0,56	0,17	1,8
Na	<LOD	2,45	<LOD	2,02	3,76
Mg	<LOD	1,94	2,24	1,14	<LOD
Al	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6,02

Fig. 6.8. Composición elemental en sitios puntuales de las matas microbianas del tratamiento L. Datos semicuantitativos de los espectros (Esp.) puntuales expresados en porcentaje en peso (%p/p). <LOD: valor por debajo del límite de detección.

En los espectros puntuales se puede observar que el Cr se encuentra en todos los sitios analizados, ya sea minerales del sedimento, diatomeas y cianobacterias, en

cantidades variables (Fig. 6.8). Por otro lado, se detectó la presencia de bromo (Br) en el primer espectro puntual del tratamiento L (Fig. 6.8). Aunque no hay estudios previos de Br en el estuario de Bahía Blanca, en las marismas comúnmente se suelen formar compuestos organobromados como el metilbromo ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) (Jiménez-Morillo et al., 2024). Sin embargo, como en el espectro puntual donde se encontró el Br no se detectó carbono y presentó un alto %p/p de oxígeno, es posible que el mineral formado sea un óxido de bromo, los cuales son asociados a incendios forestales, erupciones volcánicas o a fuentes antropogénicas como el uso de pesticidas y colorantes (Jiménez-Morillo et al., 2024; Moreno et al., 2017).

En las matas microbianas del **tratamiento O**, las cuales estuvieron siempre en oscuridad, se observó particularmente una gran cantidad de diatomeas del género *Nitzschia* cubriendo la superficie de la mata microbiana y muy pocos filamentos de cianobacterias (Fig. 6.9). La observación al microscopio óptico permitió determinar que las diatomeas aún mantenían su contenido celular, aunque con una coloración amarronada, y que las cianobacterias eran excepcionalmente largas y verdes pálidas. Probablemente debido a las condiciones de oscuridad las diatomeas migraron a la superficie en busca de luz, ya que (como se vió en el Capítulo 3, ítem 3.1) es característica la migración vertical de los productores primarios fototróficos a través del sedimento (Pringault et al., 2015). No fue posible confirmar si las diatomeas observadas después de 17 días de oscuridad eran células vegetativas o células en reposo debido a que ambos estadios son morfológicamente iguales (Tsukazaki et al., 2018).



	Detritus	Diatomeas		Sedimento
Ele.	Esp.10	Esp. 11	Esp. 13	Esp. 12
O	48,01	44,43	49,26	47,24
Si	31,49	36,11	33,83	23,23
C	3,69	10,11	6,70	3,34
Al	7,32	1,24	1,84	11,91
K	6,11	0,33	0,52	5,15
Mg	0,62	1,11	1,38	2,23
P	0,63	2,10	1,99	1,43
Fe	0,83	1,25	1,40	2,68
Ca	0,79	1,77	1,60	1,09
Na	0,38	1,04	1,17	1,21
S	0,04	0,16	<LOD	<LOD
Cl	0,05	0,15	0,09	0,06
Mn	0,03	0,03	0,06	0,06
Cr	0,02	0,04	0,07	0,07
Ti	<LOD	0,14	0,10	0,28

	Cianobacteria	Detritus		Diatomeas	
Ele.	Esp. 14	Esp. 15	Esp. 17	Esp. 16	Esp.18
O	44,89	49,44	46,46	47,27	53,17
Si	32,34	28,72	25,15	29,45	28,56
C	10,77	11,42	13,88	13,70	10,95
Al	4,04	2,25	4,66	2,77	2,02
Na	1,50	1,61	1,67	1,69	1,34
Fe	2,22	1,23	2,73	1,57	1,32
Mg	1,08	1,40	2,64	1,39	1,03
K	1,35	0,53	0,94	0,45	0,50
Ca	1,19	1,30	1,32	1,46	0,88
Ti	0,34	0,10	0,27	0,12	0,13
Cl	0,19	0,14	0,16	0,11	0,09
Mn	0,08	0,01	0,06	<LOD	0,02
Cr	0,01	<LOD	0,07	0,02	0,02
S	<LOD	0,06	<LOD	<LOD	<LOD
P	<LOD	1,80	<LOD	<LOD	<LOD

Fig. 6.9. Micrografías SEM y composición elemental de las matas microbianas del tratamiento O al final del experimento con Cr. Datos semicuantitativos de los espectros (Esp.) puntuales expresados en porcentaje en peso (%p/p). <LOD: valor por debajo del límite de detección.

Las cianobacterias también poseen la capacidad de migrar en el sedimento, ellas se dirigen hacia la superficie al atardecer y al sedimento en profundidad durante el día. La migración a la superficie durante la oscuridad puede explicarse por una respuesta quimiofóbica al sulfuro, que es muy tóxico y su concentración aumenta en los periodos en que no hay fotosíntesis anoxigénica y no hay oxígeno disponible para la oxidación biológica o química (Stal, 2012). Por lo tanto, es posible que los niveles de sulfuro hayan aumentado en la mata microbiana durante los 17 días de oscuridad

de manera que haya resultado tóxico para la mayoría de los microorganismos del consorcio microbiano.

En los análisis SEM-EDS la proporción de C:O cambió, siendo menor el %p/p de C en las matas sometidas a oscuridad (tratamiento O) en relación con aquellas incubadas con un ciclo de luz y oscuridad (tratamiento L). Esto coincide con la estimación de la biomasa microalgal mediante la concentración de clorofila *a* donde también fue gráficamente más elevada en el tratamiento L que en el O. Durante la oscuridad el carbono orgánico es degradado sin posibilidad de fijarlo debido a que se detienen los procesos de fotosíntesis (Chuang y Liao, 2021; Zhang et al., 2024). Por otra parte, los valores de %p/p de Si, fueron más altos en el tratamiento O que en la mayoría de los espectros puntuales del control y el tratamiento L debido al mayor número de diatomeas cubriendo la superficie de la mata microbiana. Con respecto al Cr, este fue encontrado en baja cantidad sobre la mayor parte de las diatomeas, detritos y sedimentos, sin embargo, no fue detectado en las cianobacterias analizadas (Fig. 6.8).

En la Fig. 6.10, se puede observar el aspecto de las matas microbianas y soluciones en cada tratamiento a lo largo del experimento. Al final del experimento las matas microbianas del tratamiento L adquirieron una coloración verde asociada a la gran cantidad de cianobacterias cubriendo la superficie, mientras que las del tratamiento O mostraron algunas zonas con una coloración marrón-dorada indicando la presencia de diatomeas.



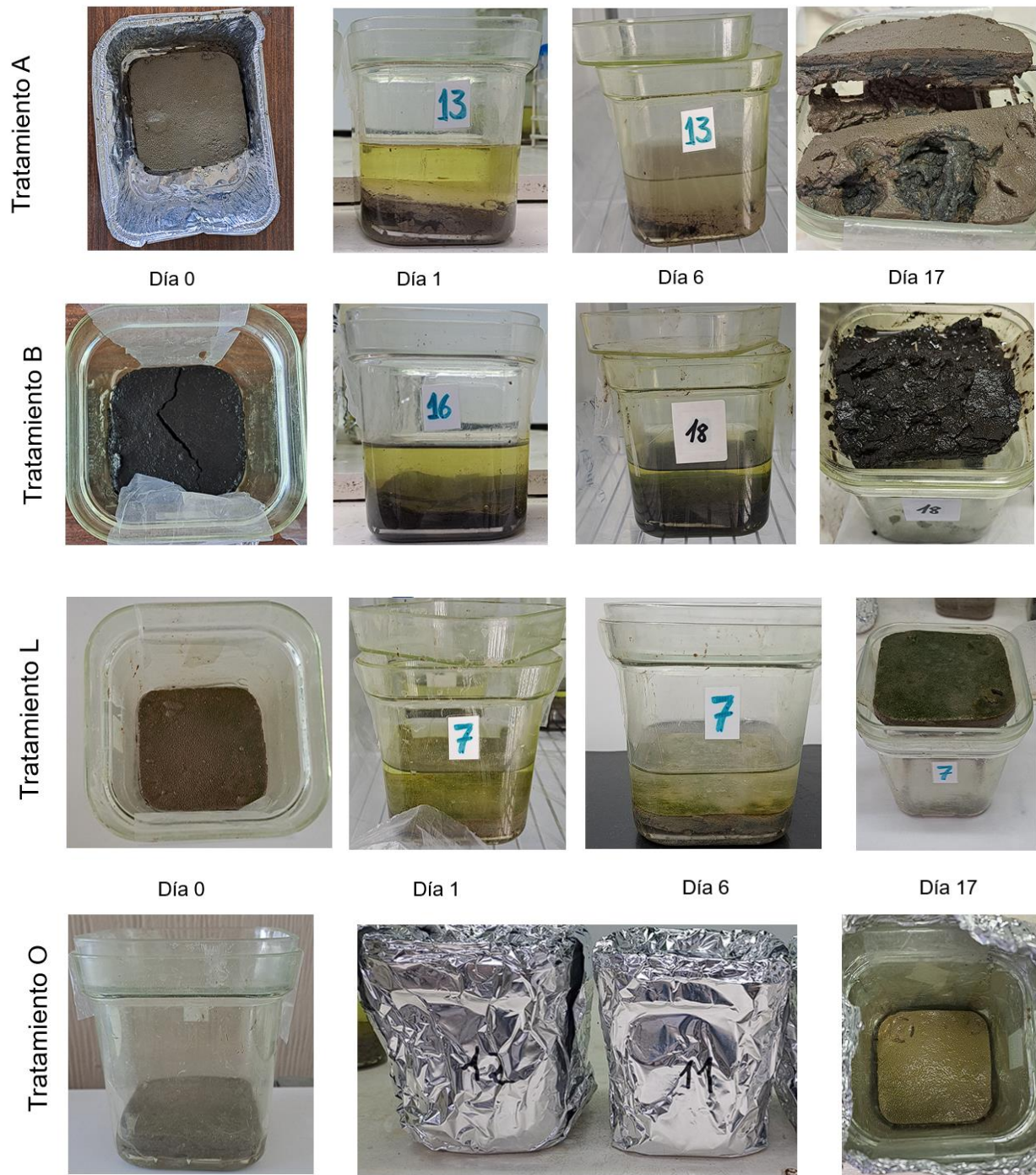


Fig. 6.10. Muestras de matas microbianas de los cuatro tratamientos (A-B-O-L) en tiempos diferentes durante el desarrollo del experimento.

Día 0: matas microbianas antes de la exposición a la solución de Cr.

Día 1: día inicial de la inundación de las matas microbianas con solución de Cr(VI).

Día 6: 132 horas de inundación de las matas microbianas con solución de Cr(VI).

Día 17: día final del experimento, tras 425 horas de inundación con la solución de Cr(VI).

La capa superior de las matas microbianas del **tratamiento A** mostró una coloración grisácea correspondiente al sedimento sin proliferación de microalgas. En cambio, en la capa inferior se observó una coloración negra muy oscura posiblemente



debido a depósitos de sulfuro de hierro (FeS) o pirita (FeS<sub>2</sub>) (ver, Capítulo 3, ítem 3.3.4). Esta observación condujo a realizar una determinación cuantitativa de las bacterias sulfato reductoras, que comúnmente se encuentran en dicha capa, para corroborar si estos organismos sobrevivieron al proceso de autoclavado. Se derivaron muestras a un laboratorio privado (Quality Consultora & Laboratorio), donde se aplicó un análisis cuantitativo cuyos resultados permitieron confirmar la ausencia de bacterias sulfato reductoras en las matas microbianas autoclavadas, mientras que en el control la concentración fue de 136 UFC/g y en el **tratamiento L** de 126 UFC/g.

#### 6.3.4. Identificación de grupos funcionales mediante ATR-FTIR

La presencia y/o distribución de grupos funcionales en las matas microbianas define su capacidad de unión con los metales, desempeñando un papel crucial en la migración y/o transformación de éstos en las matas microbianas (Baysal, 2023). Los mismos grupos funcionales que fueron observados en las matas microbianas de las muestras de campo (Capítulo 3, ítem 3.3.3) se observaron en **la capa superficial** de las matas microbianas del **control** y **del tratamiento L** al final del experimento (Fig. 6.11 a). A diferencia de la mata de campo (Capítulo 3, ítem 3.3.3), **la capa profunda del tratamiento L** muestra la señal característica de los grupos -OH y amida entre los 3000 y 3600 cm<sup>-1</sup>, lo cual podría estar asociado a una mayor proliferación de microorganismos heterótrofos o a una mayor producción de EPS en dicha capa (Braissant et al., 2009; Forero-López et al., 2022; Oliveira et al., 2014).

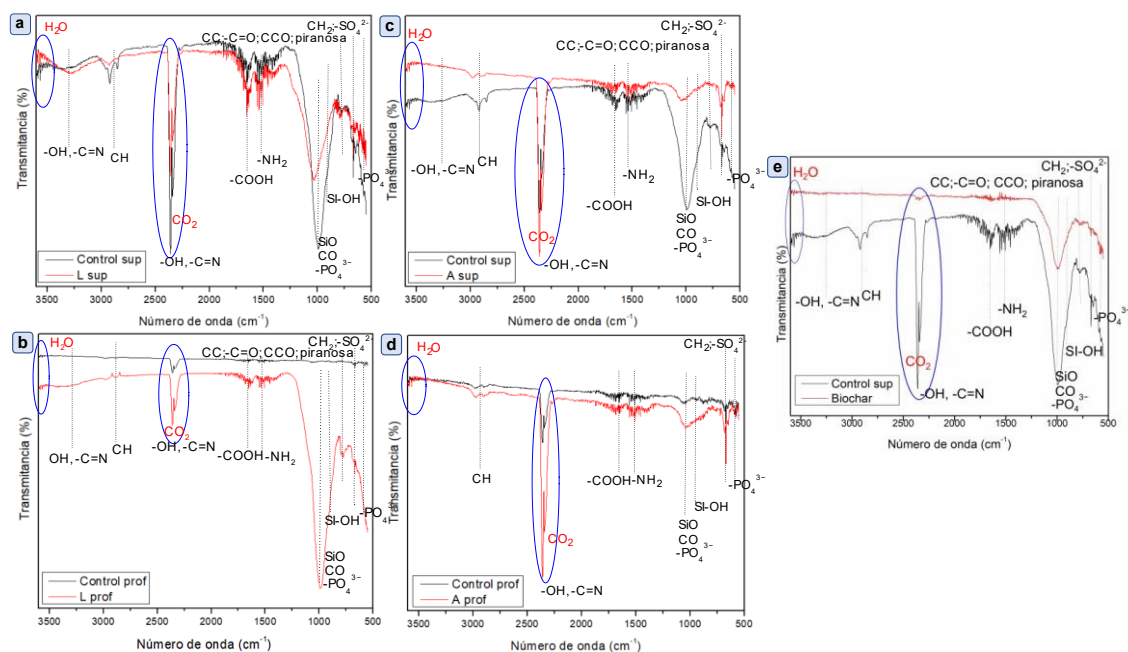


Fig. 6.11. Espectros de ATR-FTIR de las matas microbianas del día final del experimento. Comparaciones entre a) control y tratamiento L (superficie), b) control y tratamiento L (profundidad), c) control y tratamiento A (superficie), d) control y tratamiento A (profundidad), y e) control y biochar (superficie).

En el caso de las matas del **tratamiento A** no se observó la señal asociada a -OH/C=N ( $3000$  y  $3600\text{ cm}^{-1}$ ) debido a la disminución de la biomasa microfitobentónica como resultado del proceso de autoclavado. En cambio, los picos asociados a las señales de CH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, SiO/-CO/-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> aparecieron tanto en la capa superficial como en la profunda, pero de manera menos pronunciada en la primera, indicando una menor cantidad de grupos funcionales presentes en dichas muestras (Figs. 6.11 c, d).

Con respecto al **biochar** se observaron las señales de SiO, Si-OH, -SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y -OH/CO<sub>2</sub> ( $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ ,  $940\text{ cm}^{-1}$ ,  $616\text{ cm}^{-1}$  y  $2394\text{-}2280\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente), los cuales se asocian a minerales inorgánicos del sedimento debido a que se eliminó por completo toda la MO durante el proceso de muflado (Fig. 6.11 e). Incluso en este tratamiento se perdió la porosidad característica de las matas microbianas, tomando una apariencia de láminas negras de sedimento, y sumado a la eliminación de las

EPS se puede observar una incipiente aparición del pico de  $\text{CO}_2^-/\text{-OH}$ ,  $\text{C}=\text{N}$ . Según Sandoval (2006), el grupo funcional predominante en las arcillas, donde puede ocurrir el proceso de sorción, es el  $\text{-OH}$ , el cual puede estar unido a iones de silicio y aluminio formando  $\text{Al-OH}$  (aluminol),  $\text{Si-OH}$  (silanol) y  $\text{SiAl(OH)}_2$ .

En términos generales, en las Figs. 6.11 a-e se puede observar una mayor diversidad de grupos funcionales en la superficie del control y del tratamiento L en comparación con las capas profundas de ambos tratamientos y con ambas capas del tratamiento A y del biochar. Estos resultados se condicen con que la superficie de las matas microbianas alberga la mayor parte de los microorganismos fotosintéticos debido a la baja penetración de luz en las capas más profundas (Stal, 2012).

El Cr puede haber experimentado distintos procesos químicos y biológicos dentro de las matas microbianas, como la combinación con los grupos funcionales presentes en el EPS, en la pared celular de las microalgas y otros microorganismos, en la MO y en las partículas de sedimentos finos. El EPS contiene grupos carboxilos ( $\text{-COOH}$ ), fosfatos ( $\text{-PO}_4^{3-}$ ) y sulfhidrilos ( $\text{-SH}$ ) que se desprotonan en condiciones de  $\text{pH} \sim 7$ , lo que los vuelve aniónicos y propensos a la adsorción de metales (Li et al., 2018). Las membranas celulares suelen contener numerosos grupos funcionales cargados negativamente, como grupos carboxilo ( $\text{-COOH}$ ), amina ( $\text{-NH}_2$ ), y hidroxilo ( $\text{-OH}$ ), que actúan como ligandos bióticos para la adsorción de metales. De este modo, las interacciones electrostáticas y la variedad de grupos funcionales presentes en los componentes de las matas microbianas facilitan la adsorción del Cr, lo que resulta en una reducción de la toxicidad para los microorganismos presentes en estas comunidades microbianas (Li et al., 2021; Ma et al., 2018).

### 6.3.5. Identificación de minerales cristalinos por DRX

Los análisis de DRX de las matas microbianas del día final del ensayo frente a las cuatro situaciones propuestas mostraron la misma composición de minerales cristalinos en el control y los tres tratamientos con Cr analizados (A, B y L) (Fig. 6.12). Principalmente se detectó la presencia de cuarzo y plagioclasas y, en menor medida, arcillas y calcita.

Con respecto al Cr, se encontraron en la superficie de las matas microbianas del tratamiento L tres picos indexados a  $33,34^\circ$ ,  $36,08^\circ$  y  $49,66^\circ$  (Fig. 6.12 a), que coinciden con los tres principales picos asociados a óxidos o hidróxidos de Cr publicados en Pilco Arias y Miranda Jinde (2020) y Habtemariam y Kereta (2020). Estos picos se hallaron en la misma ubicación del espectro que los identificados en las matas microbianas expuestas a soluciones de Cr(III) en el Capítulo 4 (ítem 4.3.2.1) y no fueron detectados en la capa profunda del tratamiento L, ni en la mata autoclavada, ni en el biochar de este capítulo (Figs. 6.12 b-d). De estos resultados podemos concluir que parte del Cr incorporado como Cr(VI) se redujo biológicamente a Cr(III) en la superficie de la mata microbiana por medio de la acción de enzimas liberadas probablemente por las cianobacterias (Thatoi et al., 2014), ya que fueron los microorganismos más abundantes cuando dichas muestras se observaron bajo microscopios óptico y electrónico de barrido.

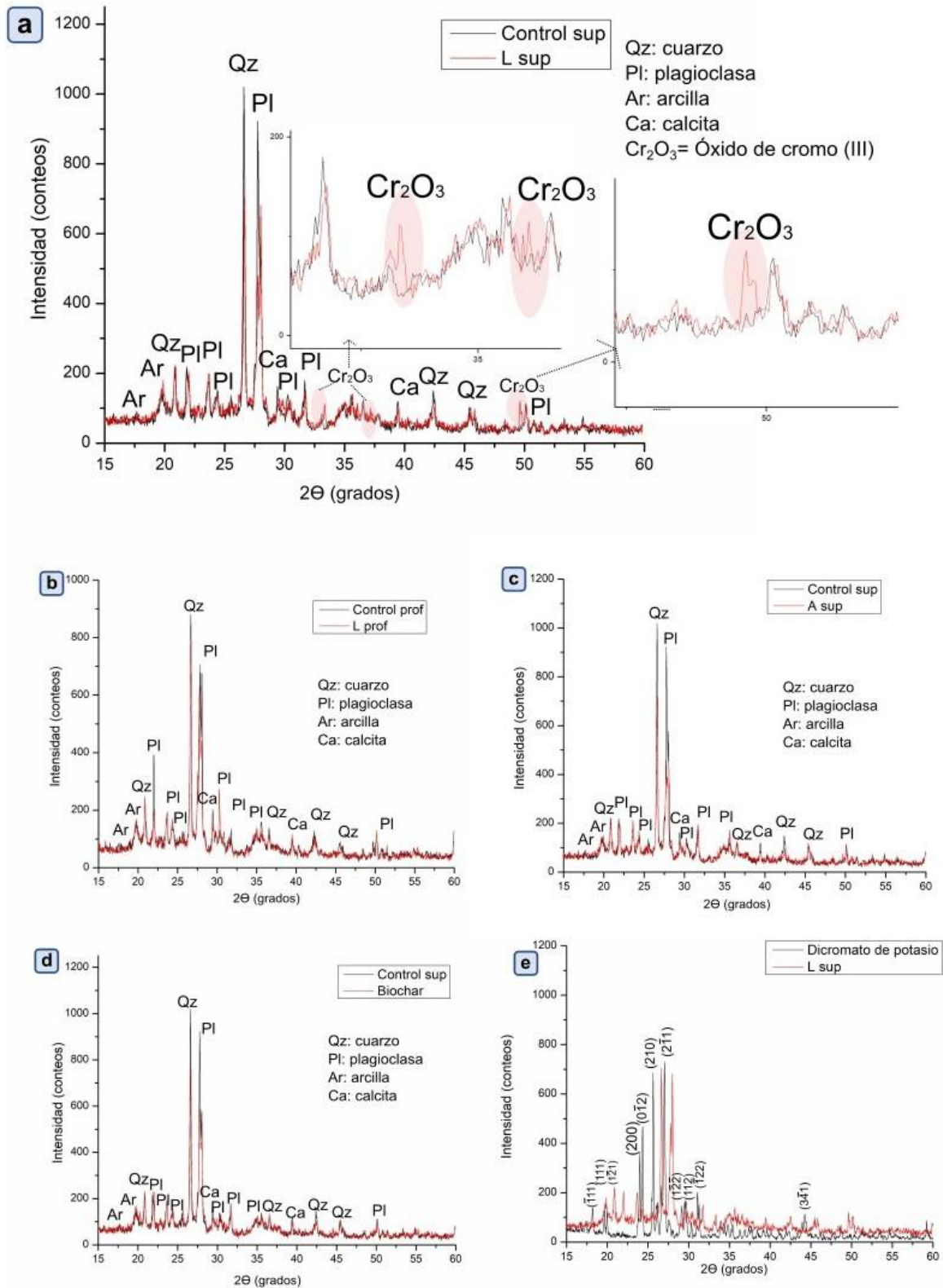


Fig. 6.12. Espectros de DRX comparativos entre a) tratamientos control y L (superficie), b) tratamientos control y L (profundidad), c) tratamientos control y A (superficie), d) tratamientos control y biochar (superficie), y e) tratamiento L (superficie) y dicromato de potasio (reactivo sólido).

El dicromato de potasio usado para preparar las soluciones de Cr(VI) también fue analizado con DRX para identificar los principales planos cristalinos que lo caracterizan y estos no fueron hallados en las muestras con Cr (Fig. 6.12 c). Esto último confirma que el dicromato de potasio no precipitó en la mata microbiana y que los iones cromatos no formaron estructuras cristalinas.

### 6.3.6. El rol de los componentes de las matas microbianas en la remoción de Cr(VI)

El Cr(VI) adicionado en solución pasó a formar parte del medio sólido (matas microbianas sometidas a los diferentes tratamientos propuestos). Cada tratamiento realizado permitió dilucidar el grado de intervención de los componentes de las matas en la remoción de Cr(VI). En base a los resultados obtenidos se proponen los diversos mecanismos de remoción que se detallan a continuación.

La eliminación de la materia orgánica mediante la combustión de las matas microbianas (**tratamiento B**) nos permitió evaluar la acción de las partículas de sedimento en la remoción de Cr(VI). Dado que la temperatura alcanzada en el proceso de pirólisis no altera la estructura de las partículas del sedimento (Liu et al., 2018), podemos considerar que el biochar presenta la misma composición granulométrica que las matas microbianas de campo (vistas en el Capítulo 3, ítem 3.3.2), donde la fracción fina de sedimento (<63  $\mu\text{m}$ ) fue del  $80,41 \pm 1,57\%$ . Entonces, podemos inferir que las partículas de sedimento fino (aproximadamente el 80% del biochar) fueron responsables de eliminar el **66,73%** del Cr(VI) (76,45% para Cr total) de las soluciones debido a su mayor superficie disponible para la adsorción de metales. Entre las partículas finas, las arcillas tienen un rol predominante en la captura de metales por los iones adsorbidos en su superficie ( $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{NO}_3^-$ ), que pueden estar disponibles para el intercambio iónico, adsorción o ambos

procesos (García-Sánchez, 2021). El proceso de sorción puede ser explicado desde el punto de vista de la desprotonación y protonación de los grupos funcionales en las arcillas. Por ejemplo, al subir el pH el  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Si-OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$  sufren una desprotonación (el  $-\text{OH}$  disocia su  $\text{H}^+$ ) y quedan cargados negativamente ( $\text{Al-O}^-$ ,  $\text{Si-O}^-$ ,  $-\text{NH}^-$ ,  $-\text{COO}^-$ ), lo que atrae cationes y forma complejos metálicos (Sandoval, 2006). En cambio, si ocurre un decrecimiento en el pH (condiciones fuertemente ácidas), los  $\text{H}^+$  se unen a los OH y quedan cargados positivamente ( $\text{Al-OH}_2^+$ ,  $\text{Si-OH}_2^+$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{COOH}^+$ ), lo que logra el efecto de sorción de aniones (Sandoval, 2006).

En cuanto a las matas microbianas autoclavadas (**tratamiento A**), se esperaba poder dilucidar el grado de influencia de la MO muerta (EPS y detritos) en los procesos de remoción de Cr(VI). La eficiencia de remoción por el tratamiento A fue del 94,98% para Cr(VI) (98,24% para Cr total), por lo cual la MO muerta fue responsable de remover el **28,25%** del Cr(VI) en solución. Estos resultados demuestran la relevancia de los procesos superficiales para la captura del Cr en la MO de la mata microbiana. Las EPS y las partículas orgánicas en descomposición derivadas de los microorganismos, aportan una gran superficie de adsorción donde los grupos funcionales y las atracciones electrostáticas juegan un rol importante en la unión a metales y formación de complejos organometálicos (Xu et al., 2019; Zhang et al., 2024).

Las matas microbianas vivas incubadas con un ciclo de luz y oscuridad similar al ciclo al que están sometidas en el ambiente (**tratamiento L**) ofrecerían mayor superficie de adsorción sobre las paredes celulares por la mayor cantidad de microorganismos presentes y brindarían más oportunidades para que se desarrollen mecanismos de resistencia intracelulares (reducción de Cr(VI) mediante la enzima reductasa, bioacumulación en organelas y/o eflujo de Cr al exterior de la célula). Sin

embargo, dichas matas mostraron una eficiencia de remoción del 98,51% para Cr(VI) (98,82% para Cr total), prácticamente la misma eficiencia que las matas autoclavadas. Estos resultados sugieren que los mecanismos intracelulares no son primordiales en la remoción de Cr(VI) por las matas microbianas del área de Puerto Cuatrerros del estuario de Bahía Blanca.

Con las matas microbianas sometidas a oscuridad continua (**tratamiento O**) se pretendía inhibir la función de los microorganismos fotosintéticos y dilucidar el rol de los microorganismos heterótrofos en los procesos de remoción de Cr(VI). Sin embargo, la eficiencia de remoción por dichas matas fue del 98,47% para Cr(VI) (99,39% para Cr total), similares valores a los obtenidos por los tratamientos A y L. Por ende, se deduce que los procesos de remoción de Cr(VI) no están influenciados por el metabolismo microbiano, ya sea autótrofo o heterótrofo, en las matas microbianas de Puerto Cuatrerros. No obstante, los procesos superficiales que involucran a la biomasa (viva o muerta) y sus derivados (EPS, metabolitos, desechos) desempeñan un papel fundamental en completar la captura de Cr(VI) de la solución.



## CAPÍTULO 7

### REMOCIÓN DE Cr(VI) EN PRESENCIA DE Zn Y Pb

#### 7.1. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de efluentes o la remediación de aguas naturales frecuentemente involucra la acción sobre una mezcla compleja de sustancias en la que otros compuestos, pueden influir negativa o positivamente en los procesos de remoción de un determinado metal o sustancia. La eliminación de metales en sistemas multicomponentes es un área poco explorada, principalmente debido a la complejidad adicional derivada de posibles interacciones entre sus diversos compuestos (Gómez-García et al., 2016). En este contexto, se pueden identificar tres situaciones distintas: 1) un aumento en la adsorción de un metal debido a la presencia de otros elementos, lo que se conoce como **efecto sinérgico**; 2) la ausencia de cualquier efecto por parte de los otros elementos en la capacidad de adsorción del metal, llamado efecto de **no interacción**; y 3) una disminución en la capacidad de adsorción del metal debido a la presencia de otros elementos, denominado **efecto antagónico** (Gómez-García et al., 2016; García-Mancha Delgado-Ureña, 2016).

El **Zn** es uno de los metales más utilizados en todos los organismos, siendo un elemento vital para el funcionamiento de una gran cantidad de enzimas, proteínas estructurales y ribosómicas, y de factores de transcripción (Botté et al., 2013; Kambe et al., 2015; Zhang y Zheng, 2020). Existe como catión divalente y no exhibe actividad redox en condiciones fisiológicas, lo que explica por qué desempeña múltiples funciones fisiológicas en una variedad de procesos biológicos (Kambe et al., 2015). Sin embargo, en diatomeas el exceso de Zn que ingresa a las células puede causar acidificación citoplasmática y alterar la organización normal del citoesqueleto. Esto a su vez ocasiona deformaciones en el frústulo, cambios en el tamaño celular y un

patrón de estrías alterado (Cantonati et al. 2014; Falasco et al., 2009; Negi et al., 2023). En invertebrados marinos, como los camarones, este exceso puede interferir con su capacidad de osmorregulación, pudiendo provocar la muerte (Arreguin-Rebolledo et al., 2024). El Zn ingresa al ambiente a través de varias fuentes, incluido el drenaje de minas, desechos industriales y municipales, escorrentías urbanas, y principalmente por la erosión de partículas del suelo (Noulas et al., 2018). Es usado principalmente en fertilizantes, neumáticos y materiales de construcción galvanizados (Noulas et al., 2018; Pérez, 2017).

El **Pb**, a diferencia del Zn, no es un elemento esencial para la biota (Botté et al., 2013; Raychaudhuri et al., 2021). De hecho, en la mayoría de los seres vivos el Pb, incluso a bajas concentraciones, genera efectos adversos graves tales como daños en cloroplastos, muerte celular y reducción de la biomasa de microalgas, y alteraciones en la homeostasis de los invertebrados marinos (Arreguin-Rebolledo et al., 2024; Oliveira de Souza et al., 2022). Es un metal utilizado en muchas industrias como las de automóviles, baterías, pigmentos, pinturas, pesticidas, tuberías, gasolinas, construcción de barcos, refinación y fundición del Pb e industria armamentista, entre otras (Alyazichi et al., 2016; Obeng-Gyasi, 2019; Wani et al., 2015).

Las mezclas de metales, como Cr, Zn y Pb, son comúnmente encontradas en diversos efluentes industriales, tales como las aguas residuales de industrias de galvanoplastia, pigmentos y pinturas (Morales Posada y Acosta Niño, 2010; Ramírez Marín et al., 2023; Sarín et al., 2006; Tabari et al., 2010). En consecuencia, debido al uso cotidiano de los productos generados por dichas industrias, la mayoría de estos metales también terminan ingresando en forma combinada al medio marino a través

de los efluentes urbanos y las escorrentías superficiales (Botté et al., 2013; Pérez, 2017). Esto nos llevó a realizar un ensayo con los siguientes objetivos:

- Evaluar la capacidad de remoción de Cr(VI), Pb(II), y Zn(II) y sus mezclas por las matas microbianas.
- Evaluar los efectos de dichos metales en forma individual y combinados sobre la comunidad microfitobentónica y las bacterias heterótrofas aerobias.
- Evaluar el contenido de materia orgánica y los parámetros físicoquímicos (pH y Eh) de las matas microbianas y las soluciones de de Cr(VI), Pb(II) y Zn(II) como condicionantes en la remoción de dichos metales.
- Determinar el rol de los diferentes componentes de las matas en el proceso de remoción mediante la caracterización elemental y mineral de las matas expuestas a Cr(VI), Pb(II) y Zn(II).

## **7.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.2.1. Preparación de soluciones**

Una solución madre de 500 mg Zn(II)/L fue realizada a partir de sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Anedra) y agua bidestilada. Para ello se pesaron 219,99 mg del reactivo y se disolvió en un matraz de 100 mL. Posteriormente, se ajustó el pH a un valor  $\leq$  a 2 mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl).

Por otro lado, se elaboró una solución madre de 500 mg Pb(II)/L en un matraz de 50 mL, utilizando 39,93 mg de nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , Mallinckrodt). Se añadieron 0,5 mL de HCl y se aforó con agua bidestilada.

La solución madre de 500 mg Cr(VI)/L se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Capítulo 5 (ítem 5.2.1). Finalmente se prepararon las diluciones con agua del estuario filtrada y las soluciones madres correspondientes hasta obtener

soluciones de 10 mg Cr/L, 10 mg Zn/L y 5 mg Pb/L. Se realizaron soluciones para cada metal individual y combinaciones de ellos (Cr-Zn, Cr-Pb, Zn-Pb y Cr-Zn-Pb). En este ensayo, los parámetros de salinidad y pH no se ajustaron según los resultados obtenidos para el Cr(VI) en el Capítulo 5, ya que se incorporaron otros metales (Pb y Zn) para los cuales no se evaluaron las condiciones óptimas de remoción por las matas microbianas. Las concentraciones de metales usadas se seleccionaron de modo que superen los valores máximos permitidos para la descarga de efluentes en la colectora cloacal y en cuerpos de agua superficiales (Res. N° 336/2003), y en base a la bibliografía consultada (Ahmad et al., 2020; Monteiro et al., 2011; Saavedra et al., 2018; Shukla et al., 2012).

### 7.2.2. Diseño experimental

En julio de 2022 se obtuvieron muestras de matas microbianas (n=24) de la zona intermareal del estuario, las mismas fueron dispuestas en recipientes acrílicos y mantenidas en oscuridad y frío hasta su llegada al laboratorio donde fueron aclimatadas durante cuatro días en cámara de cultivo bajo las mismas condiciones de luz y temperatura que las aplicadas en el ensayo del Capítulo 5 (ver ítem 5.2.2). También se colectaron cinco muestras (n=5 llamadas muestras de campo (F)) que no fueron sometidas a aclimatación ni a tratamiento alguno y se almacenaron para las determinaciones posteriores. Cada recipiente fue inundado con 300 mL de la solución correspondiente durante 5 horas al día por 3 días, simulando el efecto de marea del mismo modo que en los ensayos de los Capítulos 4 y 5. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: **TCr** (10 mg Cr/L), **TZn** (10 mg Zn/L), **TPb** (5 mg Pb/L), **TCrZn** (10 mg Cr/L+10 mg Zn/L), **TCrPb** (10 mg Cr/L+5 mg Pb/L), **TZnPb** (10 mg Zn/L+5 mg Pb/L) y **TCrZnPb** (10 mg Cr/L+10 mg Zn/L+5 mg Pb/L) (Fig. 7.1). Como control se

emplearon matas microbianas que se inundaron con 300 mL de agua de mar filtrada. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

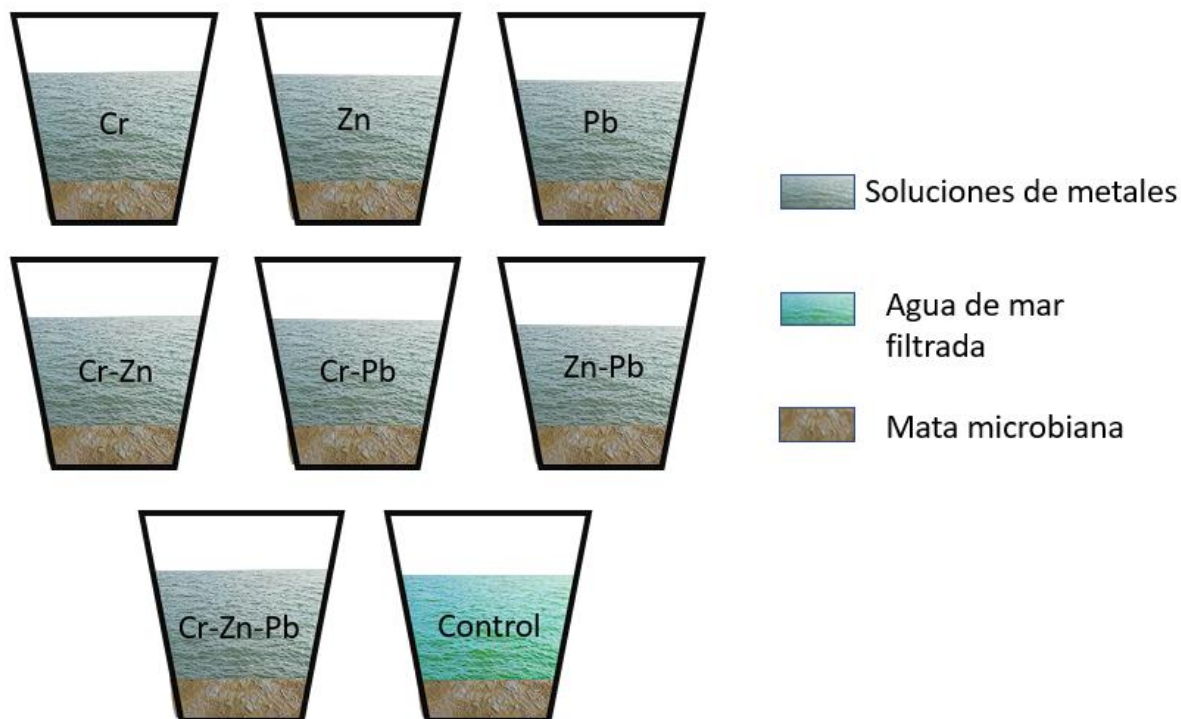


Fig. 7.1. Diseño experimental del ensayo de remoción de Cr(VI), Zn(II) y Pb(II). Soluciones de metales individuales y combinados.

Los parámetros fisicoquímicos (pH y Eh) se midieron al inicio y al final del ensayo, tanto en las soluciones como en las matas microbianas. Al concluir el experimento, las soluciones se almacenaron en botellas plásticas y se preservaron a pH 2 y en heladera hasta la determinación analítica de Cr, Pb y Zn (digestión en microondas y lectura en ICP OES; Capítulo 2, ítem 2.5.1). En el caso de las soluciones que contenían Cr una fracción fue separada en recipientes de 100 mL y se llevaron a pH mayor a 8 para la determinación de Cr(VI) por el método colorimétrico (Capítulo 2, ítem 2.5.2).

Finalizado el ensayo y extraída toda la solución de cada recipiente se tomaron submuestras de las matas microbianas y se almacenaron según los protocolos de cada análisis. Tanto en las muestras de matas microbianas del control y los

tratamientos como en las muestras de campo se determinaron las concentraciones de Cr, Pb y Zn, clorofila *a*, carbohidratos coloidales y capsulares, y el contenido de MO. Además, se les realizó análisis cuantitativo de la comunidad microfitobentónica, análisis DRX y SEM-EDS. Para DRX se homogeneizó en un mortero de porcelana la mata microbiana completa secada en estufa. En cambio, para SEM-EDS se efectuaron cortes perpendiculares a la superficie de la mata con el propósito de evaluar si la acumulación de metales se producía en profundidad o únicamente en la superficie (Fig. 7.2).

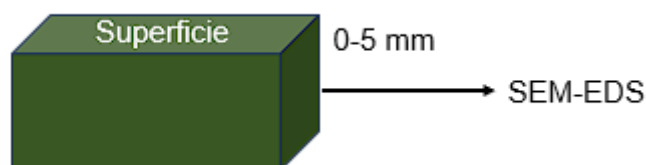


Fig. 7.2. Representación esquemática de la sección analizada en las matas microbianas para análisis de SEM-EDS.

De manera complementaria a las determinaciones y análisis mencionados, muestras de matas microbianas del día final del experimento del control y de los tratamientos Cr, Pb y Zn fueron tomadas bajo flujo laminar. Posteriormente fueron sembradas por triplicado en medio TSA e incubadas durante 48 horas a 27 °C para permitir el desarrollo de bacterias heterótrofas. Se realizó una descripción morfológica y el recuento de colonias, cuyo resultado se expresó como UFC/g y se llevó a cabo la tinción de Gram (ver detalles en Capítulo 2, ítem 2.6.5).

### 7.2.3. Análisis estadísticos

Un Modelo Lineal Generalizado (GLM) con distribución Beta fue realizado para comparar la eficiencia de remoción de Cr, Pb y Zn, y el contenido de MO (%) entre tratamientos al final del ensayo. La prueba de Tukey se utilizó para las comparaciones

*a posteriori*. Los paquetes utilizados fueron glmmTMB (Magnusson et al., 2017) y lsmeans (Lenth y Lenth, 2018).

Se llevó a cabo la prueba de ANOVA de una vía para comparar la concentración de Cr, Zn y Pb en matas microbianas y soluciones, y de Eh final en soluciones, entre tratamientos. También se utilizó ANOVA de una vía para comparar la concentración de clorofila *a*, feopigmentos, carbohidratos coloidales y capsulares, y abundancia de diatomeas y cianobacterias entre matas microbianas de campo y de los tratamientos al final del ensayo. La variable “carbohidratos capsulares” fue transformada con la función logarítmica, y la variable “cianobacterias” fue transformada con la función raíz cuadrada para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. La prueba de ANOVA de una vía también se realizó para comparar los recuentos de bacterias heterótrofas al final del experimento entre control, TCr, TZn y TPb, para ello la variable se transformó con la función raíz cuadrada. Pruebas LSD Fisher fueron aplicados para comparaciones *a posteriori*. La prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se llevó a cabo para los datos de Eh del día final en las matas microbianas. Se realizó un ANOSIM con 103 permutaciones para analizar la estructura de la comunidad microfítobentónica usando los datos cuantitativos del día final del ensayo transformados por raíz cuadrada y realizando una matriz de similitud de Bray Curtis.

### **7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **7.3.1. Remoción de Cr, Pb y Zn por las matas microbianas**

Los porcentajes de eficiencia de remoción para cada metal fueron muy variables, mostrando valores mínimos y máximos de 33,40-49,10% para Cr total; 26,58-45,34% para Cr(VI); 57,19-99,92% para Pb total y 33,00-92,30% para Zn total. Los valores

medios con sus errores estándar para cada metal y tratamiento son mostrados en la Fig. 7.3.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de remoción de Cr total (GLM,  $\text{Chisq}=39,48$ ;  $p<0,0001$ ), Cr(VI) (GLM,  $\text{Chisq}=104,15$ ;  $p<0,0001$ ), Pb (GLM,  $\text{Chisq}=62,23$ ;  $p<0,0001$ ) y Zn (GLM,  $\text{Chisq}=9,36$ ;  $p=0,03$ ) entre tratamientos (Fig. 7.3). Mayor cantidad de Cr total y Cr(VI) fue eliminado de las soluciones de los tratamientos TCrPb y TCrZnPb que de aquellas soluciones que no incluían Pb ( $p<0,05$ ). A su vez, se removi6 más Cr(VI) de TCrZn que de TCr ( $p<0,05$ ). Con respecto a la remoción de Pb la eficiencia fue mayor en el tratamiento TCrZnPb que en los demás tratamientos con Pb. A su vez, se elimin6 más Pb de la solución con Cr (TCrPb) que de los tratamientos TPb y TZnPb ( $p<0,05$ ). El Zn fue eliminado con mayor eficiencia en las soluciones del tratamiento TCrZn que del TZn (Fig. 7.3).

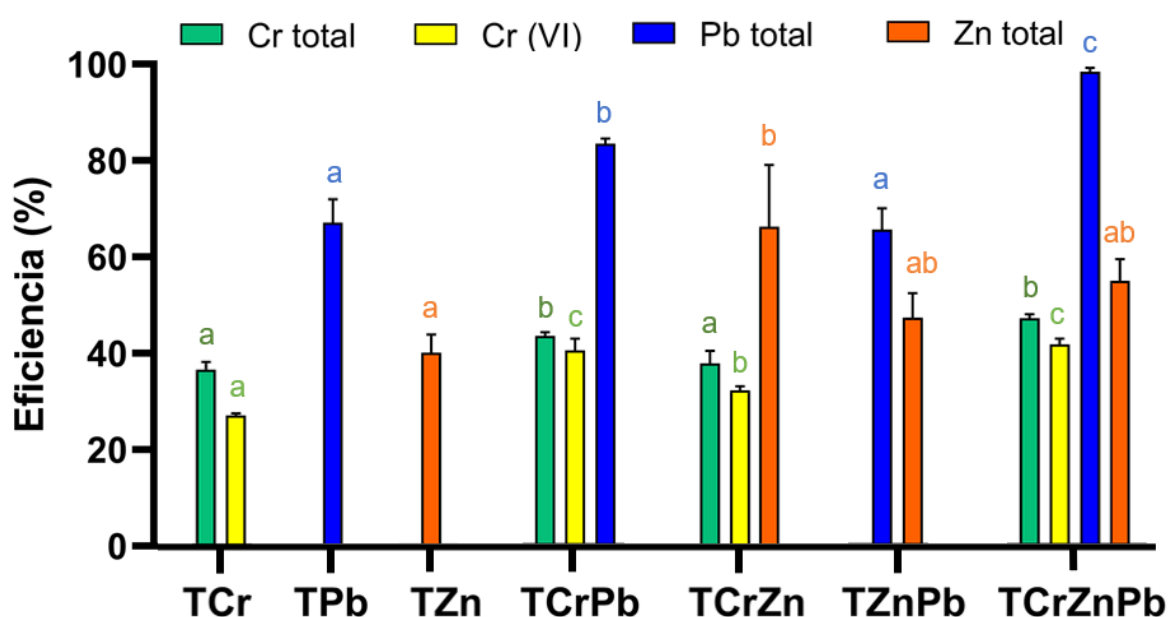


Fig. 7.3. Eficiencia de remoción (%) de Cr total, Cr(VI), Pb total y Zn total. Media  $\pm$  error estándar. Valores medios de cada variable (Cr, Pb y Zn) con una letra en común no son significativamente diferentes.

Del mismo modo, las concentraciones de Cr total ( $F=220,19$ ;  $p<0,0001$ ), Cr(VI) ( $F=22,55$ ;  $p=0,0003$ ), Pb ( $F=24,59$ ;  $p<0,0001$ ) y Zn ( $F=8,27$ ;  $p=0,004$ ) en las



soluciones al final del experimento mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Fig. 7.4). En los tratamientos con Cr, las menores concentraciones de Cr total y Cr(VI) se observaron en TCrPb y TCrZnPb. Mientras que para el Zn, las diferencias significativas se encontraron entre TCrZn y TZn, siendo menor la concentración en el primero. Con relación a los tratamientos con Pb se halló la menor concentración de Pb en TCrZnPb, seguido por TCrPb.

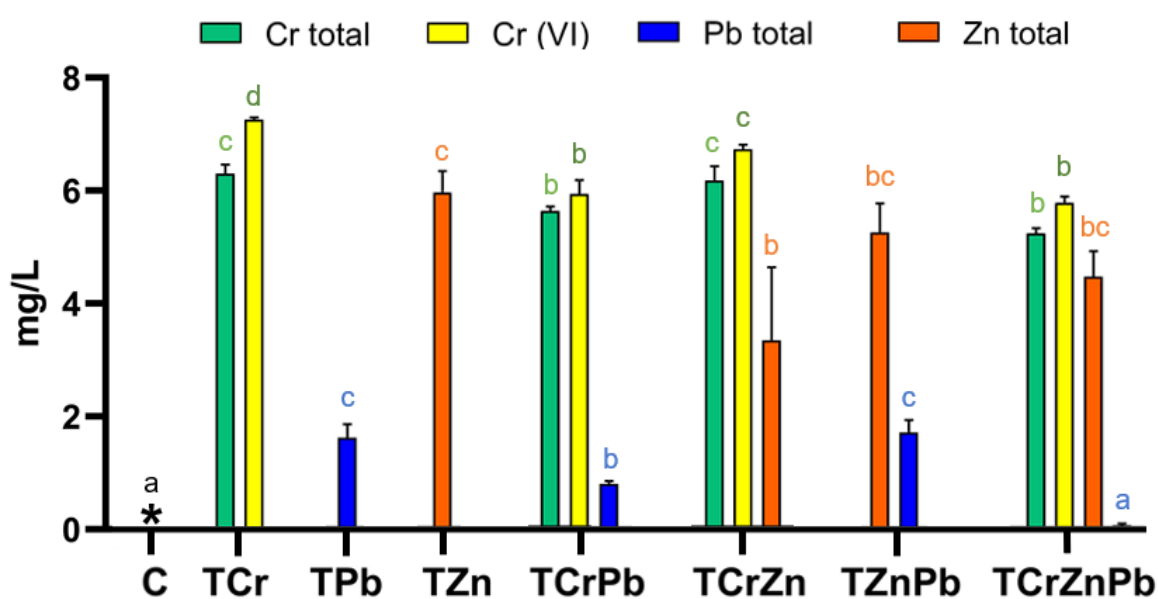


Fig. 7.4. Concentración de Cr total, Cr(VI), Pb total y Zn total (mg/L) en soluciones del día final del ensayo en el control (C) y en los tratamientos con metales (T). Media  $\pm$  error estándar. Medias de cada variable (Cr, Pb y Zn) con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). \*: solución control con  $< 0,002$  mg/L de Cr total,  $< 0,004$  mg/L de Pb y  $0,024 \pm 0,004$  mg/L de Zn.

La concentración de Cr total y Cr(VI) en las soluciones de todos los tratamientos al final del ensayo fue mayor a la concentración admisible para el vertido a cuerpos de agua superficiales según la autoridad del agua (ADA) de la provincia de Buenos Aires, Argentina (2 mg Cr total/L, 0,2 mg Cr (V)/L, Res. N° 336/2003). En cambio, la concentración de Zn fue inferior al valor admisible para la descarga a la colectora cloacal o a mar abierto ( $\leq 5$  mg/L) en TCrZn y TCrZnPb, pero no para el vertido a cuerpos de agua superficial ( $\leq 2$  mg/L) o para la absorción por el suelo, el cual

comprende solamente a las lagunas facultativas y riego por aspersión ( $\leq 1$  mg/L) (ADA, Res. N° 336/2003). Con respecto al Pb, en TCrPb la concentración fue menor al valor admisible para el vertido a la colectora cloacal ( $\leq 1$  mg/L), mientras que en TCrPb fue apto incluso para la descarga a cuerpos de agua superficiales y a mar abierto ( $\leq 0,1$  mg/L) (ADA, Res. N° 336/2003).

La Fig. 7.5 muestra las concentraciones de Cr, Pb y Zn totales en las matas microbianas del día final del ensayo. Como era de esperar, la concentración de Cr fue significativamente mayor en las matas con Cr añadido con respecto a las que no fueron expuestas a Cr ( $F=10,74$ ;  $p<0,0001$ ). A su vez, las matas del TCrZn mostraron mayor contenido de Cr que las de TCrZnPb ( $p<0,05$ ).

La concentración de Pb y Zn en las matas microbianas fue significativamente diferente entre tratamientos ( $F=13,41$ ;  $p<0,0001$  y  $F=9,31$ ;  $p<0,0001$ , respectivamente). Entre los tratamientos con Pb añadido fue mayor la concentración de Pb en TCrZnPb que en TCrPb y TZnPb ( $p<0,05$ ). Mientras que entre los tratamientos con Zn agregado fue mayor su concentración en TZnPb ( $p<0,05$ ).

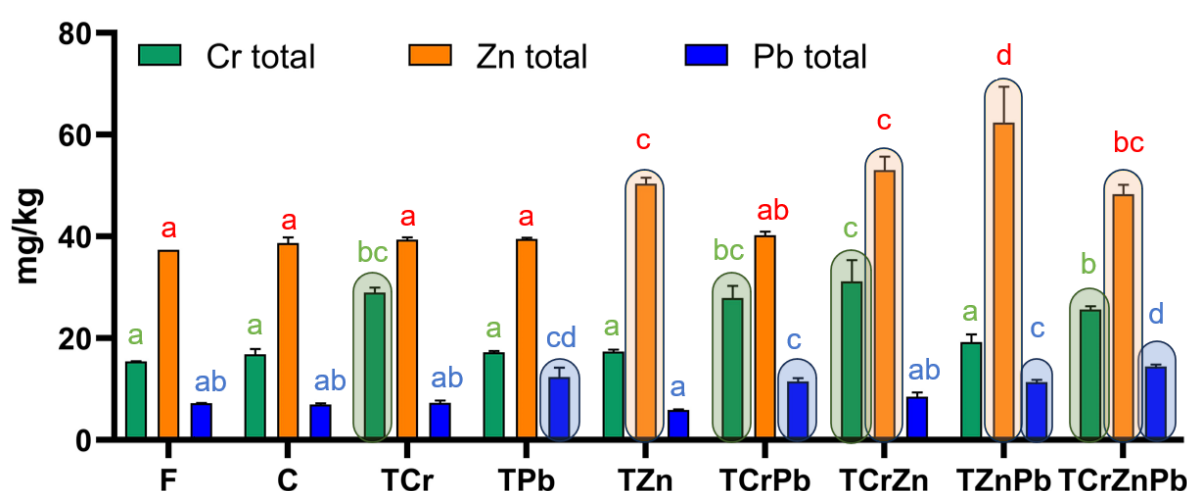


Fig. 7.5. Concentración de Cr total, Pb total y Zn total (mg/kg) en las matas microbianas de campo (F), del control (C) y de los tratamientos con metales (T) al final del experimento. Para cada tratamiento, las barras sombreadas corresponden al elemento añadido, mientras que las no sombreadas indican concentraciones ambientales. Media $\pm$ EE (error estándar). Medias de cada variable (Cr, Pb y Zn) con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0,05$ ).

Las concentraciones de Cr, Zn y Pb en las matas microbianas no superaron el valor recomendado por la legislación holandesa para sedimento (100 mg Cr/kg; 85 mg Pb/kg; 140 mg Zn/kg) (Van Volkshuisvesting, 2000). Tampoco superaron el valor recomendado para sedimentos marinos por la NOAA (52,30 mg Cr/kg; 30,24 mg Pb/kg; 124,00 mg Zn/kg) (Buchman, 2008).

La eliminación de Cr de las soluciones se vio favorecida en presencia de Pb, lo que sugiere un efecto sinérgico del Pb en la capacidad de remoción de Cr por las matas microbianas. Sin embargo, este efecto no fue evidente al observar las concentraciones de dichos metales en las matas. Es posible que el Cr(VI) en interacción con el Pb en la solución forme cromato de plomo, el cual tiende a precipitar debido a su insolubilidad (Unceta et al., 2010). Un ejemplo de cromato de plomo que se podría haber formado es la crocoíta ( $\text{PbCrO}_4$ ), un pigmento amarillo muy conocido que se utiliza comúnmente en pinturas y como potenciador del color amarillo en los plásticos (Greenway y Gerstenberger, 2010; MacLean et al., 2011). Se pudo observar un efecto sinérgico en la remoción de Pb cuando se encuentra en interacción con Zn y Cr, alcanzando casi su total eliminación de la solución (~99,92%). En el trabajo de Wang et al. (2023) el Zn también mostró un efecto sinérgico con el Pb, usando como bioadsorbente biomasa de *Bacillus subtilis*.

Con respecto a la capacidad de remoción de Zn en la solución, mostró mayor eficiencia cuando se encontraba en presencia de Cr pero en ausencia de Pb. Sin embargo, tampoco se observó el mismo efecto en la acumulación del metal en las matas microbianas. Según la bibliografía el Zn es el metal con menor efecto de competencia durante la remoción multicomponente, por lo cual es posible que el efecto al combinarlo con Cr y Pb sea el de no interacción (Mendoza-Castillo et al., 2016). De estos resultados se concluye que no hay efectos antagónicos en la

remoción de Cr, Pb y Zn cuando dichos metales se encuentran de manera simultánea en las soluciones.

### 7.3.2. Parámetros fisicoquímicos

El pH de las soluciones y matas microbianas se mantuvo en condiciones ligeramente alcalinas tanto al inicio como al final del experimento, siendo los valores similares entre los tratamientos (Tabla 7.1). El Eh de las soluciones se mantuvo en condiciones oxidantes (valores positivos) tanto al inicio como al final del experimento y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos al día final del experimento ( $F=1,10$ ;  $p=0,45$ ). El Eh medido en las matas microbianas presentó valores positivos al inicio del ensayo, mientras que al final fueron negativos en todos los tratamientos excepto en TZnPb y TCrZnPb. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al final del experimento ( $H=7,69$ ;  $p=0,36$ ).

Tabla 7.1. Valores de pH y Eh (mV) en las soluciones (sol.) y en las matas microbianas (MM) al inicio (a) y al final (b) del ensayo. Media  $\pm$  error estándar.

	pH sol.	pH MM	Eh sol.	Eh MM
<b>C-a</b>	8,54 $\pm$ 0,03	8,13 $\pm$ 0,44	65,00 $\pm$ 9,54	66,00 $\pm$ 39,55
<b>C-b</b>	8,75 $\pm$ 0,04	7,67 $\pm$ 0,30	85,00 $\pm$ 8,08	-1,00 $\pm$ 125,11
<b>TCr-a</b>	7,87 $\pm$ 0,02	8,32 $\pm$ 0,34	64,33 $\pm$ 30,33	49,67 $\pm$ 40,31
<b>TCr-b</b>	8,68 $\pm$ 0,07	7,88 $\pm$ 0,20	108,00 $\pm$ 4,51	- 114,33 $\pm$ 100,93
<b>TPb-a</b>	7,49 $\pm$ 0,04	8,15 $\pm$ 0,33	82,33 $\pm$ 11,84	72,00 $\pm$ 32,72
<b>TPb-b</b>	8,54 $\pm$ 0,06	7,54 $\pm$ 0,13	101,00 $\pm$ 9,29	-132,00 $\pm$ 90,97
<b>TZn-a</b>	7,12 $\pm$ 0,06	7,96 $\pm$ 0,36	89,33 $\pm$ 10,84	72,33 $\pm$ 32,84
<b>TZn-b</b>	8,29 $\pm$ 0,15	7,49 $\pm$ 0,12	110,67 $\pm$ 12,41	-66,33 $\pm$ 89,79
<b>TCrPb-a</b>	7,41 $\pm$ 0,01	7,85 $\pm$ 0,35	78,33 $\pm$ 11,17	58,00 $\pm$ 28,62
<b>TCrPb-b</b>	8,43 $\pm$ 0,12	7,86 $\pm$ 0,31	89,67 $\pm$ 5,78	-205,67 $\pm$ 28,17
<b>TCrZn-a</b>	7,21 $\pm$ 0,10	8,13 $\pm$ 0,36	81,00 $\pm$ 15,04	69,33 $\pm$ 37,10
<b>TCrZn-b</b>	8,25 $\pm$ 0,12	7,55 $\pm$ 0,16	99,67 $\pm$ 7,75	14,33 $\pm$ 33,93
<b>TZnPb-a</b>	7,00 $\pm$ 0,16	7,91 $\pm$ 0,35	95,00 $\pm$ 9,54	58,00 $\pm$ 35,73
<b>TZnPb-b</b>	8,29 $\pm$ 0,13	7,63 $\pm$ 0,16	102,00 $\pm$ 8,33	-168,33 $\pm$ 28,15
<b>TCrZnPb-a</b>	6,97 $\pm$ 0,11	7,80 $\pm$ 0,23	94,00 $\pm$ 11,93	69,00 $\pm$ 29,00
<b>TCrZnPb-b</b>	8,06 $\pm$ 0,11	7,96 $\pm$ 0,24	97,67 $\pm$ 6,69	48,67 $\pm$ 31,32

### 7.3.3 Mecanismos de remoción de Cr, Zn y Pb en matas microbianas

En la búsqueda de identificar probables mecanismos de remoción de los metales evaluados en este capítulo, cortes transversales de las matas microbianas al final del experimento fueron analizados por **SEM-EDS**. En las muestras de los tratamientos **TCr** y **TZn** los elementos Cr y Zn no fueron detectados en los mapeos, por lo cual no se obtuvieron evidencias de que dichos metales se depositen en capas superficiales ni en el interior de las matas microbianas. En el caso de las muestras del **TPb** se observaron precipitados de Pb en los cortes transversales, por lo cual se puede confirmar que dicho metal se infiltra dentro de la estructura de la mata pudiendo interactuar con sus diferentes componentes (Fig. 7.6).

La similar distribución del Pb y el C en los mapeos sugiere que el Pb forma complejos con la materia orgánica presente en la mata microbiana (primera fila de imágenes de la Fig 7.6). Según el diagrama de Pourbaix (Fig. 7.7) realizado por Tabelin et al. (2018) es termodinámicamente posible que el Pb acumulado, a los valores de pH y Eh registrados en las matas ( $\sim 7,5$  pH y  $-0,13$  V Eh), se encuentre como minerales carbonatados, cerusita ( $\text{PbCO}_3$ ) e hidrocerusita ( $\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$ ). La movilidad y solubilidad de estos compuestos de Pb es muy baja entre pH 6 y 8, por lo cual el Pb disuelto de la solución podría precipitar en la forma de los minerales antes mencionados (Tabelin et al., 2018).

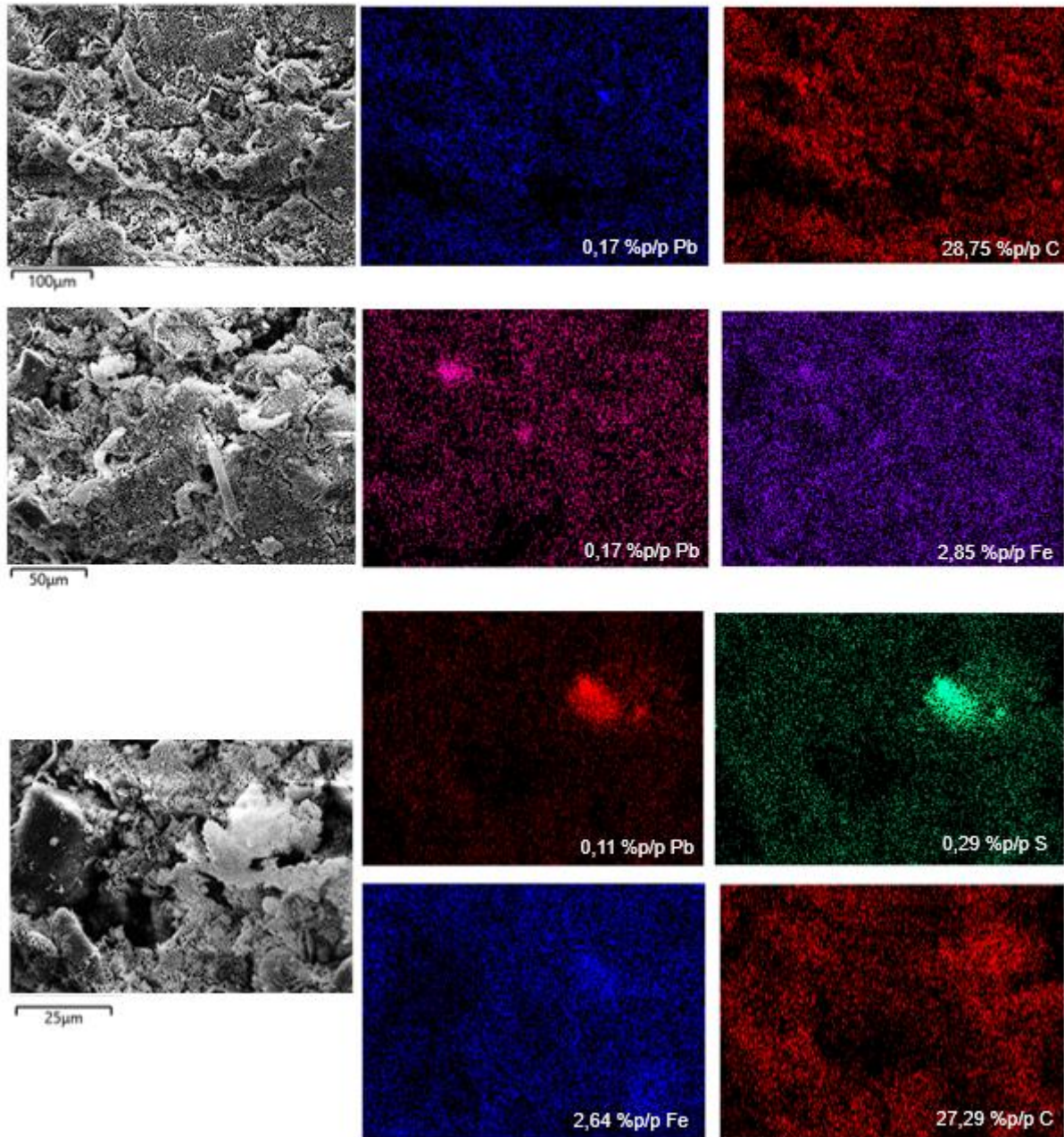


Fig. 7.6. Análisis SEM-EDS. Fotomicrografías y mapeos de Pb, C, Fe y S en tres sitios de un corte transversal de la mata microbiana del tratamiento TPb al final del ensayo. En cada imagen la parte superior corresponde a la parte más superficial de la mata.



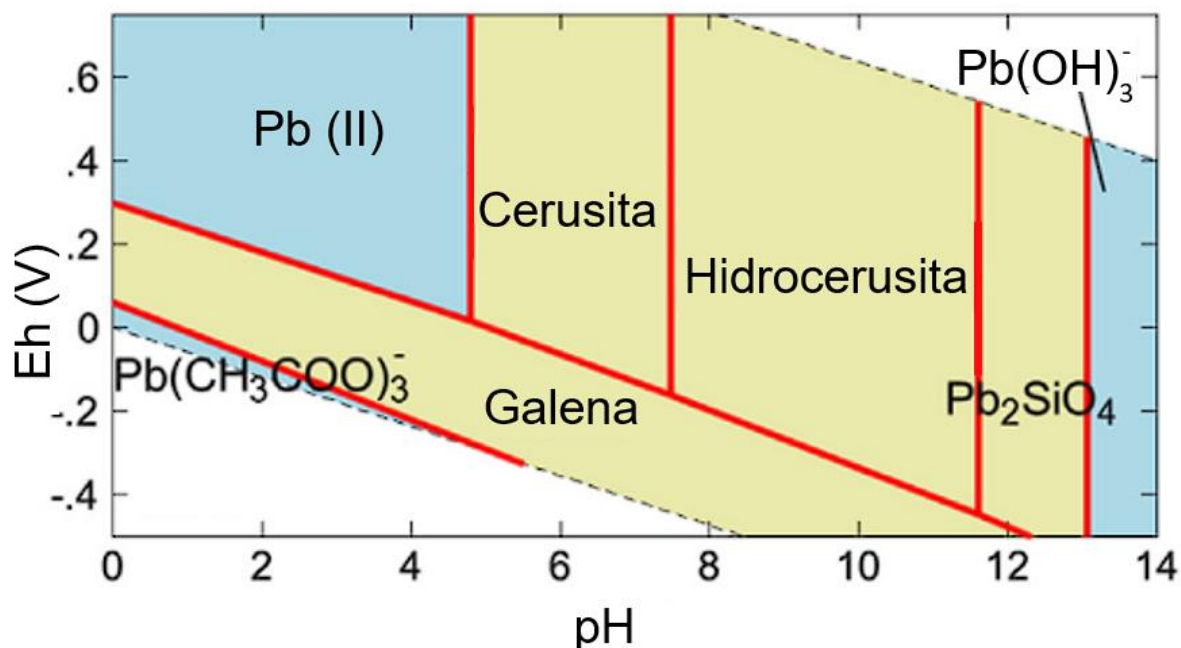


Fig. 7.7. Diagrama de Pourbaix del Pb (modificado de Tabelin et al., 2018).

Otro mecanismo involucrado en la inmovilización del Pb es la **sorción de Pb (II) a oxihidróxidos/óxidos de Fe** y minerales arcillosos del sedimento, lo que también puede suceder bajo las condiciones de pH imperantes en el experimento (Alyazichi et al., 2016; Dang et al., 2020; Tabelin et al., 2018). De hecho, en los mapeos de Fe (segunda fila de imágenes de la Fig. 7.6) las zonas de mayor concentración de Pb coincidieron con las áreas de más acumulación de Fe. Es posible que se hayan formado complejos de superficie de esfera interna entre el Pb (metal divalente) en solución y compuestos cristalinos con Fe en el sedimento, como la goetita y hematita (Tabelin et al., 2018). Esta interacción, que puede ocurrir en la interfase sólido/líquido, implica la adsorción de Pb mediante enlaces químicos fuertes, tales como los enlaces iónicos, con la esfera interna del metal, dando lugar a una interacción sólida e irreversible (Duan et al., 2024). Con respecto a las arcillas, puede ocurrir un intercambio catiónico y adsorción de Pb en los grupos funcionales de las arcillas presentes en las matas microbianas (Strawn y Sparks, 1999; Tabelin et al., 2018).

Por otro lado, en uno de los tres sitios mapeados (tercera fila de imágenes de la Fig. 7.6), se detectó azufre con intensidad y ubicación similar a la del Pb. En dicha área también se puede observar mayor acumulación de Fe y C (cuarta fila de imágenes de la Fig. 7.6). Esto sugiere la formación y precipitación de **minerales de sulfato de plomo** insolubles como puede ser la anglesita ( $\text{PbSO}_4$ ) y la plumbojarosita [ $\text{Pb}_{0,5}\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ] (Dang et al., 2020; Drahota et al., 2024; Tabelin et al., 2018).

Con respecto a los **análisis de DRX**, se encontró en las muestras del control y de todos los tratamientos al finalizar el experimento, la misma composición de minerales de cuarzo, plagioclasas (anortita) y arcillas (illita) que la registrada durante la caracterización de las matas microbianas (Capítulo 3, ítem 3.3.2). En la muestra del tratamiento **TCr** no se detectaron picos diferentes al control, por lo cual su espectro no se muestra. En la muestra de **TPb**, se detectaron tres picos nuevos, un pico fuerte a los  $35,45^\circ$  y dos picos menores a los  $29,44^\circ$  y los  $32,03^\circ$  (Fig. 7.8 a). Probablemente estos picos corresponden a óxido de plomo, ya que Meyer et al. (1995) observaron un patrón similar al realizar un espectro de DRX de  $\text{PbO}$ , con un pico más alto entre  $35^\circ$  y  $36^\circ$  y picos menores a  $\sim 31,90^\circ$  y  $28,50^\circ$ . También es posible que estos picos correspondan a minerales de sulfato de plomo por similitud a aquellos observados en Abdel-Rehim (2006). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo dicho trabajo fueron distintas ya que se obtuvo sulfato de plomo por oxidación de sulfuro de plomo al exponerlo a altas temperaturas.



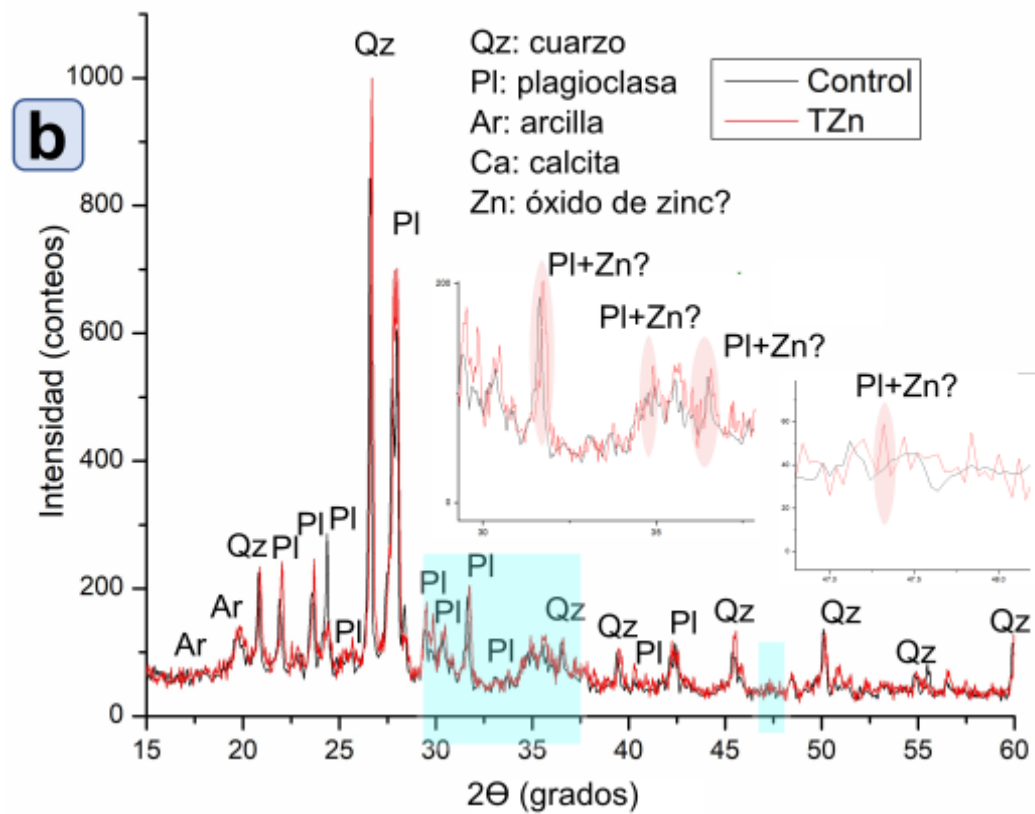
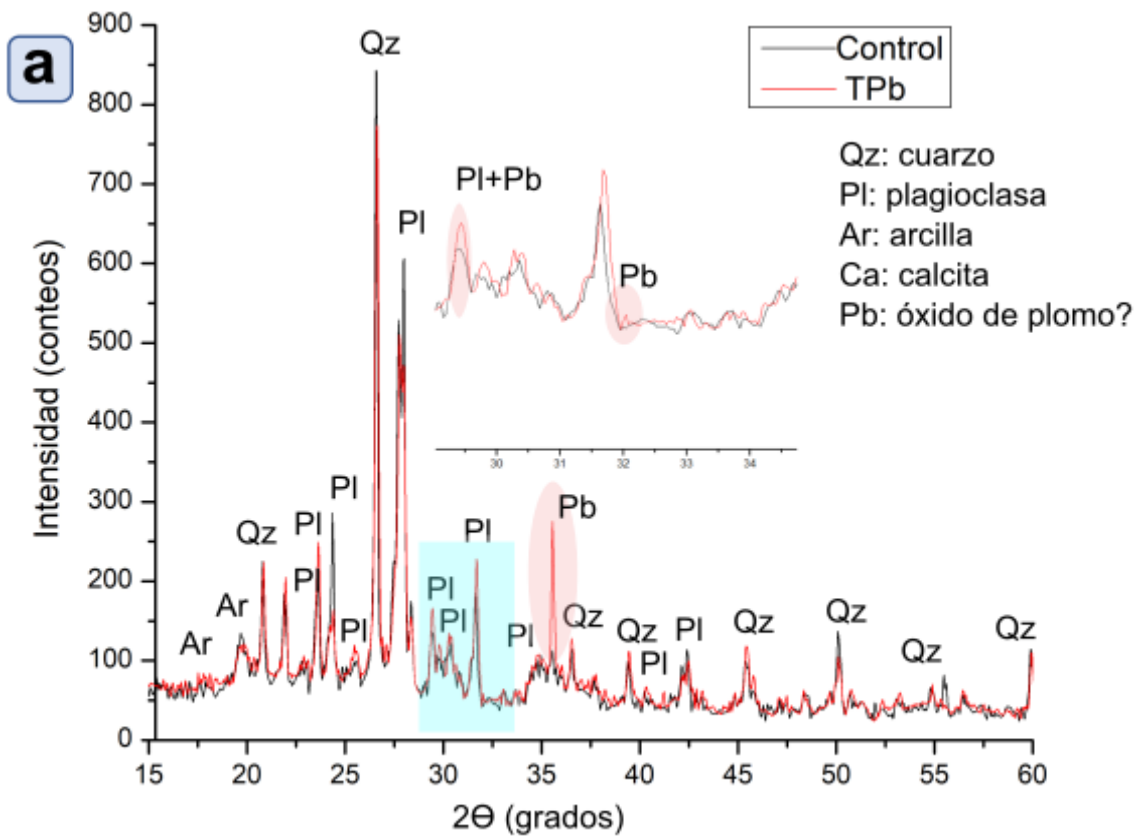


Fig. 7.8. Comparaciones de los espectros de DRX de las muestras control-TPb (a) y control-TZn (b).

Con respecto al **TZn**, se observaron varios picos más pronunciados que el control en  $31,72^\circ$ ; entre  $34,39^\circ$  y  $34,90^\circ$ ; entre  $36,03^\circ$  y  $36,59^\circ$  y en  $47,33^\circ$  (Fig. 7.8 b). Drahota et al. (2024) encontraron que el Zn se asocia preferentemente con (hidr)óxidos de Mn, minerales de sulfato y, en menor medida, a (hidr)óxidos de Fe (III). Según Benramache (2019), los picos del espectro de DRX del ZnO se observan en  $31,30^\circ$ ;  $34,50^\circ$ ;  $36,24^\circ$  y  $47,30^\circ$ , relacionados a los planos (100), (002), (101) y (102), respectivamente. Sin embargo, los picos observados en esta tesis estuvieron asociados a las señales de las plagioclasas, por lo cual es posible que ambas señales se hayan superpuesto o que no se haya formado ZnO en las matas microbianas.

Las diferencias observadas en los análisis de DRX para los tres metales evaluados individualmente pueden deberse a las propiedades químicas de cada elemento (o metal) en cuanto a la movilidad y solubilidad en sedimentos. La movilidad del Pb es muy baja en condiciones ácidas o neutras debido a la baja solubilidad de los minerales de hidroxisulfato y a la sorción de aniones ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en el sedimento. En cambio, el Zn, al hidrolizarse débilmente, puede requerir un pH más elevado para limitar adecuadamente su movilidad (Drahota et al., 2024). El ZnO(s) o la forma hidróxido  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  requieren un pH de 7 a 13 para precipitar en una solución acuosa (Al-Hinai et al., 2014). Con respecto al Cr(VI), como vimos en el Capítulo 5, es muy soluble, móvil, y a  $\sim$  pH 8 y Eh de -0,11 V la forma predominante sería  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$  acuoso, el cual puede requerir un pH alto ( $>10$ ) para formar precipitados sólidos ( $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ) (Bonnand et al., 2013; Mitra et al., 2017; Sapyen et al., 2022; Wang et al., 2016).

Tanto el Cr como el Zn, al ser más solubles, es posible que penetren las membranas plasmáticas más fácilmente y se desarrollen mecanismos intracelulares, disminuyendo así su concentración en la superficie de las matas, de modo tal que no son detectados por las técnicas de caracterización empleadas. Dentro de los

mecanismos de detoxificación, se sabe que las **metalotioneínas (MT)**, proteínas de bajo peso molecular ricas en el aminoácido cisteína, ayudan a reducir la absorción de varios metales, incluido el Pb, y están involucradas en la homeostasis (regulación intracelular) de metales esenciales como el Cu y el Zn en organismos, incluidas las diatomeas y las cianobacterias (Botté et al., 2013; Kong, 2022; Pernil y Schleiff, 2019; Wani et al., 2021). Las MTs son capaces de transportar Cu y Zn a receptores como las metaloenzimas o factores de transcripción, por lo cual son esenciales en procesos biológicos complejos e importantes, como la fotosíntesis, la respiración, la transcripción y la traducción, así como para la fijación de nitrógeno (Botté et al., 2013; Pernil y Schleiff, 2019). En la actualidad no se han encontrado metaloproteínas dependientes de Cr en procariontas, aunque en la célula vegetal, se ha demostrado que aumenta la síntesis de metaloproteínas tras la exposición de las plantas a Cr(III) y Cr(VI), con la finalidad de protegerse del daño oxidativo (Gomes et al., 2017).

#### **7.3.4. Efectos del Cr, Pb y Zn sobre la comunidad microfitobentónica y las bacterias heterótrofas**

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de **clorofila a** ( $F=0,54$ ;  $p=0,81$ ), **feopigmentos** ( $F=0,33$ ;  $p=0,95$ ), **carbohidratos coloidales** ( $F=0,98$ ;  $p=0,48$ ), **carbohidratos capsulares** ( $F=1,21$ ;  $p=0,34$ ) y en el contenido de **MO** (GLM,  $\text{Chisq}=10,81$ ;  $p=0,21$ ) entre las matas microbianas del campo, el control y los tratamientos con los 3 metales evaluados (Fig. 7.9).

Los **carbohidratos capsulares** forman parte de la pared celular de los microorganismos de la mata microbiana, mientras que los **carbohidratos coloidales** forman parte de los polisacáridos que constituyen las EPS que se libera al entorno (Fernández, 2017). El hecho de no haber detectado una mayor concentración de

carbohidratos coloidales en las muestras expuestas a metales sugiere que los microorganismos no incrementaron la secreción de EPS como mecanismo de defensa contra los metales. Varias especies de cianobacterias (*Oscillatoria*, *Chroococcus* y *Spirulina*) presentes en matas microbianas tienen alta tolerancia a elevadas concentraciones de Pb y acumulan dicho metal externamente en las EPS e intracelularmente en inclusiones de polifosfatos en el citoplasma (Maldonado et al., 2011).

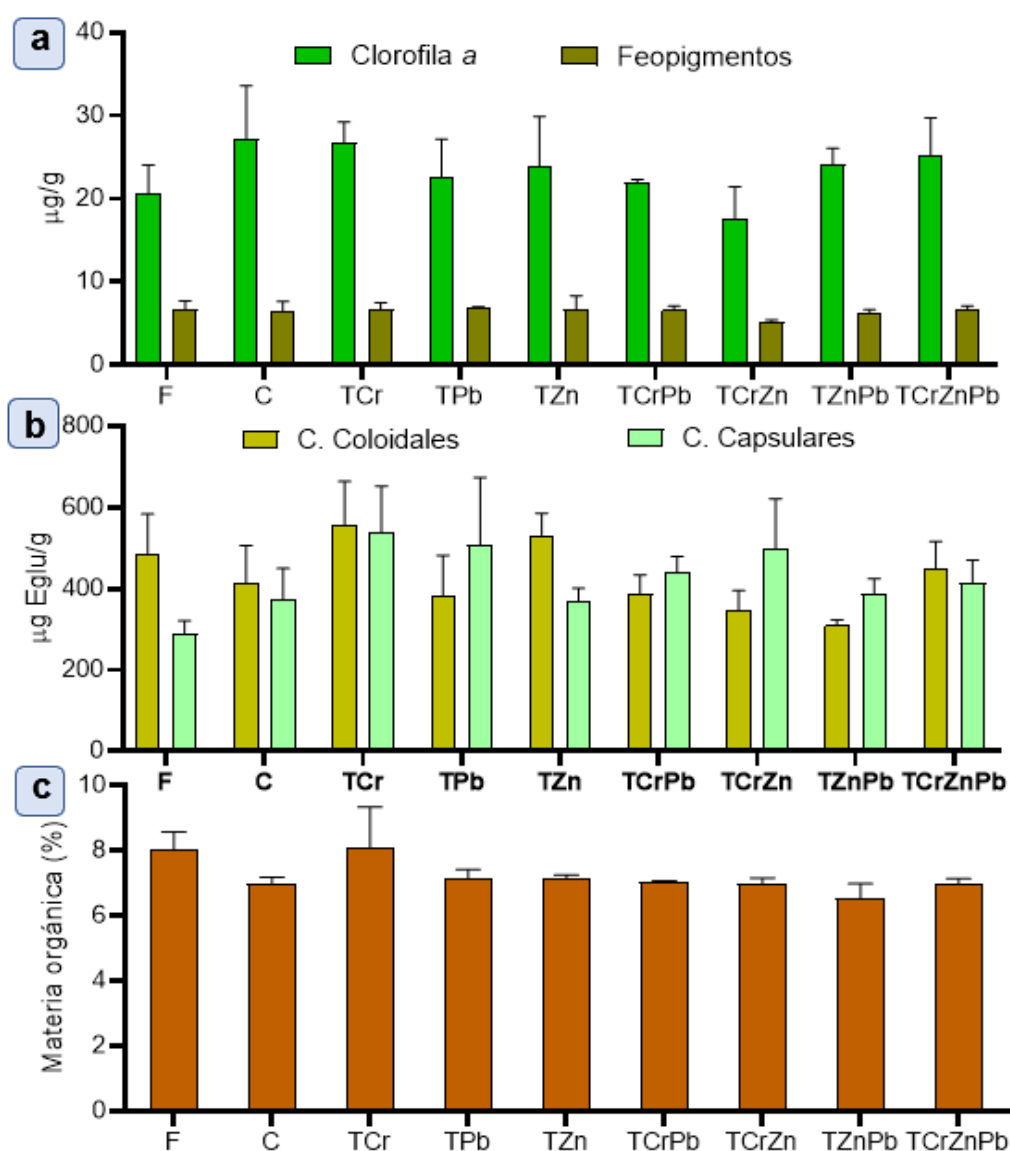


Fig. 7.9. a) Concentración de clorofila a y feopigmentos ( $\mu\text{g/g}$  de peso seco), b) concentración de carbohidratos coloidales y capsulares ( $\mu\text{g Eglu/g}$  de peso seco), c) contenido de MO (%), en matas microbianas del campo (F) y del día final del experimento (C: control, T: tratamientos con metales). Media  $\pm$  error estándar.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la **abundancia de cianobacterias** ( $F=3,03$ ,  $p=0,02$ ) entre las muestras de campo y los tratamientos al final del experimento. Sin embargo, el control no presentó diferencias con ningún tratamiento. La cantidad de cianobacterias fue significativamente mayor en el TCrZnPb en comparación a TCr, TZn y las muestras de campo, también fue mayor en TCrZn con respecto a TZn (Fig. 7.10).

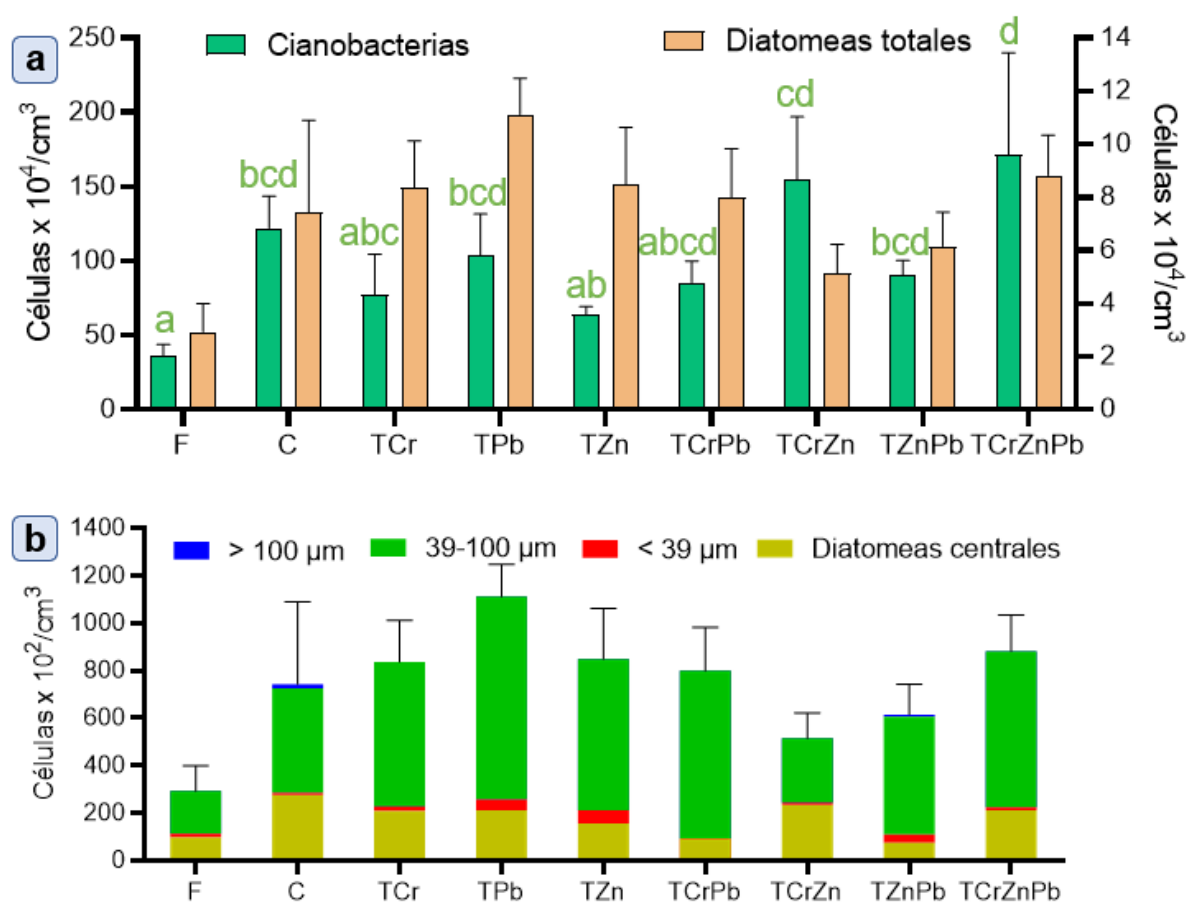


Fig. 7.10. Biomasa microfítobentónica en muestras de matas microbianas de campo (F), control (C) y tratamientos (T). a) Abundancia de cianobacterias (eje derecho) y diatomeas (eje izquierdo) (número de células x 10<sup>4</sup>/cm<sup>3</sup> de peso húmedo). b) Abundancia de diatomeas centrales y diatomeas pennadas de los rangos de tamaño <39µm, 39-100µm y >100µm (número de células x 10<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> de peso húmedo). Letras diferentes en cada conjunto de datos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$  LSD Fisher). Media  $\pm$  error estándar.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la **abundancia de diatomeas** totales ( $F=2,13$ ,  $p=0,08$ ), como así tampoco en la estructura de la

comunidad microfitobentónica (ANOSIM,  $R=0,11$ ,  $p=0,104$ ), entre las muestras de campo y los tratamientos al final del ensayo (Fig. 7.10).

Aunque la abundancia de cianobacterias y diatomeas en TCr no fue estadísticamente diferente a la encontrada en el control y los tratamientos TPb y TZn, cuando dichas muestras se observaron al microscopio electrónico de barrido (SEM) se observó una gran cantidad de estos organismos en TCr, a diferencia del control y los demás tratamientos sin adición de Cr (Fig. 7.11).

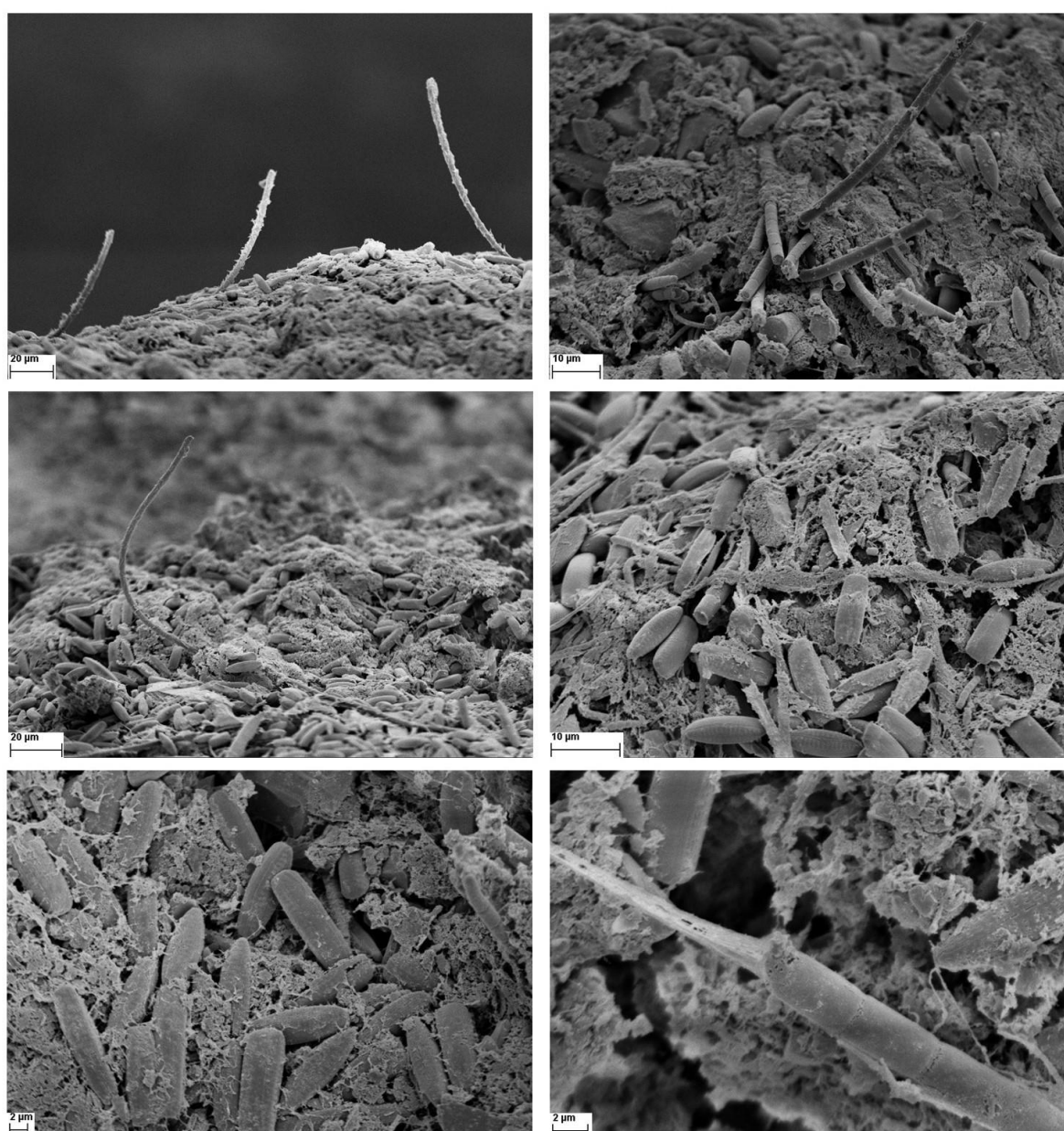


Fig. 7.11. Fotomicrográficas SEM de las matas microbianas del TCr al final del experimento.

A pesar de haber encontrado una variación en la abundancia de cianobacteria entre tratamientos, no se observó el mismo patrón en la concentración de carbohidratos capsulares ni en la de clorofila *a*. El hecho de que se registrara mayor número de cianobacterias tras la exposición a los tres metales en conjunto en comparación a cuando el Cr y el Zn se adicionaron individualmente podría sugerir que ocurrieron mecanismos diferentes de resistencia y de remoción de metales cuando estos estaban presentes de manera aislada o en combinación. Es posible que al estar aislados, el Cr y el Zn ingresen a las células lo que podría haber afectado negativamente a las cianobacterias y disminuyendo su abundancia. En cambio, cuando los tres metales se encuentran presentes simultáneamente podrían surgir mecanismos extracelulares, con formación de complejos organometálicos y precipitación sobre minerales inorgánicos, sin afectar la abundancia de cianobacterias.

En cultivos de microalgas (*Mesotaenium* sp.) y de cianobacterias (*Synechococcus* sp.), otros autores también observaron una mayor inhibición del crecimiento con iones metálicos individuales (Cr(VI), Cd(II), Zn(II)) que con una mezcla de ellos (Rathnayake et al., 2021). En el mismo trabajo, los efectos tóxicos del Cr fueron notablemente mayores en comparación al Zn. Sin embargo, en este ensayo, no hubo evidencias de mayor toxicidad producida por el Cr que por el Zn. Dichos autores, sugirieron que las mezclas de metales presentan un comportamiento de antagonismo sobre la inhibición del crecimiento de cianobacterias debido a la competencia entre los metales por los sitios de absorción (Rathnayake et al., 2021). Las microalgas poseen canales iónicos para el ingreso de Zn y Mn, la presencia de niveles elevados de metales puede disminuir su absorción y en última instancia su toxicidad.

Algunas especies de cianobacterias presentes en las matas podrían tener mayor resistencia a metales que otras. Por ejemplo, Maldonado et al. (2011) encontraron que algunos géneros de cianobacterias filamentosas (*Phormidium* y *Lyngbya*) fueron resistentes en microcosmos contaminados con más de 3000 mg/L de Pb. En cambio, Oliveira de Souza et al. (2022) cultivaron las cianobacterias unicelulares *Synechococcus* sp. y *Aphanocapsa* sp. con soluciones de Pb de hasta 5 mg/L y de Cr(VI) de hasta 1,65 mg/L por separado y obtuvieron un menor aumento de la biomasa y una baja producción de clorofila *a* en comparación al control.

El recuento de **bacterias heterótrofas** mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $F=45,44$ ;  $p<0,0001$ ), siendo mayor en TPb y menor en TCr en comparación al control ( $p<0,05$ ) (Fig. 7.11 a). En las placas del control y TZn se desarrollaron colonias de diferentes tamaños, formas y colores (Figs. 7.11 b y e, respectivamente). En el control se observaron seis tipos de morfologías (M1-M6), mientras que en el TZn se identificaron siete (M1-M7), destacándose en este último una única colonia color rojo intenso (Fig. 7.11 e y Tabla 7.2). En las placas sembradas con muestras del TCr se observaron pocas colonias pero con varios tipos de morfologías (M1, M2, M3 y M8) (Fig. 7.11 c). En las placas sembradas con muestras del TPb se observó una mayor cantidad de colonias pero con menor diversidad que los otros tratamientos (Fig. 7.11 d), se desarrollaron 2 tipos de morfologías diferentes, M9 y M10, de manera uniforme. Luego de la tinción de Gram, la observación bajo microscopio óptico nos permitió identificar que todos los tipos morfológicos contenían bacilos cortos a medianos Gram positivos, a excepción del M2 que tenía bacilos Gram negativos.



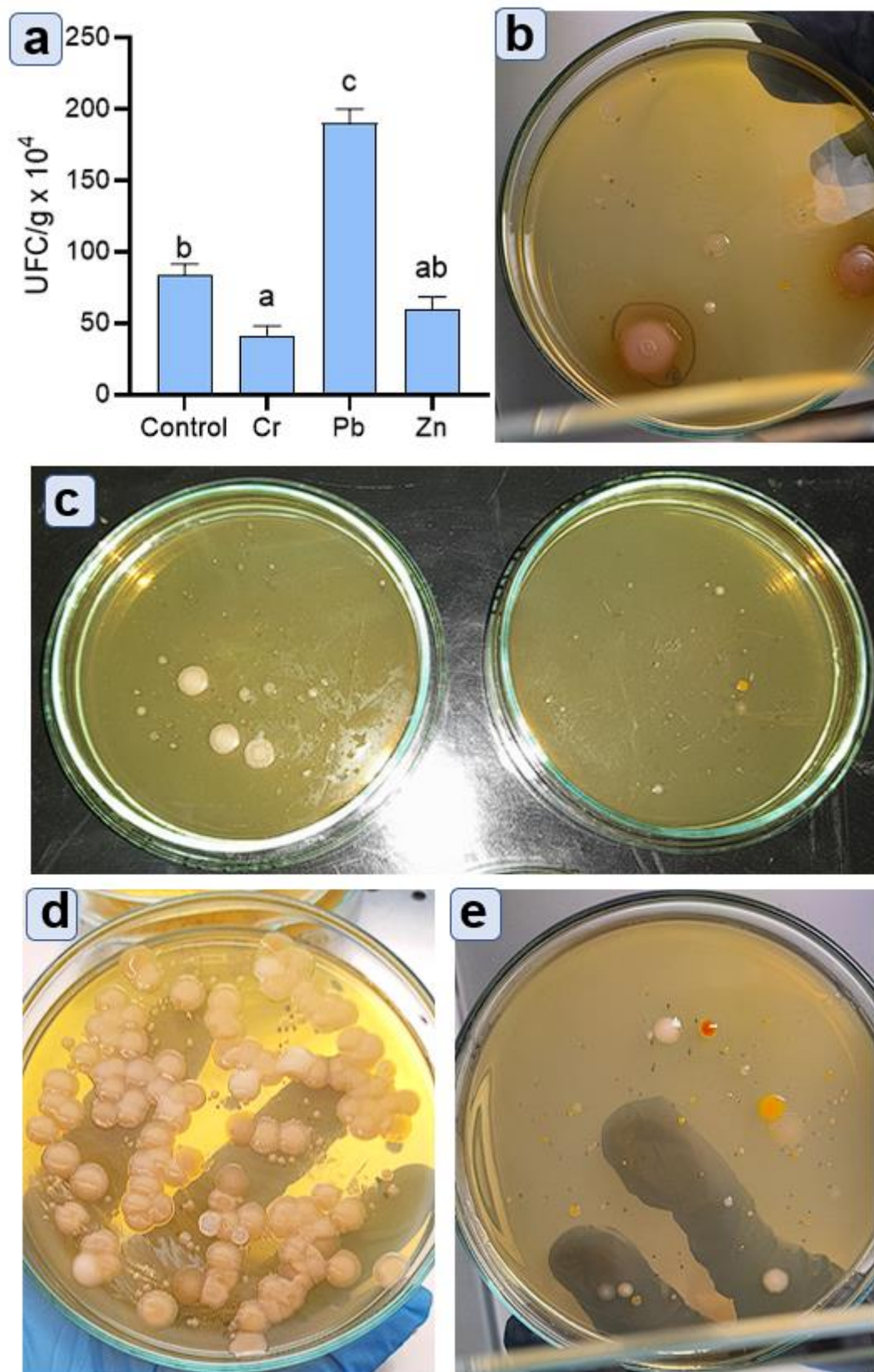


Fig. 7.11. Recuento de bacterias heterótrofas en las matas microbianas del día final del experimento. a) Número de unidades formadoras de colonias por gramo de sedimento húmedo (UFC/g). b-e) Placas de Petri con medio de cultivo Agar Triptona Soja y colonias de bacterias heterótrofas del control (b), TCr (c), TPb (d) y TZn (e).

Tabla 7.2. Tipos morfológicos (M1-M10) de colonias observadas en los cultivos de bacterias heterótrofas en placas con TSA del control (Ctrl), y los tratamientos (TCr, TZn y TPb). ND: no determinado.

	Tamaño	Coloración	Superficie	Forma	Bordes	Células	Gram	Tratamientos
<b>M1</b>	Grande	Rosado en el centro y traslúcido los bordes	Centro granuloso, periferia cremosa	Centro elevado, irregular	lisos e irregulares	Bacilos	+	Ctrl y TZn
<b>M2</b>	Pequeña	Amarilla	Creмоса	Circular, elevada	Lisos	Bacilos	+	Ctrl, TCr y TZn
<b>M3</b>	Pequeñas y medianas	Naranja	Creмоса	Circular, plana	Cóncavo	Bacilos	+	Ctrl, TCr, TZn
<b>M4</b>	Muy pequeña	Blanca	Creмоса	Circular, plana	Liso	Bacilos	+	Ctrl, TZn, TCr
<b>M5</b>	Pequeña	Blanca	Creмоса	Circular, elevada	Irregulares	Bacilos	+	Ctrl, TZn
<b>M6</b>	Mediana	Blanca	Rugosa, seca	Plana	Liso y remarcado	ND	ND	Ctrl, TZn
<b>M7</b>	Pequeña	Roja	Lisa	Circular, elevada	Liso	Bacilos	+	TZn
<b>M8</b>	Mediana	Marrón	Lisa	Circular	Liso	Bacilos	+	TCr
<b>M9</b>	Mediana	Blanco-crema, más clara en los bordes	Creмоса, brillante	Cóncava	Liso	Bacilos	-	TPb
<b>M10</b>	Pequeña	Marrón	Rugosa	Irregular	No definidos	ND	ND	TPb

En contraste a la comunidad microfitobentónica, las bacterias heterótrofas mostraron efectos claros ante la exposición de los tres metales evaluados. El Cr generó una disminución en la abundancia de la comunidad en general, mientras que el Pb eliminó a algunas bacterias y permitió la proliferación de otras. Por otro lado, el Zn no mostró efectos sobre las bacterias heterótrofas manteniendo una abundancia similar al control. Numerosas bacterias marinas han sido señaladas como tolerantes a metales y eficientes en la eliminación de los mismos por medio de procesos tales como la biosorción, la bioacumulación y la bioconversión (Ghosh et al., 2022). Entre estas bacterias se encuentran: *Marinobacter santoriniensis*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Alteromonas haloplanktis*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus pumillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi*, etc. (Ghosh et al., 2022; Naik et al., 2011). Las especies de *Bacillus* sp. muestran alta tolerancia al Pb y una tolerancia mínima al Zn y Cr en cultivos en placas con agar (Gupta et al., 2014). Análisis metagenómicos y ensayos enfocados en evaluar diferencias en la composición taxonómica de diatomeas, cianobacterias y bacterias heterótrofas antes y después de exponer a las matas microbianas a metales son necesarios para complementar la información brindada en este capítulo.

## CAPÍTULO 8

### DISCUSIÓN GENERAL Y CONSIDERACIONES FINALES

#### 8.1. EFICIENCIA Y MECANISMOS DE REMOCIÓN DE METALES POR MATAS MICROBIANAS

Los **mecanismos involucrados en la remoción** de metales por las matas microbianas pueden ser divididos en aquellos asociados a sus componentes inorgánicos y a sus componentes orgánicos. Entre los asociados a **componentes inorgánicos**, como se vio en el Capítulo 3 (ítem 3.3.2), los metales pueden **adsorberse** sobre minerales cristalinos con tamaños de partícula fina, entre los cuales se encuentran los **aluminosilicatos** y las **arcillas**, debido a sus propiedades de **intercambio iónico** y a su mayor relación superficie-volumen (Burakov et al., 2018; Chakraborty et al., 2015; Ferreyroa, 2015). En la mayoría de los análisis SEM-EDS realizados para esta tesis se pudo observar Cr y Pb depositado sobre las partículas de sedimento, incluso se encontró mayor %p/p de Cr en el sedimento fino que en el grueso (Capítulo 6, ítem 6.3.3.2) (Fig. 8.1).

Las arcillas modifican la velocidad en que ocurren los procesos de adsorción. En el trabajo de Jiang et al. (2010) arcillas de caolinita e illita fueron usadas para eliminar Pb, Cd, Ni y Cu de aguas residuales y observaron que el proceso de remoción fue muy rápido (30 min), demostrando además que el principal metal adsorbido sobre las arcillas empleadas fue el Pb, con una eficiencia del 95%. En esta tesis, las matas microbianas removieron el 67% de Pb en 15 horas de inmersión total con efecto de marea (Capítulo 7, ítem 7.3.1). A pesar de que las matas empleadas contienen la arcilla illita, no se alcanzó la eficiencia de remoción observada por Jiang et al. (2010), probablemente debido a que la proporción de arcilla en las matas utilizadas en esta tesis es muy baja (3,80 al 9,30%).

La eficiencia de remoción del Zn fue del 40% (Capítulo 7, ítem 7.3.1), mientras que para el Cr(III) varió entre 88 y 99% (dependiendo de la concentración de Cr empleada) en 15 horas de inmersión total con efecto de marea (Capítulo 4, ítem 4.3.2.1). Con respecto al biochar de la mata microbiana se determinó que remueve aproximadamente el 55% de Cr(VI) en 70 horas de inmersión continua, mientras que la mata viva remueve el 52% en las mismas condiciones de tiempo de inmersión (Capítulo 6, ítem 6.3.1). Esto indicaría que durante las primeras horas de inmersión el biochar elimina más eficientemente el Cr que la mata viva. Sin embargo, al aumentar el tiempo se observa que en el biochar la remoción es incompleta y que el proceso se detiene rápido en el tiempo. Además del tiempo de exposición, se determinó que el pH de la solución es un factor determinante para mejorar la eficiencia de remoción de Cr(VI) (Capítulo 5). Un medio ácido favorece la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por la mayor cantidad de protones disponible para dicha reacción en comparación a medios alcalinos.

Los metales también pueden ser transformados por óxidos de **Fe** y **Mn** presentes en los sedimentos mediante **reacciones de reducción y complejación** (Chakraborty et al., 2015; Dang et al., 2015; Dong et al., 2021). El Fe(II) es un importante reductor natural del Cr(VI) y la reducción química del cromato por Fe(II) es más de 100 veces más rápida que la tasa de reducción biológica (Madhavi et al., 2013). Los análisis por XPS (Capítulo 3, ítem 3.3.5) indicaron que las matas microbianas contienen Fe(II) pero no se detectaron señales de Mn. Sin embargo, no se obtuvieron evidencias de que el Fe esté involucrado en la remoción de Cr, ya que no se observaron solapamientos entre la distribución del Fe y el Cr en los mapeos de análisis SEM-EDS (Capítulos 4, 6 y 7). Por otro lado, con respecto al Pb, los mapeos mostraron que la distribución espacial se superpone con la del Fe y el S en varias áreas de las matas

microbianas lo que sugiere la formación de complejos cristalinos con Fe y S, y la precipitación de minerales de Pb insolubles en la mata (Fig. 8.1) (Capítulo 7, ítem 7.3.3).

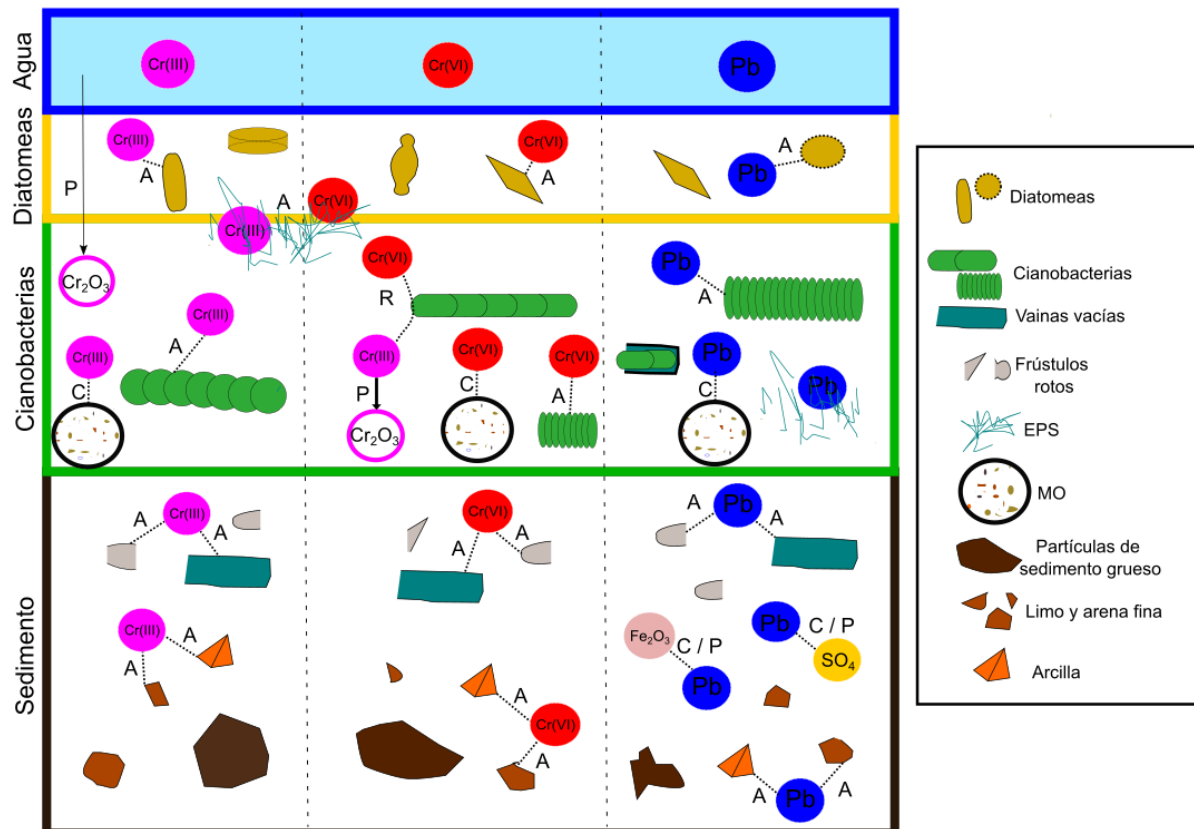


Fig. 8.1. Mecanismos de remoción de Cr(III), Cr(VI) y Pb por los componentes orgánicos (diatomeas, cianobacterias, vainas vacías, frústulos de diatomeas, EPS y MO) e inorgánicos (arena, limo, arcilla, óxidos de hierro, sulfatos) de las matas microbianas del estuario de Bahía Blanca (Puerto Cuatrerros). El recuadro celeste muestra los metales Cr(III), Cr(VI) y Pb en agua, los cuales se infiltran a las distintas capas de la mata microbiana. Cada estrato fue representado por los principales componentes encontrados en cada uno. Mecanismos de remoción: A: adsorción superficial. C: complejación. P: precipitación. R: reducción enzimática.

Por otra parte, los mecanismos de remoción asociados a **componentes orgánicos** de las matas microbianas pueden subdividirse entre los que involucran elementos extracelulares (materia orgánica en descomposición, EPS, enzimas, superficie celular) e intracelulares (citoplasma, organelas, enzimas, proteínas de transporte). Entre los **extracelulares**, la **MO** proveniente de la descomposición de los organismos, como así también de sus desechos y exudados, puede formar **complejos**

**organometálicos** con los metales (Xu et al., 2019). Esta MO desempeña un papel fundamental en el ciclo de los elementos y su interacción con los metales se debe a los grupos funcionales presentes en ella y al potencial negativo (Eh) que posee (Ferreyroa, 2015). De los metales evaluados en esta tesis, se detectó Cr y Pb sobre detritos de las matas y un patrón de distribución del Pb muy similar al del C (Fig. 8.1) (Capítulo 7, ítem 7.3.3).

Con respecto al Cr se sabe que la MO puede actuar como donante de electrones para procesos de reducción (Madhavi et al., 2013; Wu et al., 2017). En este trabajo se obtuvieron evidencias de que ocurrieron procesos de **reducción de Cr(VI)** en la superficie de la mata viva por haber detectado óxidos/hidróxidos de Cr, los cuales corresponden a compuestos de Cr(III). El hecho de no haber detectado estos compuestos en las matas sometidas a oscuridad permanente, en las autoclavadas, ni en el biochar sugiere que, aunque la materia orgánica de las matas podría donar electrones para los procesos de reducción, para que ellos ocurran es necesaria la liberación de **enzimas** por los microorganismos vivos, en particular las cianobacterias (Fig. 8.1) (Capítulo 6, ítem 6.3.5).

En las condiciones de pH y Eh que comúnmente se encuentran en las matas microbianas (alcalinas y de bajo Eh) el Cr(III) tiende a **precipitar** en la forma de óxidos/hidróxidos de Cr en su superficie. Aunque no es posible corroborar el estado de oxidación de cada elemento mediante análisis SEM-EDS, se observó Cr depositado sobre todos los componentes de las matas microbianas en los mapeos de las matas expuestas a Cr(III) como así a Cr(VI).

La **superficie de los microorganismos**, al igual que las **EPS** que ellos segregan, presentan **grupos funcionales** que se desprotonan y proporcionan sitios activos para la unión de iones metálicos, formando complejos de superficie metal-ligando. En las



matas microbianas se detectaron los grupos funcionales hidroxilo (-OH), carbonilo (C=O), carboxilo (-COOH), sulfato ( $-\text{SO}_4^{2-}$ ), amida (-C=N), amino (-NH<sub>2</sub>), fosfatos ( $-\text{PO}_4^{3-}$ ) (Capítulos 3 y 6). Todos ellos, a excepción de los sulfatos (minerales inorgánicos del sedimento), están presentes en la superficie celular de la mayoría de los microorganismos y en los polisacáridos y/o aminoácidos de las EPS (Braissant et al., 2009; Kalita y Baruah, 2023; Li et al., 2018). Estos grupos funcionales le confieren una carga negativa general neta a la superficie celular y, como resultado, una alta afinidad de unión de metales cargados positivamente (Kalita y Baruah, 2023). Ha sido demostrado por otros autores la inmovilización de Pb y Zn por grupos funcionales carboxilo, amida y fosfato de las bacterias y a grupos hidroxilos de las arcillas (Chen et al., 2016; Lundqvist, 2016; Musso et al., 2014; Tabelin et al., 2018).

Por otro lado, el Cr(III) puede unirse a los grupos funcionales carboxilo, amino, fosfato, hidroxilo (Li et al., 2019; 2018; Zhadra et al., 2021). Según Li et al. (2021) la **adsorción de dicromato** en la superficie celular se produce a través de **enlaces iónicos** y de **hidrógeno** con aminoácidos de las proteínas presentes en la membrana celular. Esto puede explicar las diferencias observadas en los ensayos de remoción de Cr(III) y Cr(VI) (Capítulos 4 y 6) en cuanto a las eficiencias de remoción. El Cr(III) tuvo mayor eficiencia de remoción en menor tiempo de exposición que el Cr(VI) debido probablemente a la gran disponibilidad de sitios de unión en las matas microbianas, mientras que el Cr(VI) debería pasar por un proceso previo de reducción para unirse a los grupos funcionales cargados negativamente o formar enlaces con las proteínas de las membranas celulares (Li et al., 2018). Con respecto al silanol (Si-OH), este ha sido asociado a la unión de metales, tales como Ca, Al, Ti (Huang et al., 2007; Reid et al., 2021). Más investigación es necesaria para confirmar si es posible



la unión de Cr, Pb y Zn al silanol o a enlaces Si-O presentes en abundancia en las matas microbianas.

Los **mecanismos intracelulares** de remoción de metales por los microorganismos involucran varios orgánulos celulares, entre ellos las vacuolas, los gránulos de polifosfato, los cloroplastos y las mitocondrias (Kalita y Baruah, 2023; Kumar et al., 2015 ). El Cr(III) y el Pb atraviesan las membranas celulares con baja eficiencia porque presentan baja movilidad y solubilidad (Tabelin et al., 2018). Sin embargo, el Cr(VI) y el Zn son más móviles y solubles, y se transportan a través de la membrana hacia el interior de la célula mediante transporte activo (Banci et al., 2002; Drahota et al., 2024; Thatoi et al., 2014).

El proceso de bioacumulación que ocurre en microorganismos vivos se inicia con la unión de los iones metálicos (Cr(VI) y Zn) a ligandos de la superficie de la célula (Singh et al., 2011). Luego, el complejo metal-ligando formado en la superficie es transportado al interior de la célula mediante una proteína transportadora (Thatoi et al., 2014). Una vez dentro de la célula, los complejos interactúan con proteínas de unión a metales, tales como metalotioneínas, y son finalmente almacenados en los tilacoides, en la matriz mitocondrial o en gránulos de polifosfato ubicados en vacuolas o en el citoplasma (Nouet et al., 2011; Singh et al., 2011; Thatoi et al., 2014). En las células fotosintéticas, tanto las mitocondrias como los cloroplastos requieren altas cantidades de metales (Fe, Cu, Mn, Zn y en menor medida Co y Mo) para las cadenas de transporte de electrones, reacciones redox y como cofactores de muchas proteínas. La demanda de estos metales por parte de los organismos fotosintéticos excede con creces la de los organismos no fotosintéticos (Nouet et al., 2011). Aunque es posible que estos mecanismos intracelulares operen en muchos de los microorganismos que habitan las matas microbianas, los resultados obtenidos en el

ensayo de remoción de Cr(VI) usando biochar y matas microbianas con su composición alterada (Capítulo 6) sugiere que no es el mecanismo principal, debido que en la mata autoclavada se alcanzó aproximadamente el mismo porcentaje de remoción de Cr respecto a las matas microbianas vivas con un ciclo normal de luz y oscuridad.

El uso de matas microbianas como agente de remediación resulta beneficioso en gran medida debido a los numerosos microorganismos que las componen y a su resistencia a diferentes concentraciones y estados de oxidación del Cr, así como a los metales Zn y Pb y a combinaciones de los mismos. En las paredes celulares de dichos microorganismos puede ocurrir la **adsorción superficial** (Fig. 8.1), incluso cuando los organismos mueren, las vainas vacías de las cianobacterias y los frústulos de las diatomeas pueden continuar adsorbiendo durante largos períodos de tiempo (Fig. 8.1) (Cameron, 2004; Levin et al., 2017).

Todos los mecanismos de remoción que tuvieron lugar en las matas microbianas pudieron haber sucedido de manera simultánea y/o de forma acoplada entre sí, contribuyendo en conjunto en la movilidad de los metales en la interfase sólido-líquido. Estos procesos culminaron en el secuestro e inmovilización de los metales en la estructura microbiana, evidenciando diferentes eficiencias de remoción alcanzadas según el metal, la concentración, el tiempo de exposición y las condiciones de pH proporcionadas. Las matas microbianas usadas mostraron una notable tolerancia a cambios fisicoquímicos, tales como variaciones en la salinidad, pH y tiempo de inundación. Esta capacidad las posiciona como potenciales candidatas entre las tecnologías de biorremediación para remover metales de diversos tipos de efluentes, tanto industriales como urbanos.

## 8.2. EFECTOS DEL Cr Y OTROS METALES SOBRE LA COMUNIDAD MICROFITOBENTÓNICA: MECANISMOS CELULARES PARA LA DETOXIFICACIÓN

La **comunidad microfitobentónica** es un constituyente significativo de las matas microbianas, actuando como excelente indicador de la calidad trófica de ambientes costeros. En los organismos fotosintéticos como las microalgas, los **metales** pueden interferir con la fotosíntesis y su metabolismo asociado al unirse irreversiblemente a los componentes de la cadena de transporte de electrones y ejercer un efecto negativo sobre la biosíntesis de clorofila, alterar la estructura de las membranas de los cloroplastos y afectar a los fotosistemas (Çelekli et al., 2016; Rathnayake et al., 2021; Suresh Kumar et al., 2014; Zakeri y Bakar, 2013). El Cr(VI) en concentraciones superiores a 0,5 mg/L puede dañar el centro de reacción del PSII, reducir la eficiencia de conversión fotoquímica y la eficiencia real de captura de energía luminosa, inhibiendo así la fotosíntesis en algas y afectando su crecimiento (Li et al., 2021). El Pb en concentraciones iguales o superiores a 2 mg/L puede disminuir la tasa fotosintética al alterar la ultraestructura del cloroplasto, obstruir el transporte de electrones e inhibir las actividades de las enzimas del ciclo de Calvin en microalgas (Zakeri y Bakar, 2013). El Zn es utilizado por las microalgas como cofactor enzimático, pero concentraciones altas pueden volverse tóxicas, reduciendo la tasa de división celular, el contenido de clorofila y la actividad de la molécula de ATP (Akbarnezhad et al., 2020; Li et al., 2020). Okmen et al. (2011) demostraron que con concentraciones de hasta 5 mg Zn/L los cultivos de cianobacterias de los géneros *Anabaena* y *Gloeothecce* mostraban cierto grado de tolerancia, pero a mayores concentraciones los valores de clorofila *a*, carbohidratos y proteínas eran reducidos.

Los ensayos con metales llevados a cabo durante el desarrollo de la presente tesis doctoral no mostraron evidencias de efectos tóxicos sobre la **comunidad microfitobentónica** de las matas microbianas procedentes del estuario de Bahía Blanca. La **clorofila a** fue evaluada en esta tesis para estimar la biomasa de las cianobacterias y diatomeas presentes en las matas microbianas antes y después de su exposición a los metales Cr, Zn y Pb. La concentración de clorofila *a* al final de los ensayos mostró **gráficamente un aumento** en la mayoría de los tratamientos con Cr respecto a los controles (Fig. 8.2). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los ensayos realizados, con concentraciones significativamente mayores sólo en los tratamientos con 15 y 20 mg/L de Cr(III). Este incremento podría ser atribuido a que las soluciones de Cr empleadas en ese ensayo fueron preparadas con  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ , con lo cual la presencia del nutriente nitrógeno puede haber favorecido un aumento de la biomasa generando mayores niveles de clorofila.

Otros autores determinaron que los **metales divalentes**, como Pb, Hg, Cu, Fe, Cd y Zn, pueden reemplazar al ión **Mg(II)** del anillo tetrapirrol de las moléculas de **clorofila a** (Çelekli et al., 2016; Manimaran et al., 2012; Rai et al., 2013; Zakeri y Bakar, 2013). Estos autores han asociado esta substitución a dos efectos opuestos en la concentración de clorofila *a*, o bien se inhibe la biosíntesis del pigmento o, por el contrario, el metal foráneo asume las funciones del Mg, estimulando así la producción de clorofila *a*. Esta discrepancia entre los efectos se ha atribuido a la concentración del metal, por ejemplo, Manimaran et al. (2012) determinaron que a concentraciones bajas de Cu, este asume las funciones de Mg, mostrando niveles elevados de concentraciones de clorofila, mientras que a concentraciones más altas

de Cu se inhibe la síntesis de precursores y enzimas que participan en la síntesis del pigmento fotosintético.

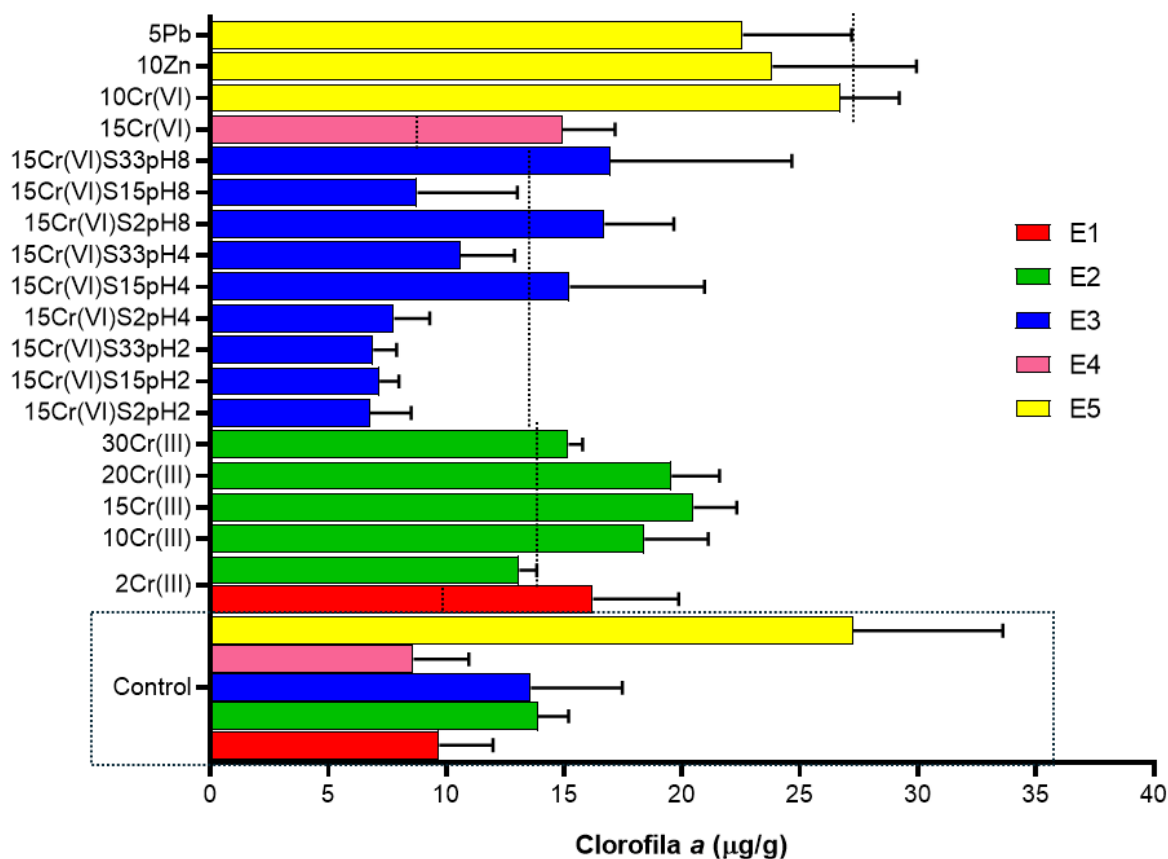


Fig. 8.2. Comparación de la concentración final de clorofila *a* en el control de cada ensayo (recuadro punteado) y en los tratamientos con Cr(III), Cr(VI), Pb(II) y Zn(II) de todos los experimentos de esta tesis. El número inicial en el nombre de cada tratamiento corresponde a la concentración del metal usado. **S2**, **S15** y **S33** equivale a las salinidades y **pH2**, **pH4** y **pH8** al valor de pH en el ensayo E3. Las **líneas punteadas** indican la concentración de clorofila *a* alcanzada en el control del respectivo ensayo. **E1**: Ensayo de remoción de Cr(III) con y sin aireación (Capítulo 4). **E2**: Ensayo de remoción de Cr(III) a diferentes concentraciones (Capítulo 4). **E3**: Ensayo de remoción de Cr(VI) bajo diferentes condiciones de pH y salinidad (Capítulo 5). **E4**: Ensayo de remoción de Cr(VI) usando biochar y matas microbianas modificadas (Capítulo 6). **E5**: Ensayo de remoción de Cr(VI) en presencia de otros metales: interacción con Zn y Pb (Capítulo 7).

Variaciones en la concentración de **clorofila a** fueron también observadas gráficamente en los experimentos con **Cr(VI)**, incluyendo aquellos donde se estudió la interacción con otros metales o cuando se modificaron variables fisicoquímicas (pH y salinidad). Según Vajpayee et al. (2000), el Cr(VI) también puede reemplazar los iones Mg de los sitios activos de muchas enzimas, reduciendo su actividad y, por

ende, disminuyendo el contenido de clorofila total y de proteínas. Rai et al. (2013) obtuvieron menor concentración de clorofila *a* cuanto mayor era la concentración de Cr(VI) (0-100 mg/L) en cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris*. Li et al. (2021) observaron un aumento en la concentración de clorofila *a* durante los primeros cinco días de exposición a 0,5 y 1 mg Cr(VI)/L en la diatomea *Cyclotella* sp, sin embargo, en días posteriores el contenido disminuyó con respecto al control.

En los diferentes ensayos realizados durante esta tesis, **no** fueron observados efectos claros de **toxicidad** por Cr, Pb y Zn en la comunidad microfitobentónica en relación con las variables abundancia de cianobacterias y diatomeas, concentración de clorofila *a* y feopigmentos, y concentración de carbohidratos coloidales y capsulares. Cuando se observaron muestras de los distintos tratamientos con Cr al microscopio electrónico de barrido siempre se observó una gran cantidad de diatomeas y cianobacterias en la superficie de las matas, en apariencia en mayor cantidad que la observada en las muestras de los controles. El hecho de que los análisis cuantitativos, donde se estima la concentración de células en los primeros 5 mm de la mata, no detecten diferencias significativas puede sugerir que el Cr provoca un cambio en el comportamiento y migración de las diatomeas y cianobacterias, generando una acumulación de las mismas en la superficie de la mata microbiana.

El hecho de que no se hayan observado efectos claros de toxicidad sobre los microorganismos que habitan las matas puede deberse a que se usaron **matas microbianas completas** y no alguno de sus constituyentes en forma individual. Las matas representan un consorcio donde los microorganismos, el sedimento, la MO y las EPS funcionan en conjunto como superficies de adsorción a metales, disminuyendo la entrada de estos a las células. De hecho, la formación de biofilms o matas microbianas representa un mecanismo de protección para los organismos que

la componen, y permite sobrevivir a las células en ambientes hostiles o en la presencia de estresores como los contaminantes derivados de la actividad humana. El principal mecanismo de resistencia a metales y agentes antimicrobianos es la barrera que forma la matriz mucilaginosa, en dicha barrera las sustancias potencialmente tóxicas se vinculan a las EPS y son “diluidos” a concentraciones subletales antes de que puedan llegar a todos los microorganismos dentro del biofilm (Hall-Stoodley et al., 2004).

Por otro lado, es posible que los microorganismos de las matas microbianas hayan liberado enzimas involucradas en la reducción de Cr(VI) al espacio extracelular como mecanismo de detoxificación celular. El Cr(III) generado en la reducción mencionada se combina con grupos carboxilo, hidroxilo y amino, y es inmovilizado en la superficie celular de los microorganismos, en las EPS y en las partículas finas de sedimento. Zhao et al. (2023) demostraron que el principal mecanismo de reducción del Cr(VI) en un biofilm es a nivel extracelular por medio de las EPS y de un proceso mediado por enzimas secretadas por bacterias, como por ejemplo las enzimas cromato reductasa.

Numerosos estudios realizados en el estuario de Bahía Blanca han puesto de manifiesto la presencia de diversos metales, entre ellos Cr, Pb, Zn (Botté et al., 2007, 2010, 2013; Negrin et al., 2021; Serra et al., 2017; Simonetti et al., 2013). La presencia de metales podría haber generado que los organismos microfitobentónicos que habitan esa área hayan desarrollado **resistencia**. Se sabe que algunos metales como el Cr(VI) y el Zn pueden ingresar a las células y desencadenar mecanismos de resistencia que involucran genes, los cuales codifican enzimas o proteínas de membrana implicadas en la reducción de Cr o en el transporte de Cr y Zn al exterior

de las células (Roosa et al., 2014; Thatoi et al., 2014; Xavier et al., 2019; Zhao et al., 2023).

Aunque los resultados obtenidos en la remoción de Cr por matas microbianas vivas y autoclavadas sugieren que los mecanismos intracelulares no son indispensables para este proceso, es importante realizar investigaciones adicionales que permitan dilucidar los mecanismos intracelulares de detoxificación involucrados en la resistencia a diversos metales. Esto proporcionaría una base sólida para la toma de decisiones en cuanto al diseño y composición de una tecnología de biorremediación basada en microorganismos presentes en las matas microbianas del estuario de Bahía Blanca.

### **8.3. ¿PUEDEN LAS MATAS MICROBIANAS CONVERTIRSE EN UNA HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA PARA LA REMOCIÓN DE METALES?**

La **aplicación a escala real** de una tecnología de remediación de metales usando matas microbianas enteras es un desafío por varias razones. Entre ellas, se encuentran la dificultad de cultivar a gran escala consorcios microbianos mixtos (autótrofos-heterótrofos) e impulsar la formación de la estructura de una mata microbiana, ya sea en el sedimento o en un sustrato artificial, y, finalmente, lograr reutilizar los metales o encontrar un destino para el producto final formado por las matas y los metales acumulados. Sin embargo, la utilización de un consorcio microbiano mixto es más simple, menos costosa y más adecuada para aplicaciones de campo en comparación a los cultivos puros, ya que es más probable que el consorcio sobreviva debido a las interacciones entre los microorganismos (Tang et al., 2021).



La mayoría de los estudios de remediación usando matas microbianas se han llevado a cabo con muestras transferidas al laboratorio (Abed et al., 2020; Coban et al., 2018; Licursi et al., 2013; Morales Pontet et al., 2024, 2023; Perillo et al., 2020). Sin embargo, varios grupos de investigadores han evaluado diferentes métodos de formación y crecimiento de biofilms y matas microbianas sobre **sustratos artificiales**, como lana de vidrio y placas de goma espuma, con la finalidad de describir la estructura y composición biológica (Fenchel, 1998a, 1998b). Hagadorn y Mcdowell (2011) realizaron experimentos en invernadero, en los cuales inocularon cianobacterias de agua dulce en bandejas cubiertas con 3 cm de arena de cuarzo para evaluar procesos sedimentarios generados por las corrientes. Otros autores estimularon la formación de un consorcio microbiano sobre hierbas flotantes en un estanque con sedimento no estéril con el objetivo de emplearlo en la remoción de metales, radionúclidos y contaminantes orgánicos recalcitrantes (Bender et al., 1989; 1991; 1994; 1995; Bender y Phillips, 2004). Incluso diversos diseños de reactores con consorcios microbianos utilizados para remediación han sido observados en la bibliografía (Cañizares-Villanueva, 2000; García-Mancha Delgado-Ureña, 2016; Paniagua-Michel y García, 2003; Vanzin et al., 2023; Zamora-Castro et al., 2008; Zhou et al., 2021). Determinar la composición microbiana de la mata microbiana e identificar el grado de contribución de cada especie en la remoción de metales es imprescindible para tomar decisiones en cuanto al diseño y los componentes bióticos esenciales para la creación de un sistema de remediación usando matas microbianas, aplicable a gran escala.

En el ensayo de remoción de Cr(III) del Capítulo 4 (ítem 4.2) de esta tesis, se observó que la aireación no afectó negativamente a la comunidad microfitobentónica pero mejoró el porcentaje de eliminación del Cr del agua. Por lo tanto, la aireación del

agua sería beneficioso durante los procesos de remoción pero no se sabe si es un requerimiento durante las etapas de formación y desarrollo del biofilm y/o mata microbiana. Asimismo, existe una gran falta de información acerca de la frecuencia e intensidad de riego o inundación adecuada para lograr mayores tasas de crecimiento de biofilms y matas microbianas en un ecosistema artificial. Sin embargo, investigaciones a campo demuestran que las matas de la zona supramareal, las cuales son inundadas sólo en mareas vivas o en eventos de tormentas, alcanzan mayor desarrollo (hasta 15 mm de altura) que las de zonas intermareales que son inundadas diariamente (Noffke, 2010). A pesar de que en esta tesis no se comparó el efecto de marea y de inundación permanente sobre la remoción de Cr de manera simultánea, la comparación de los controles en la Fig. 8.2 permite observar que aquellas que estuvieron inundadas de forma permanente durante 17 días (control del E4) presentaron menor concentración de clorofila *a* al final del ensayo que los controles con efecto de marea de los demás ensayos (control del E1, E2, E3 y E5). Este resultado y la información recopilada permite plantear la hipótesis de que las matas microbianas tienen mayores tasas de crecimiento cuando se alternan períodos de sequía con períodos de inundaciones y que es necesario una intensidad alta pero de forma esporádica de la corriente de agua sobre las matas microbianas para ayudar a generar una dispersión y colonización de las mismas sobre sedimentos adyacentes.

Si bien lograr la formación de una mata microbiana completa de manera artificial puede resultar difícil, se obtendrían grandes beneficios en la eliminación de sustancias contaminantes en soluciones y podrían ser empleadas no solo para la remoción de metales si no incluso podrían ser eficientes en la remoción de otras sustancias, como nutrientes, compuestos orgánicos recalcitrantes, etc.

Finalmente, se hace necesario pensar en el tratamiento o uso que se dará con posterioridad a las matas microbianas con los metales retenidos en su estructura. Entre las opciones posible se incluye la excavación de las matas para su posterior tratamiento y recuperación del metal acumulado para luego ser reutilizado, o el uso de la mata con el metal acumulado en la fabricación de materiales de construcción como ladrillos, morteros de cemento y hormigón (Liu et al., 2018). Como última opción, pueden ser confinadas en sitios de aislamiento para evitar la liberación de los metales cuando los microorganismos mueran o se produzca un disturbio en la mata.

En conclusión, el uso de matas microbianas como agentes de remediación de metales ofrece una potencial solución para abordar el grave problema ambiental de acumulación y biomagnificación de metales en los ecosistemas marinos, particularmente en aquellas áreas que reciben directa o indirectamente los residuos de actividades humanas. La biorremediación con matas microbianas constituye un proceso biotecnológico que incluso podría ser aplicado a sistemas con niveles bajos de contaminación pero persistentes en el tiempo, es decir crónicos. Sin embargo, este enfoque presenta desafíos que requieren la continuación de una investigación detallada en diversos aspectos.

La investigación llevada adelante en el marco de esta tesis no solo buscó contribuir al conocimiento científico sobre las matas microbianas y evaluar la participación de sus componentes en la remoción de Cr y otros elementos, sino también proporcionar las bases para una biorremediación sostenible y sustentable ambientalmente, y lograr así el equilibrio y la integridad de los sistemas marinos costeros y del mar adyacente.

#### 8.4. CONCLUSIÓN

Luego de haber realizado cinco ensayos de remoción de metales y empleado numerosas técnicas analíticas para detectar diferencias en los componentes bióticos y abióticos de las matas microbianas entre tratamientos, como así también para caracterizar la composición elemental, mineral y de grupos funcionales en las matas antes y después de exponerlas a metales podemos concluir que las matas microbianas poseen la capacidad de remover metales como Cr(III), Cr(VI), Pb y Zn del medio acuoso y este proceso no presentó efectos adversos en la biomasa de la comunidad microfitobentónica ni en la concentración de carbohidratos coloidales y capsulares. Por lo tanto, las matas microbianas constituyen una herramienta capaz de remover con mayor eficiencia los metales en comparación a sedimentos inertes.

A continuación, se detallan las conclusiones generales obtenidas a lo largo de la tesis:

- ★ Airear las soluciones de Cr(III) aumenta la eficiencia de remoción de Cr por las matas microbianas sin alterar la biomasa ni la estructura de la comunidad microfitobentónica.
- ★ Las matas microbianas remueven eficientemente el Cr(III) en soluciones de hasta 15 mg Cr(III)/L.
- ★ La caracterización mineral, elemental y de grupos funcionales presentes en las matas microbianas permite una mejor interpretación de los posibles procesos de eliminación de metales.
- ★ El Cr(III) es depositado sobre toda la superficie de la mata microbiana, principalmente en la forma de óxido/hidróxido de Cr.

- ★ La eficiencia de remoción de Cr(VI) no cambió ante diferentes salinidades pero fue mayor al mantener las soluciones a pH 2 y al inundar las matas microbianas permanentemente durante 17 días.
- ★ La eficiencia de remoción de Cr(VI) es similar usando matas microbianas vivas con ciclo de luz y oscuridad similar a los ambientales, que cuando son sometidas a oscuridad permanente o autoclavadas, sin embargo, las primeras lo remueven más rápido.
- ★ Tanto los componentes orgánicos (cianobacterias, diatomeas, EPS, detritos) como los inorgánicos (partículas finas de sedimento y óxidos de hierro) de las matas estuvieron involucrados en la adsorción de Cr.
- ★ Los microorganismos vivos de las matas microbianas están involucrados en el proceso de reducción de Cr(VI) a Cr(III), lo que permite su deposición en la superficie sólida como óxido/hidróxido de Cr.
- ★ Se encontró un efecto sinérgico en la remoción de Cr y Pb cuando ambos metales se encontraban en interacción en las soluciones.
- ★ La eficiencia de remoción del Zn fue mayor cuando se encontraba en interacción con Cr pero en ausencia de Pb.
- ★ Los procesos de remoción de Pb están principalmente asociados a la formación de complejos con la MO, con óxidos de hierro y con compuestos de azufre presentes en las matas microbianas.
- ★ Las matas microbianas remueven el Cr(III) y Pb eficientemente del agua de mar cuando se las inunda con efecto marea por aproximadamente 5 días.
- ★ Los procesos superficiales tuvieron un rol principal en la inmovilización de Cr(III), Cr(VI) y Pb en la mata microbiana.

- ★ Las matas microbianas poseen una gran diversidad de grupos funcionales (carboxilos, carbonilos, aminas, amidas, hidroxilos y sulfatos) donde la unión de los metales podría ocurrir.
- ★ No se observaron efectos tóxicos en la biomasa de la comunidad microfitobentónica luego de la exposición a Cr(III), Cr(VI), Pb(II) y Zn(II).
- ★ Se observó una tendencia a aumentar la concentración de clorofila *a* y una gran cantidad de cianobacterias y diatomeas en la superficie de las matas microbianas expuestas a Cr.
- ★ La comunidad de bacterias heterótrofas resultó alterada luego de la exposición a Cr(VI) y Pb, sin embargo, más investigación es necesaria.
- ★ Las matas microbianas podrían ser utilizadas como biotecnología de remediación para eliminar o disminuir las concentraciones de Cr(III), Cr(VI), Pb y Zn tanto de agua dulce como de agua de mar contaminada.
- ★ Los mecanismos de remoción extracelular predominaron sobre los intracelulares en las matas microbianas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbase, G., Ouddane, B., Fischer, J.C., 2003. Determination of Trace Metal Complexes by Natural Organic and Inorganic Ligands in Coastal Seawater. *Anal. Sci.* 19, 529–535. <https://doi.org/10.2116/analsci.19.529>
- Abdel-Rehim, A., 2006. Thermal and XRD analysis of Egyptian galena. *J. Therm. Anal. Calorim.* 86, 393–401. <https://doi.org/10.1007/s10973-005-6785-6>
- Abed, R.M., Kohls, K., De Beer, D., 2007. Effect of salinity changes on the bacterial diversity, photosynthesis and oxygen consumption of cyanobacterial mats from an intertidal flat of the Arabian Gulf. *Environ. Microbiol.* 9, 1384–1392. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01254.x>
- Abed, R.M., Shanti, M., Muthukrishnan, T., Al-Riyami, Z., Pracejus, B., Moraetis, D., 2020. The role of microbial mats in the removal of hexavalent chromium and associated shifts in their bacterial community composition. *Front. Microbiol.* 11, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00012>
- Adakole, J.A., Abolude, D.S., 2009. Studies on effluent characteristics of a metal finishing company, Zaria–Nigeria. *Res. J. Environ. Earth Sci.* 1, 54–57. ISSN: 2041-0492
- Aguilar-Barajas, E., Jerónimo-Rodríguez, P., Ramírez-Díaz, M.I., Rensing, C., Cervantes, C., 2012. The ChrA homologue from a sulfur-regulated gene cluster in cyanobacterial plasmid pANL confers chromate resistance. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 865–869. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0883-3>
- Ahmad, N., Mounsef, J.R., Abou Tayeh, J., Lteif, R., 2020. Bioremediation of Ni, Al and Pb by the living cells of a resistant strain of microalga. *Water Sci. Technol.* 82, 851–860. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.381>
- Akbarnezhad, M., Shamsaie Mehrgan, M., Kamali, A., Javaheri Baboli, M., 2020. Effects of microelements (Fe, Cu, Zn) on growth and pigment contents of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Iran. J. Fish. Sci.* 19, 653–668. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2019.120614>
- Aksu, Z., Balibek, E., 2007. Chromium (VI) biosorption by dried *Rhizopus arrhizus*: effect of salt (NaCl) concentration on equilibrium and kinetic parameters. *J. Hazard. Mater.* 145, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.11.011>
- Al-Hinai, A.T., Al-Hinai, M.H., Dutta, J., 2014. Application of Eh-pH diagram for room temperature precipitation of zinc stannate microcubes in an aqueous

media. Mater. Res. Bull. 49, 645–650.  
<https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.10.011>

Ali, H., Khan, E., 2018. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 25, 1353–1376.  
<https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398>

Alyazichi, Y.M., Jones, B.G., McLean, E., 2016. Lead isotope fingerprinting used as a tracer of lead pollution in marine sediments from Botany Bay and Port Hacking estuaries, southern Sydney, Australia. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 7, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.06.006>

Andersen, I.M., Williamson, T.J., González, M.J., Vanni, M.J., 2020. Nitrate, ammonium, and phosphorus drive seasonal nutrient limitation of chlorophytes, cyanobacteria, and diatoms in a hyper-eutrophic reservoir. *Limnol. Oceanogr.* 65, 962–978. <https://doi.org/10.1002/lno.11363>

Andina, M. 2018. Introducción a estadística con R.

<https://bookdown.org/matiasandina/R-intro/modelos-lineales.html>. Acceso 18 de enero, 2024.

Andrade, S. 2001. Metales pesados en el agua de la zona interna de Bahía Blanca, y su toxicidad sobre algunas especies fitoplanctónicas. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur, Argentina, 244 pp.

APHA-AWWA-WPCF, 1998. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. Am. Public Health Assoc. Washington, USA.

Arreguin-Rebolledo, U., Castelhana Gebara, R., Valencia-Castañeda, G., Rico-Martínez, R., Frías-Espericueta, M.G., Longo, E., Páez-Osuna, F., 2024. Toxicity of binary-metal mixtures (As, Cd, Cu, Fe, Hg, Pb and Zn) in the euryhaline rotifer *Proales similis*: Antagonistic and synergistic effects. *Mar. Pollut. Bull.* 198, 115819. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115819>

Arunakumara, K., Xuecheng, Z., Song, X., 2007. Estudio comparativo de la bioacumulación del plomo y cadmio en cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 bajo condiciones de laboratorio. *Cienc. Mar.* 33, 271–280. ISSN 0185-3880

Baker, I., 2018. Titanium. En: Baker, I., Fifty Materials That Make the World. Springer International Publishing, Cham, pp. 241–245.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-78766-4\\_45](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78766-4_45)



- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Finney, L.A., Outten, C.E., O'Halloran, T.V., 2002. A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA (46-118). *J. Mol. Biol.* 323, 883–897. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01007-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01007-0)
- Barrera, H., Ureña-Núñez, F., Bilyeu, B., Barrera-Díaz, C., 2006. Removal of chromium and toxic ions present in mine drainage by Ectodermis of *Opuntia*. *J. Hazard. Mater.* 136, 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.01.021>
- Bashir, A., Malik, L.A., Ahad, S., Manzoor, T., Bhat, M.A., Dar, G.N., Pandith, A.H., 2019. Removal of heavy metal ions from aqueous system by ion-exchange and biosorption methods. *Environ. Chem. Lett.* 17, 729–754. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00828-y>
- Baysal, A., 2023. Elemental, Oxidative and Functional Group Characteristics of Sediments in the Industrial Marine area in Tuzla Aydinli Bay, Istanbul, Turkey Between 2016 and 2020. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 110, 85. <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03722-8>
- Bender, J.A., Vatcharapijarn, Y., Russell, A., 1989. Fish feeds from grass clippings. *Aquac. Eng.* 8, 407–419. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(89\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0144-8609(89)90034-4)
- Bender, J., Gould, J.P., Vatcharapijarn, Y., Saha, G., 1991. Uptake, transformation and fixation of Se(VI) by a mixed selenium-tolerant ecosystem. *Water. Air. Soil Pollut.* 59, 359–367. <https://doi.org/10.1007/BF00211843>
- Bender, J., Gould, J.P., Vatcharapijarn, Y., Young, J.S., Phillips, P., 1994a. Removal of zinc and manganese from contaminated water with cyanobacteria mats. *Water Environ. Res.* 66, 679–683. <https://doi.org/10.2175/WER.66.5.3>
- Bender, J., Rodriguez-Eaton, S., Ekanemesang, U.M., Phillips, P., 1994b. Characterization of metal-binding biofloculants produced by the cyanobacterial component of mixed microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2311–2315. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2311-2315.1994>
- Bender, J., Lee, R.F., Phillips, P., 1995. Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their use in bioremediation. *J. Ind. Microbiol.* 14, 113–118. <https://doi.org/10.1007/BF01569892>

- Bender, J., Phillips, P., 2004. Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. *Bioresour. Technol.* 94, 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.016>
- Benramache, S., 2019. Fabrication and Characterisation of ZnO Thin Film by Sol–Gel Technique. *Ann. West Univ. Timisoara - Phys.* 61, 64–70. <https://doi.org/10.2478/awutp-2019-0006>
- Berasategui, A.A., Biancalana, F., Fricke, A., Fernandez –Severini, M.D., Uibrig, R., Dutto, M.S., Marcovecchio, J., Calliari, D., Hoffmeyer, M.S., 2018. The impact of sewage effluents on the fecundity and survival of *Eurytemora americana* in a eutrophic estuary of Argentina. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 211, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.034>
- Bere, T., Chia, M.A., Tundisi, J.G., 2012. Effects of Cr III and Pb on the bioaccumulation and toxicity of Cd in tropical periphyton communities: Implications of pulsed metal exposures. *Environ. Pollut.* 163, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.028>
- Berry, W.J., Boothman, W.S., Serbst, J.R., Edwards, P.A., 2004. Predicting the toxicity of chromium in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2981. <https://doi.org/10.1897/03-599.1>
- Bhat, M.A., Mishra, A.K., Jan, S., Shah, S.A., Asgher, M., Rahman, S., Jan, A.T., 2023. Chromium and plant health: A prospective study of toxicity to remediation and restoration of the environment. *South Afr. J. Bot.* 162, 505–518. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.09.043>
- Bhattacharya, T., Khan, A., Ghosh, T., Kim, J.T., Rhim, J.-W., 2024. Advances and prospects for biochar utilization in food processing and packaging applications. *Sustain. Mater. Technol.* 39, e00831. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2024.e00831>
- Bhunja, A., Lahiri, D., Nag, M., Upadhye, V., Pandit, S., 2022. Bacterial biofilm mediated bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 43, 102397. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102397>
- Biswal, B.K., Balasubramanian, R., 2023. Use of biochar as a low-cost adsorbent for removal of heavy metals from water and wastewater: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* 11, 110986. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110986>
- Blanco, Y., Rivas, L.A., González-Toril, E., Ruiz-Bermejo, M., Moreno-Paz, M., Parro, V., Palacín, A., Aguilera, Á., Puente-Sánchez, F., 2019. Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme

- environments. *Sci. Total Environ.* 650, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.440>
- Bonnand, P., James, R.H., Parkinson, I.J., Connelly, D.P., Fairchild, I.J., 2013. The chromium isotopic composition of seawater and marine carbonates. *Earth Planet. Sci. Lett.* 382, 10–20. <http://doi.org/10.1016/j.epsl.2013.09.001>
- Botté, S.E., Freije, R.H., Marcovecchio, J.E., 2010. Distribution of several heavy metals in tidal flats sediments within Bahía Blanca Estuary (Argentina). *Water. Air. Soil Pollut.* 210, 371–388. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0260-0>
- Botté, S.E., Freije, R.H., Marcovecchio, J.E., 2007. Dissolved Heavy Metal (Cd, Pb, Cr, Ni) Concentrations in Surface Water and Porewater from Bahía Blanca Estuary Tidal Flats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 415–421. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9231-6>
- Botté, S.E., Marcovecchio, J.E., Fernandez Severini, M.D., Negrin, V.L., Panebianco, M.V., Simonetti, P., Buzzi, N.S., Delucchi, F., 2013. Ciclo de metales pesados. En: Marcovecchio, J., Freije, H., Procesos químicos en estuarios. Universidad Tecnológica Nacional. 40 pp. ISBN 978-987-1896-16-5
- Bradl, H.B., 2005. Chapter 1 Sources and origins of heavy metals. En: Bradl, H.B., Interface Science and Technology, Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation. Elsevier, pp. 1–27. [https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(05\)80020-1](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(05)80020-1)
- Braissant, O., Decho, A.W., Przekop, K.M., Gallagher, K.L., Glunk, C., Dupraz, C., Visscher, P.T., 2009. Characteristics and turnover of exopolymeric substances in a hypersaline microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 293–307. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00614.x>
- Browning, C.L., Qin, Q., Kelly, D.F., Prakash, R., Vanoli, F., Jasin, M., Wise, J.P., 2016. Prolonged Particulate Hexavalent Chromium Exposure Suppresses Homologous Recombination Repair in Human Lung Cells. *Toxicol. Sci.* 153, 70–78. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw103>
- Bruggmann, S., Severmann, S., McManus, J., 2023. Geochemical conditions regulating chromium preservation in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 348, 239–257. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2023.03.003>
- Buchman, M.F., 2008. Screening Quick Reference Tables (SQuiRTs).

- Burakov, A.E., Galunin, E.V., Burakova, I.V., Kucherova, A.E., Agarwal, S., Tkachev, A.G., Gupta, V.K., 2018. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 702–712. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.034>
- Butu, A.W., 2013. Concentration of Metal Pollutants in River Kubanni, Zaria, Nigeria. *J. Nat. Sci. Res.* 3, 19. ISSN 2224-3186
- Calderón, C., Valdés, J., 2012. Contenido de metales en sedimentos y organismos bentónicos de la bahía San Jorge, Antofagasta, Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 47, 121–133. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000100011>
- Cameron, N.G., 2004. The use of diatom analysis in forensic geoscience, in: Pye, K., Croft, D.J. (Eds.), *Forensic Geoscience: Principles, Techniques and Applications*. Geological Society of London, 232, 277-280. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2004.232.01.25>
- Cañizares-Villanueva, R.O., 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42, 131–143.
- Cantonati, M., Angeli, N., Virtanen, L., Wojtal, A.Z., Gabrieli, J., Falasco, E., Lavoie, I., Morin, S., Marchetto, A., Fortin, C., Smirnova, S., 2014. *Achnantheidium minutissimum* (Bacillariophyta) valve deformities as indicators of metal enrichment in diverse widely-distributed freshwater habitats. *Sci. Total Environ.* 475, 201–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.018>
- Cao, Y., Dong, S., Dai, Z., Zhu, L., Xiao, T., Zhang, X., Yin, S., Soltanian, M.R., 2021. Adsorption model identification for chromium (VI) transport in unconsolidated sediments. *J. Hydrol.* 598, 126228. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2021.126228>
- Cartaxana, P., Cruz, S., Gameiro, C., Kühl, M., 2016. Regulation of Intertidal Microphytobenthos Photosynthesis Over a Diel Emersion Period Is Strongly Affected by Diatom Migration Patterns. *Front. Microbiol.* 7:872. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00872>
- Casco, M.E., Martínez-Escandell, M., Silvestre-Albero, J., Rodríguez-Reinoso, F., 2014. Effect of the porous structure in carbon materials for CO<sub>2</sub> capture at atmospheric and high-pressure. *Carbon* 67, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.09.086>

- Catallo, W.J., 1999. Hourly and daily variation of sediment redox potential in tidal wetland sediments. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division Biological Science Report. 10 pp.
- Cavaco, S.A., Fernandes, S., Quina, M.M., Ferreira, L.M., 2007. Removal of chromium from electroplating industry effluents by ion exchange resins. *J. Hazard. Mater.* 144, 634–638. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.087>
- Caycedo Lozano, L., Ramírez, L.C.C., Suárez, D.M.T., Caycedo Lozano, L., Ramírez, L.C.C., Suárez, D.M.T., 2021. Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova* 19, 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Ceballos, E., Margalef-Martí, R., Carrey, R., Frei, R., Otero, N., Soler, A., Ayora, C., 2020. Characterisation of the natural attenuation of chromium contamination in the presence of nitrate using isotopic methods. A case study from the Matanza-Riachuelo River basin, Argentina. *Sci. Total Environ.* 699, 134331. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134331>
- Çelekli, A., Gültekin, E., Bozkurt, H., 2016. Morphological and Biochemical Responses of *Spirogyra setiformis* Exposed to Cadmium. *CLEAN – Soil Air Water* 44, 256–262. <https://doi.org/10.1002/clen.201400434>
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x>
- Chakraborty, P., Sarkar, A., Vudamala, K., Naik, R., Nath, B.N., 2015. Organic matter — A key factor in controlling mercury distribution in estuarine sediment. *Mar. Chem.* 173, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2014.10.005>
- Chakraborty, A., Bhakat, K., Basak, N., Karmakar, M.M., Islam, E., 2016. Hexavalent chromium reduction potential of chromium resistant tannery effluent bacteria and their consortia. *EPH-Int. J. Appl. Sci.* 2(7), 01–16. ISSN 2208-2182
- Chakraborty, R., Renu, K., Eladl, M.A., El-Sherbiny, M., Elsherbini, D.M.A., Mirza, A.K., Vellingiri, B., Iyer, M., Dey, A., Gopalakrishnan, A.V., 2022. Mechanism of chromium-induced toxicity in lungs, liver, and kidney and their ameliorative agents. *Biomed. Pharmacother.* 151, 113119. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113119>

- Chen, Zhi, Pan, X., Chen, H., Guan, X., Lin, Z., 2016. Biomineralization of Pb(II) into Pb-hydroxyapatite induced by *Bacillus cereus* 12-2 isolated from Lead–Zinc mine tailings. *J. Hazard. Mater.* 301, 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.023>
- Chuang, D.S.-W., Liao, J.C., 2021. Role of cyanobacterial phosphoketolase in energy regulation and glucose secretion under dark anaerobic and osmotic stress conditions. *Metab. Eng.* 65, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.12.004>
- Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation, Plymouth, PRIMER-E, Plymouth Marine Laboratory. 262 pp.
- Coban, O., Williams, M., Bebout, B.M., 2018. Mechanisms of nitrogen attenuation from seawater by two microbial mats. *Water Res.* 147, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.09.044>
- Cole, S., Codling, I.D., Parr, W., Zabel, T., Nature, E., Heritage, S.N., 1999. Guidelines for managing water quality impacts within UK European Marine sites, Hailey, N. and Burn, A. ed. UK Marine SAC Project.
- Comber, S., Gardner, M., 2003. Chromium redox speciation in natural waters. *J. Environ. Monit.* 5, 410–413. <https://doi.org/10.1039/B302827E>
- Commendatore, M.G., Esteves, J.L., 2004. Natural and anthropogenic hydrocarbons in sediments from the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Mar. Pollut. Bull.* 48, 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.11.015>
- Connelly, D.P., Statham, P.J., Knap, A.H., 2006. Seasonal changes in speciation of dissolved chromium in the surface Sargasso Sea. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 53, 1975–1988. <https://doi.org/doi:10.1016/j.dsr.2006.09.005>
- Córdova Pantigoso, M.O., Medina Delgado, 2019. Biorremoción con semilla de papaya arequipeña (*Vasconcellea pubescens*) para cromo total en efluentes de curtiembres, Arequipa. Tesis, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú. 287 pp.
- Croce, M.E., Gauna, M.C., Fernández, C., Poza, A.M., Parodi, E.R., 2021. Biology and ecology of the benthic algae, 113–151. En: Fiori, S. M., Pratolongo, P.D. *The Bahía Blanca Estuary Ecology and Biodiversity*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-66486-2_6)

- Cuadrado, D.G., Pizani, N.V., 2007. Identification of microbially induced sedimentary structures over a tidal flat. *Lat. Am. J. Sedimentol. Basin Anal.* 14, 105–116. ISSN 1669 7316
- Cuadrado, D.G., Carmona, N.B., Bournod, C., 2011. Biostabilization of sediments by microbial mats in a temperate siliciclastic tidal flat, Bahía Blanca estuary (Argentina). *Sediment. Geol.* 237, 95–101. DOI: 10.1080/01490451.2012.757998
- Cuadrado, D.G., Carmona, N.B., Bournod, C.N., 2012. Mineral precipitation on modern siliciclastic tidal flats colonized by microbial mats. *Sediment. Geol.* 271–272, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2012.06.005>
- Cuadrado, D.G., Perillo, G.M., Vitale, A.J., 2014. Modern microbial mats in siliciclastic tidal flats: Evolution, structure and the role of hydrodynamics. *Mar. Geol.* 352, 367–380. <http://dx.doi.org/10.1016/j.margeo.2013.10.002>
- Cuadrado, D.G., 2017. Microbial mats: impact on geology 1-12. En: Reference Module in Life Sciences, Elsevier. ISBN: 978-0-12-809633-8. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13076-6>
- Cuadrado, D.G., 2020. Geobiological model of ripple genesis and preservation in a heterolithic sedimentary sequence for a supratidal area. *Sedimentology* 67, 2747–2763. <https://doi.org/10.1111/sed.12718>
- Cuadrado, D.G., Maisano, L., Quijada, I.E., 2021. Role of microbial mats and high sedimentation rates in the early burial and preservation of footprints in a siliciclastic tidal flat. *J. Sediment. Res.* 91, 479–494. <http://dx.doi.org/10.2110/JSR.2020.149>
- Cui, J., Wang, Yan, Ding, S., Chen, M., Li, D., Hao, X., Wang, Yun, 2024. High-resolution diurnal variation mechanism of oxygen and acid environments at the water–sediment interface during cyanobacterial decomposition. *J. Clean. Prod.* 435, 140605. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.140605>
- Cui, J., Xie, Y., Sun, T., Chen, L., Zhang, W., 2021. Deciphering and engineering photosynthetic cyanobacteria for heavy metal bioremediation. *Sci. Total Environ.* 761, 144111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144111>
- Dang, D.H., Layglon, N., Ferretto, N., Omanović, D., Mullot, J.-U., Lenoble, V., Mounier, S., Garnier, C., 2020. Kinetic processes of copper and lead remobilization during sediment resuspension of marine polluted sediments. *Sci. Total Environ.* 698, 134120. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134120>

- Dang, D.H., Lenoble, V., Durrieu, G., Omanović, D., Mullot, J.-U., Mounier, S., Garnier, C., 2015. Seasonal variations of coastal sedimentary trace metals cycling: Insight on the effect of manganese and iron (oxy)hydroxides, sulphide and organic matter. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.12.048>
- Dean, W.E., 1974. Determination of carbonate and organic matter in calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition; comparison with other methods. *J. Sediment. Res.* 44, 242–248. <https://doi.org/10.1306/74D729D2-2B21-11D7-8648000102C1865D>
- Del Buey, P., Sanz-Montero, M.E., Braissant, O., Cabestrero, Ó., Visscher, P.T., 2021. The role of microbial extracellular polymeric substances on formation of sulfate minerals and fibrous Mg-clays. *Chem. Geol.* 581, 120403. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2021.120403>
- Di Martino, C., Albouy, R., Aliotta, S., 2022. Evaluación geotécnica preliminar de las unidades geológicas del frente costero portuario de Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. *Rev. Geol. Apl. Ing. Al Ambiente* 15–21. ISSN 2422-5703
- Donald, D.B., Bogard, M.J., Finlay, K., Leavitt, P.R., 2011. Comparative effects of urea, ammonium, and nitrate on phytoplankton abundance, community composition, and toxicity in hypereutrophic freshwaters. *Limnol. Oceanogr.* 56, 2161–2175. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2161>
- Dong, F.-X., Yan, L., Zhou, X.-H., Huang, S.-T., Liang, J.-Y., Zhang, W.-X., Guo, Z.-W., Guo, P.-R., Qian, W., Kong, L.-J., Chu, W., Diao, Z.-H., 2021. Simultaneous adsorption of Cr(VI) and phenol by biochar-based iron oxide composites in water: Performance, kinetics and mechanism. *J. Hazard. Mater.* 416, 125930. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125930>
- D'ors, A., Pereira, M., Bartolomé, M.C., López-Rodas, V., Costas, E., Sánchez-Fortún, S., 2010. Toxic effects and specific chromium acquired resistance in selected strains of *Dyctiosphaerium chlorelloides*. *Chemosphere* 81, 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.051>
- Drahota, P., Chatziantoniou, A., Mihaljevič, M., Culka, A., Melfou, M., Melfos, V., Voudouris, P., 2024. A mineralogical and geochemical assessment of the As-, Cu-, In-, Pb-, Sb-, and Zn-rich mine wastes at the Pefka epithermal deposit, Greece. *J. Geochem. Explor.* 256, 107336. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2023.107336>
- Duan, P., Li, M., Xu, X., Yue, Q., Gao, Y., Gao, B., 2024. Understanding of interfacial molecular interactions and inner-sphere reaction mechanism in



- heterogeneous Fenton-like catalysis on Mn-N4 site. *Appl. Catal. B Environ.* 344, 123619. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2023.123619>
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. t, Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dunn, P.K., Dunn, M.P.K., 2017. Package 'tweedie.' R Packag Version Doi 10.
- Eichner, M., Rost, B., Kranz, S.A., 2014. Diversity of ocean acidification effects on marine N<sub>2</sub> fixers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 457, 199–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2014.04.015>
- El Nemr, A., El-Sikaily, A., Khaled, A., Abdelwahab, O., 2015. Removal of toxic chromium from aqueous solution, wastewater and saline water by marine red alga *Pterocladia capillacea* and its activated carbon. *Arab. J. Chem.* 8, 105–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.016>
- Ennaceri, H., Ishika, T., Mkpuma, V.O., Moheimani, N.R., 2023. Microalgal biofilms: Towards a sustainable biomass production. *Algal Res.* 72, 103124. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103124>
- Falasco, E., Bona, F., Ginepro, M., Hlúbiková, D., Hoffmann, L., Ector, L., 2009. Morphological abnormalities of diatom silica walls in relation to heavy metal contamination and artificial growth conditions. *Water SA* 35, 595–606. ISSN 1816-7950
- Fenchel, T., 1998a. Formation of laminated cyanobacterial mats in the absence of benthic fauna. *Aquat. Microb. Ecol.* 14, 235–240.
- Fenchel, T., 1998b. Artificial cyanobacterial mats: structure and composition of the biota. *Aquat. Microb. Ecol.* 14, 241–251.
- Fenchel, T., Kühl, M., 2000. Artificial Cyanobacterial Mats: Growth, Structure, and Vertical Zonation Patterns. *Microb. Ecol.* 40, 85–93. <https://doi.org/10.1007/s002480000062>
- Fernandes, M.M., Baeyens, B., 2019. Cation exchange and surface complexation of lead on montmorillonite and illite including competitive adsorption effects. *Appl. Geochem.* 100, 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.11.005>
- Fernández, C., Lara, R.J., Parodi, E.R., 2021. Influence of microphytobenthos on the sedimentary organic matter composition in two contrasting estuarine microhabitats. *Environ. Monit. Assess.* 193, 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08888-4>

- Fernández, E.M., 2017. Dinámica de Nutrientes, Materia Orgánica y Clorofila *a* en planicies de marea cubiertas por matas microbianas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. 167 pp.
- Ferreiroa, G.V., 2015. Retención, biodisponibilidad y remediación de Pb en suelos: efectos de la interacción suelo-planta (*Brassica napus*) y bioacumulación. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 161 pp.
- Figueirôa, J.A., Novaes, G.U.M., de Souza Gomes, H., de Moraes Silva, V.L.M., de Moraes Lucena, D., Lima, L.M.R., de Souza, S.A., Viana, L.G.F.C., Rolim, L.A., da Silva Almeida, J.R.G., 2021. *Opuntia ficus-indica* is an excellent eco-friendly biosorbent for the removal of chromium in leather industry effluents. *Heliyon* 7, e07292. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07292>
- Fomina, M., Gadd, G.M., 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour. Technol.*, Special Issue on Biosorption 160, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102>
- Forero-Lopez, A.D., 2019. Síntesis y caracterización de recubrimientos anticorrosivos sobre materiales biomédicos. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. 196 pp.
- Forero-López, A., Villagran, D.M., Fernandez, E.M., Spetter, C.V., Buzzi, N.S., Severini, M.F., 2021. Chromium behavior in a highly urbanized coastal area (Bahía Blanca Estuary, Argentina). *Mar. Pollut. Bull.* 165, 112093. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112093>
- Forero-López, A., Truchet, D.M., Rimondino, G.N., Maisano, L., Spetter, C.V., Buzzi, N.S., Nazzarro, M.S., Malanca, F.E., Furlong, O., Severini, M.F., 2021. Microplastics and suspended particles in a strongly impacted coastal environment: composition, abundance, surface texture, and interaction with metal ions. *Sci. Total Environ.* 754, 142413. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142413>
- Forero-López, A.D., Brugnoli, L.I., Abasto, B., Rimondino, G.N., Lassalle, V.L., Arduoso, M.G., Nazzarro, M.S., Martinez, A.M., Spetter, C.V., Biancalana, F., 2022. Plasticsphere on microplastics: In situ assays in an estuarine environment. *J. Hazard. Mater.* 440, 129737. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112093>
- Forero-López, A.D., Toniolo, M.A., Colombo, C.V., Rimondino, G.N., Cuadrado, D., Perillo, G.M.E., Malanca, F.E., 2024. Marine microdebris pollution in sediments from three environmental coastal areas in the southwestern

- Argentine Atlantic. Sci. Total Environ. 913, 169677.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169677>
- Franke, C., Pennock, G.M., Drury, M.R., Engelmann, R., Lattard, D., Garming, J.F.L., von Dobeneck, T., Dekkers, M.J., 2007. Identification of magnetic Fe-Ti oxides in marine sediments by electron backscatter diffraction in scanning electron microscopy. *Geophys. J. Int.* 170, 545–555.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-246X.2007.03410.x>
- Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407–418.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Fu, L., Li, J., Wang, G., Luan, Y., Dai, W., 2021. Adsorption behavior of organic pollutants on microplastics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 217, 112207.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112207>
- Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- García-Mancha Delgado-Ureña, N., 2016. Tratamiento biológico de aguas residuales industriales mediante reactores anaerobios de alta eficacia. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, España. 322 pp.
- García-Sánchez, F.M.G., 2021. Diseño de un sistema de adsorción a base de arcilla para la remoción de plomo. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.
- Gauzellino, P., Zyserman, F., Späth, F., 2010. Respuesta de geófonos a campos electromagnéticos. *Geoacta* 35, 54–66. ISSN 1852-7744
- Gerdes, G., Klenke, T., Noffke, N., 2000. Microbial signatures in peritidal siliciclastic sediments: a catalogue. *Sedimentology* 47, 279–308.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3091.2000.00284.x>
- Ghosh, S., Bhattacharya, J., Nitnavare, R., Webster, T.J., 2022. Microbial remediation of metals by marine bacteria, en: Rodríguez-Couto, S., Shah, M.P., *Development in Wastewater Treatment Research and Processes*. Elsevier, 131–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85839-7.00011-6>
- Gode, F., Pehlivan, E., 2005. Removal of Cr(VI) from aqueous solution by two Lewatit-anion exchange resins. *J. Hazard. Mater.* 119, 175–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.12.004>

- Goericke, R., 2002. Bacteriochlorophyll a in the ocean: Is anoxygenic bacterial photosynthesis important? *Limnol. Oceanogr.* 47, 290–295. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.1.0290>
- Gomes, M.A. da C., Hauser-Davis, R.A., Suzuki, M.S., Vitória, A.P., 2017. Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 140, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.042>
- Gómez-García, M.T., Tovar-Gómez, R., Hernández-Eudave, M.T., Macías-Rodríguez, M.P., Gutiérrez-Rodríguez, E.A., Moreno-Virgen, M.R., 2016. Adsorción en Continuo del Colorante AB25 y el Metal Cadmio en Soluciones Binarias sobre Carbón Modificado. *Concienc. Tecnológica* 35–41.
- Gorny, J., Billon, G., Noiriél, C., Dumoulin, D., Lesven, L., Madé, B., 2016. Chromium behavior in aquatic environments: a review. *Environ. Rev.* 24, 503–516. <https://doi.org/10.1139/er-2016-0012>
- Graham, A.M., Bower, E.J., 2010. Rates of hexavalent chromium reduction in anoxic estuarine sediments: pH effects and the role of acid volatile sulfides. *Environ. Sci. Technol.* 44, 136–142. <https://doi.org/10.1021/es9013882>
- Grecco, L.E., Gómez, E.A., Botté, S.E., Marcos, Á.O., Marcovecchio, J.E., Cuadrado, D.G., 2011. Natural and anthropogenic heavy metals in estuarine cohesive sediments: geochemistry and bioavailability. *Ocean Dyn.* 61, 285–293. <https://doi.org/10.1007/s10236-010-0354-7>
- Greenway, J.A., Gerstenberger, S., 2010. An Evaluation of Lead Contamination in Plastic Toys Collected from Day Care Centers in the Las Vegas Valley, Nevada, USA. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 363–366. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0100-3>
- Guerra, F.D., Attia, M.F., Whitehead, D.C., Alexis, F., 2018. Nanotechnology for Environmental Remediation: Materials and Applications. *Molecules* 23, 1760. <https://doi.org/10.3390/molecules23071760> Acceso 15 de enero, 2024.
- Gupta, M., Kumari, A., Gauri, S., 2014. Bioremediation of heavy metals polluted environment by using resistance bacteria. *Int. J. Environ. Res. Dev.* 8, 883–889.
- Guiry, MD, 2023. AlgaeBase: una base de datos global para algas. *Ciencia actual* <https://www.algaebase.org/about/>

- Habtemariam, A.B., Kereta, A.K., 2020. Chromium (III) oxide nanostructures synthesized from *Vernonia amygdalina* leaves extract. *Lett. Appl. NanoBioScience* 10, 1856–1861. <https://doi.org/10.33263/LIANBS101.18561861>
- Hagadorn, J.W., Mcdowell, C., 2011. Microbial influence on erosion, grain transport and bedform genesis in sandy substrates under unidirectional flow. *Sedimentology* 59, 795–808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.2011.01278.x>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Heredia Chaz, E., 2014. La máquina de expresión del Polo Petroquímico de Bahía Blanca. *Cuadernos del Sur - Historia.* 43-44, 119-155. ISSN: 1668-7604
- Hinners, J., Hofmeister, R., Hense, I., 2015. Modeling the role of pH on Baltic Sea cyanobacteria. *Life* 5, 1204–1217. <https://doi.org/10.3390/life5021204>
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R.M., Schuetzenmeister, A., Scheibe, S., Hothorn, M.T., 2016. Package ‘multcomp.’ Simultaneous Inference Gen. Parametr. Models Proj. Stat. Comput. Vienna Austria.
- Huang, J., Jiang, Y., Reddy Marthala, V.R., Ooi, Y.S., Weitkamp, J., Hunger, M., 2007. Concentration and acid strength of hydroxyl groups in zeolites La,Na-X and La,Na-Y with different lanthanum exchange degrees studied by solid-state NMR spectroscopy. *Microporous Mesoporous Mater., Special Issue: Dedicated to the Late Lovat Rees in Appreciation of His Outstanding Contribution to Zeolite Science* 104, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.01.016>
- Huang, Z., Lu, L., Cai, Z., Ren, Z.J., 2016. Individual and competitive removal of heavy metals using capacitive deionization. *J. Hazard. Mater.* 302, 323–331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.064>
- Hughes, J.B., Duston, K.L., Ward, C.H., 2002. Engineered bioremediation. *Technology Evaluation Report.* 103 pp.
- Imbellone, P.A., Aguilera, E.Y., Beilinson, E., 2017. Mineralogía de suelos. 84-100. En: Pereyra, F.X., Torres Duggan, M. *Suelos y Geología Argentina: Una visión integradora desde diferentes campos disciplinarios.* Universidad Nacional de Avellaneda Ediciones. ISBN 978-987-3896-10-1.

- International Agency for Research on Cancer, 1990. Chromium, nickel and welding. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 49, 687. ISSN 0250-9555
- Jagiello, M., Minta, E., Chojnacka, K., Kafarski, P., 2006. Mode of biosorption of chromium (III) by *Spirulina* species cells from aqueous solutions. Water Environ. Res. 78, 740–743. <https://doi.org/10.2175/106143005x72885>
- Jang, Y.C., Somanna, Y., Kim, H., 2016. Source, distribution, toxicity and remediation of arsenic in the environment—a review. Int J Appl Env. Sci 11, 559–581. ISSN 0973-6077
- Jiang, M., Jin, X., Lu, X.-Q., Chen, Z., 2010. Adsorption of Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Cu(II) onto natural kaolinite clay. Desalination 252, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.11.005>
- Jiménez-Morillo, N.T., Moreno, J., Moreno, F., Fatela, F., Leorri, E., De la Rosa, J.M., 2024. Composition and sources of sediment organic matter in a western Iberian salt marsh: Developing a novel prediction model of the bromine sedimentary pool. Sci. Total Environ. 907, 167931. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167931>
- Jin, Q., Kirk, M.F., 2018. pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. Front. Environ. Sci. 6, 21. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00101>
- Jobby, R., Jha, P., Yadav, A.K., Desai, N., 2018. Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: a comprehensive review. Chemosphere 207, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.050>
- Joutey, N.T., Sayel, H., Bahafid, W., Ghachtouli, N.E., 2015. Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 233 45–69. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9_2)
- Juneau, P., Barnett, A., Méléder, V., Dupuy, C., Lavaud, J., 2015. Combined effect of high light and high salinity on the regulation of photosynthesis in three diatom species belonging to the main growth forms of intertidal flat inhabiting microphytobenthos. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 463, 95–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2014.11.003>
- Kalita, N., Baruah, P.P., 2023. Cyanobacteria as a potent platform for heavy metals biosorption: Uptake, responses and removal mechanisms. J. Hazard. Mater. Adv. 11, 100349. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100349>

- Kamal, A., Ahmad, I.Z., 2014. Cyanobacteria “the blue green algae” and its novel applications: A brief review. *Blue Green Algae* 7, 251-261. ISSN 2028-9324
- Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., Itsumura, N., 2015. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol. Rev.* 95, 749–784. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2014>
- Kelly, M.G., Free, G., Kolada, A., Phillips, G., Warner, S., Wolfram, G., Poikane, S., 2024. Warding off freshwater salinization: Do current criteria measure up? *WIREs Water* 11, e1694. <https://doi.org/10.1002/wat2.1694>
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N.K., Murtaza, B., Bibi, I., Dumat, C., 2017. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *J. Geochem. Explor.* 182, 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>
- Khan, A., Michelsen, N., Marandi, A., Hossain, R., Hossain, M.A., Roehl, K.E., Zahid, A., Hassan, M.Q., Schüth, C., 2020. Processes controlling the extent of groundwater pollution with chromium from tanneries in the Hazaribagh area, Dhaka, Bangladesh. *Sci. Total Environ.* 710, 136213. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136213>
- Komárek, J., Anagnostidis, K., 2005. Bd. 19/2: Cyanoprokaryota: teil 2: Oscillatoriales. Elsevier, München.
- Komárek, J., Anagnostidis, K., 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. *Arch. Für Hydrobiol. Suppl. Monogr. Beitr.* 82, 247–345.
- Kong, L., 2022. Copper Requirement and Acquisition by Marine Microalgae. *Microorganisms* 10, 1853. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091853>
- Krammer, K., 1986. Bacillariophyceae. I. Teil. Naviculaceae. In *Susswasserflora von Mitteleuropa*. Band 2, 876 pp.
- Krammer, K., 1988. Bacillariophyceae. Teil 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. *Susswasserflora Von Mitteleur.* 2, 437.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H., 1991a. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D. (eds) *Süsswasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fisher Verlag.
- Krammer, K., Lange-Bertalot, H., 1991b. Bacillariophyceae 4. Teil: Achnanthaceae. *Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und*

- Gomphonema In H. Ettl, G. Gärtner, J. Gerloff, H. Heynig, D. Mollenhauer, (Eds.) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fisher Verlag.
- Krüger, O., Fiedler, F., Adam, C., Vogel, C., Senz, R., 2017. Determination of chromium (VI) in primary and secondary fertilizer and their respective precursors. *Chemosphere* 182, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.011>
- Kühl, M., Fenchel, T., Kazmierczak, J., 2003. Growth, structure and calcification potential of an artificial cyanobacterial mat. 77–102. En: Krumbein, W.E., Paterson, D.M., Zavarzin, G.A. Fossil and Recent Biofilms. Springer, [https://doi.org/10.1007/978-94-017-0193-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0193-8_5)
- Kumar, K.S., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., Shin, K.-H., 2015. Microalgae—a promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 329–352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Kumar, S.B., Padhi, R.K., Mohanty, A.K., Satpathy, K.K., 2020. Distribution and ecological- and health-risk assessment of heavy metals in the seawater of the southeast coast of India. *Mar. Pollut. Bull.* 161, 111712. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111712>
- Kwak, Y.H., Lee, D.S., Kim, H.B., 2003. *Vibrio harveyi* Nitroreductase Is Also a Chromate Reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4390–4395. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4390-4395.2003>
- La Colla, N.S., Botté, S.E., Negrin, V.L., Serra, A.V., Marcovecchio, J.E., 2018. Influence of human-induced pressures on dissolved and particulate metal concentrations in a South American estuary. *Environ. Monit. Assess.* 190, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6930-x>
- La Colla, N.S., Botté, S.E., Simonetti, P., Negrin, V.L., Serra, A.V., Marcovecchio, J.E., 2021. Water, sediments and fishes: first multi compartment assessment of metal pollution in a coastal environment from the SW Atlantic. *Chemosphere* 131131. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131131>
- Larkin, P.J., 2018. Environmental Dependence of Vibrational Spectra. 63–73. En: Larkin, P.J., Infrared and Raman Spectroscopy. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804162-8.00004-5>
- Lee, L.H., Garrett, R., Ślusarczyk, A., Pérez, J., Chu, T., 2013. Bioinformatics Analyses of Chromium Tolerant Genes in Cyanobacteria and Identification of Chromium Tolerant Operon in *Synechococcus* sp. IU 625. Bioinformatics.



- Lenth, R., Lenth, M.R., 2018. Package 'lsmeans.' Am. Stat. 34, 216–221.
- Lenton, T.M., Daines, S.J., 2017. Biogeochemical Transformations in the History of the Ocean. Annu. Rev. Mar. Sci. 9, 31–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060521>
- Levin, E.A., Morgan, R.M., Scott, K.R., Jones, V.J., 2017. The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: An experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. Sci. Justice 57, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2017.05.005>
- Levina, A., Lay, P.A., 2008. Chemical properties and toxicity of chromium (III) nutritional supplements. Chem. Res. Toxicol. 21, 563–571. <https://doi.org/10.1021/tx700385t>
- Li, H., Wang, J., Zhao, B., Gao, M., Shi, W., Zhou, H., Xie, Z., Zhou, B., Lü, C., He, J., 2018. The role of major functional groups: Multi-evidence from the binding experiments of heavy metals on natural fulvic acids extracted from lake sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf. 162, 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.038>
- Li, M., He, Z., Hu, Y., Hu, L., Zhong, H., 2019. Both cell envelope and cytoplasm were the locations for chromium (VI) reduction by *Bacillus* sp. M6. Bioresour. Technol. 273, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.006>
- Li, N., Qin, L., Jin, M., Zhang, L., Geng, W., Xiao, X., 2021. Extracellular adsorption, intracellular accumulation and tolerance mechanisms of *Cyclotella* sp. to Cr(VI) stress. Chemosphere 270, 128662. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128662>
- Li, S.-X., Zheng, F.-Y., Hong, H.-S., Deng, N., Lin, L.-X., 2009. Influence of marine phytoplankton, transition metals and sunlight on the species distribution of chromium in surface seawater. Mar. Environ. Res. 67, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.02.001>
- Li, X., Yang, C., Zeng, G., Wu, S., Lin, Y., Zhou, Q., Lou, W., Du, C., Nie, L., Zhong, Y., 2020. Nutrient removal from swine wastewater with growing microalgae at various zinc concentrations. Algal Res. 46, 101804. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101804>
- Licursi, M., Gómez, N., 2013. Short-term toxicity of hexavalent-chromium to epipsammic diatoms of a microtidal estuary (Río de la Plata): Responses from the individual cell to the community structure. Aquat. Toxicol. 134, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.007>

- Lima, A.T., Mitchell, K., O'Connell, D.W., Verhoeven, J., Van Cappellen, P., 2016. The legacy of surface mining: Remediation, restoration, reclamation and rehabilitation. *Environ. Sci. Policy* 66, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2016.07.011>
- Litter, M.I., Morgada, M.E., Bundschuh, J., 2010. Possible treatments for arsenic removal in Latin American waters for human consumption. *Environ. Pollut.* 158, 1105–1118. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.01.028>
- Liu, C.-W., Lai, C.-C., Chen, Y.-Y., Lu, K.-L., 2013. Hydrogeochemical and mineralogical investigations of arsenic- and humic substance-enriched aquifers. *J. Hydrol.* 498, 59–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.06.017>
- Liu, M., Wang, C., Bai, Y., Xu, G., 2018. Effects of sintering temperature on the characteristics of lightweight aggregate made from sewage sludge and river sediment. *J. Alloys Compd.* 748, 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.03.216>
- Liu, X., Liu, Q., Sheng, Y., 2023. Nutrients in overlying water affect the environmental behavior of heavy metals in coastal sediments. *Environ. Res.* 238, 117135. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117135>
- Llirós, M., Gaju, N., de Oteyza, T.G., Grimalt, J.O., Esteve, I., Martínez-Alonso, M., 2008. Microcosm experiments of oil degradation by microbial mats. II. The changes in microbial species. *Sci. Total Environ.* 393, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.11.034>
- Lopez, P.J., Desclés, J., Allen, A.E., Bowler, C., 2005. Prospects in diatom research. *Curr. Opin. Biotechnol., Plant biotechnology/Food biotechnology* 16, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.002>
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations<sup>1</sup>. *Limnol. Oceanogr.* 12, 343–346. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>
- Loukidou, M.X., Matis, K.A., Zouboulis, A.I., Liakopoulou-Kyriakidou, M., 2003. Removal of As (V) from wastewaters by chemically modified fungal biomass. *Water Res.* 37, 4544–4552. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00415-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00415-9)
- Lowe, R.L., 2011. The Importance of Scale in Understanding the Natural History of Diatom Communities, 293–311. En: Seckbach, J., Kociolek, P., *The Diatom World, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer Netherlands, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1327-7_13)

- Lundqvist, A., 2016. Evaluating zinc content in aquatic ecosystem by estimating the responses of diatom biofilm to environmental and biological variables. <https://stud.epsilon.slu.se/9222/> Acceso 20 de febrero, 2024.
- Ma, J., Zhou, B., Duan, D., Wei, Y., Pan, K., 2018. Silicon limitation reduced the adsorption of cadmium in marine diatoms. *Aquat. Toxicol.* 202, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.011>
- Ma, L., Xu, J., Chen, N., Li, M., Feng, C., 2019. Microbial reduction fate of chromium (Cr) in aqueous solution by mixed bacterial consortium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.041>
- Maccotta, A., Cosentino, C., Coccioni, R., Frontalini, F., Scopelliti, G., Caruso, A., 2016. Distribution of Cr and Pb in artificial sea water and their sorption in marine sediments: an example from experimental mesocosms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 24068–24080. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7630-0>
- MacLean, L.C.W., Beauchemin, S., Rasmussen, P.E., 2011. Lead Speciation in House Dust from Canadian Urban Homes Using EXAFS, Micro-XRF, and Micro-XRD. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5491–5497. <https://doi.org/10.1021/es2001503>
- Madhavi, V., Reddy, A.V.B., Reddy, K.G., Madhavi, G., Prasad, T., 2013. An overview on research trends in remediation of chromium. *Res. J. Recent Sci.* 2, 71–83. ISSN 2277-2502
- Magnusson, A., Skaug, H., Nielsen, A., Berg, C., Kristensen, K., Maechler, M., van Benthem, K., Bolker, B., Brooks, M., Brooks, M.M., 2017. Package 'glmmTMB.' R Package Version 02.0.
- Magro, C.D., Deon, M.C., Rossi, A.D., Reinehr, C.O., Hemkemeier, M., Colla, L.M., 2012. Chromium (VI) biosorption and removal of chemical oxygen demand by *Spirulina platensis* from wastewater-supplemented culture medium. *J. Environ. Sci. Health Part A* 47, 1818–1824. <http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2012.689539>
- Maher, K., Bargar, J.R., Brown, G.E.Jr., 2013. Environmental Speciation of Actinides. *Inorg. Chem.* 52, 3510–3532. <https://doi.org/10.1021/ic301686d>
- Maisano, L., 2019. Estructuras sedimentarias generadas por presencia de matas microbianas en un ambiente evaporítico costero: Procesos de formación y preservación. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. 135 pp.

- Maldonado, J., Solé, A., Puyen, Z.M., Esteve, I., 2011. Selection of bioindicators to detect lead pollution in Ebro delta microbial mats, using high-resolution microscopic techniques. *Aquat. Toxicol.* 104, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.009>
- Manimaran, K., Karthikeyan, P., Ashokkumar, S., Ashok Prabu, V., Sampathkumar, P., 2012. Effect of Copper on Growth and Enzyme Activities of Marine Diatom, *Odontella mobiliensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 30–37. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0427-4>
- Marcovecchio, J., Ferrer, L., 2005. Distribution and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *J. Coast. Res.* 21, 826–834. <https://doi.org/10.2112/014-NIS.1>
- Marcovecchio, J.E., Botté, S.E., Fernandez Severini, M.D., Delucchi, F., 2010. Geochemical control of heavy metal concentrations and distribution within Bahía Blanca Estuary (Argentina). 16, 251–266 <https://doi.org/10.1007/s10498-009-9076-1>
- Marcovecchio, J., Freije, R., 2013. *Procesos químicos en Estuarios*. Univ. Tecnológica Nac. 40 pp. ISBN 978-987-1896-16-5
- Marcovecchio, J.E., Botté, S.E., Fernández Severini, M.D., 2016. Distribution and behavior of zinc in estuarine environments: an overview on Bahía Blanca estuary (Argentina). *Environ. Earth Sci.* 75, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12665-016-5942-5>
- Marimuthu, V., Dulac, I., Kannoorpatti, K., 2016. Significance of Pourbaix Diagrams to Study the Corrosion Behaviour of Hardfacing Alloys Based on Chromium Carbides at 298 K (25 °C). *J. Bio- Tribo-Corros.* 2, 17. <https://doi.org/10.1007/s40735-016-0047-y>
- Martínez, M.L., Intralawan, A., Vázquez, G., Pérez-Maqueo, O., Sutton, P., Landgrave, R., 2007. The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecol. Econ., Ecological Economics of Coastal Disasters* 63, 254–272. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2006.10.022>
- Mason, R.P., 2012. The methylation of metals and metalloids in aquatic systems. <http://dx.doi.org/10.5772/51774>
- McCafferty, E., Bennett, M.K., Murday, J.S., 1988. An XPS study of passive film formation on iron in chromate solutions. *Corros. Sci.* 28, 559–576. [https://doi.org/10.1016/0010-938X\(88\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0010-938X(88)90024-8)

- Mena Bolaños, D.V., 2019. Evaluación de la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia de metal cromo (VI) en aguas sintéticas. Tesis, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Mendoza-Castillo, D.I., Bonilla-Petriciolet, A., Jauregui-Rincon, J., 2016. Análisis estadístico y modelación de la sorción multicomponente de metales pesados en agua empleando carbonizado de hueso. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 15, 525–542. ISSN: 1665-2738
- Meyer, B., Ziemer, B., Scholz, F., 1995. In situ X-ray diffraction study of the electrochemical reduction of tetragonal lead oxide and orthorhombic Pb(OH)Cl mechanically immobilized on a graphite electrode. *J. Electroanal. Chem.* 392, 79–83. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(95\)04028-M](https://doi.org/10.1016/0022-0728(95)04028-M)
- Miranda, L.S., Wijesiri, B., Ayoko, G.A., Egodawatta, P., Goonetilleke, A., 2021. Water-sediment interactions and mobility of heavy metals in aquatic environments. *Water Res.* 202, 117386. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117386>
- Mitra, S., Sarkar, A., Sen, S., 2017. Removal of chromium from industrial effluents using nanotechnology: a review. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s41204-017-0022-y>
- Mohapatra, R.K., Pandey, S., Thatoi, H., Panda, C.R., 2017. Reduction of chromium (VI) by marine bacterium *Brevibacillus laterosporus* under varying saline and pH conditions. *Environ. Eng. Sci.* 34, 617–626. <https://doi.org/10.1089/ees.2016.0627>
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Xavier Malcata, F., 2011. Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environ. Chem. Lett.* 9, 169–176. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0258-2>
- Montesor, M., Di Prisco, C., Sarno, D., Margiotta, F., Zingone, A., 2013. Diversity and germination patterns of diatom resting stages at a coastal Mediterranean site. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 484, 79–95. <https://doi.org/10.3354/meps10236>
- Morales Pontet, N.G., Fernández, C., Botté, S.E., 2024. Novel method of removing metals from estuarine water using whole microbial mats. *BioMetals* 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00578-7>
- Morales Pontet, N.G., Fernández, C., Perillo, V.L., La Colla, N.S., Serra, A.V., Botté, S.E., 2023. Preliminary assessment of microbial mats in seawater metal remediation. *Environ. Monit. Assess.* 195, 516. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11134-8>

- Morales Posada, N.B., Acosta Niño, G., 2010. Sistema de electrocoagulación como tratamiento de aguas residuales galvánicas. *Cienc. E Ing. Neogranadina* 20, 33–44. ISSN: 0124-8170
- Moreno, J.R., Medina, C.D., Albarracín, V.H., 2012. Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas. *Reduca Biol.* 5, 110-125. ISSN: 1989-3620
- Moreno, J., Fatela, F., Leorri, E., Moreno, F., Freitas, M.C., Valente, T., Araújo, M.F., Gómez-Navarro, J.J., Guise, L., Blake, W.H., 2017. Bromine soil/sediment enrichment in tidal salt marshes as a potential indicator of climate changes driven by solar activity: New insights from W coast Portuguese estuaries. *Sci. Total Environ.* 580, 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.130>
- Moulder, J.F., 1992. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of XPS Data. Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corporation. 261 pp.
- Musso, T.B., Parolo, M.E., Pettinari, G., Francisca, F.M., 2014. Cu(II) and Zn(II) adsorption capacity of three different clay liner materials. *J. Environ. Manage.* 146, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.026>
- Naik, M.M., Pandey, A., Dubey, S.K., 2011. Bioremediation of Metals Mediated by Marine Bacteria. En: Satyanarayana, T., Johri, B.N., *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 665–682. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3\\_29](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3_29)
- Navarathna, C.M., Pennisson, J.E., Dewage, N.B., Reid, C., Dotse, C., Jazi, M.E., Rodrigo, P.M., Zhang, X., Farmer, E., Watson, C., Craig, D.O., Ramirez, A., Walker, M., Madduri, S., Mohan, D., Misna, T.E., 2023. Adsorption of Phosphates onto Mg/Al-Oxide/Hydroxide/Sulfate-Impregnated Douglas Fir Biochar. *Processes* 11, 111. <https://doi.org/10.3390/pr11010111>
- Negi, S., Han, T., Park, J., Bergey, E.A., Sangeeta, Chaubey, J., Kumar, A., Gupta, D., Gupta, M., Singh, S., Pandey, L.K., 2023. Qualitative and quantitative assessment of diatom deformities and protoplasmic condition under metal and metalloid stress. *Protoplasma* 260, 1501–1513. <https://doi.org/10.1007/s00709-023-01864-4>

- Negrin, V.L., 2011. El rol de las marismas del estuario de Bahía Blanca en el ciclo bio-geoquímico de nutrientes inorgánicos y de materia orgánica. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. 166 pp.
- Negrin, V.L., Idaszkin, Y.L., Domini, C., Simonetti, P., Botté, S.E., 2021. Soil metal pollution assessment in Sarcocornia salt marshes in a South American estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 166, 112224. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112224>
- Ni, X., Wan, L., Liang, P., Zheng, R., Lin, Z., Chen, R., Pei, M., Shen, Y., 2020. The acute toxic effects of hexavalent chromium on the liver of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 231, 108734. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108734>
- Noffke, N., 2010. *Geobiology: Microbial mats in sandy deposits from the Archean Era to today*. Springer Science & Business Media. 200 pp.
- Noffke, N., Gerdes, G., Klenke, T., 2003. Benthic cyanobacteria and their influence on the sedimentary dynamics of peritidal depositional systems (siliciclastic, evaporitic salty, and evaporitic carbonatic). *Earth-Sci. Rev.* 62, 163–176. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(02\)00158-7](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(02)00158-7)
- Nouet, C., Motte, P., Hanikenne, M., 2011. Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. *Trends Plant Sci.* 16, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.005>
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., Karyotis, T., 2018. Zinc in soils, water and food crops. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 49, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.02.009>
- Nuñez, J.D., Sbragaglia, V., Spivak, E.D., Chiaradia, N.M., Luppi, T.A., 2021. The magnitude of behavioural responses to artificial light at night depends on the ecological context in a coastal marine ecosystem engineer. *Mar. Environ. Res.* 165, 105238. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105238>
- Obeng-Gyasi, E., 2019. Sources of lead exposure in various countries. *Rev. Environ. Health* 34, 25–34. <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0037>
- Okmen, G., Bozanta, E., Ugur, A., Ceyhan, N., 2011. Zinc effect on chlorophyll a, total carbohydrate, total protein contents and biomass of cyanobacterial species. 5, 67-73. ISSN: 2146-0108
- Oliveira de Souza, P., Sinhor, V., Crizel, M.G., Pires, N., Sanches Filho, P.J., Picoloto, R.S., Duarte, F.A., Pereira, C.M.P., Mesko, M.F., 2022. Bioremediation of chromium and lead in wastewater from chemistry

- laboratories promotes by cyanobacteria. *Bioresour. Technol. Rep.* 19, 101161. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101161>
- Oliveira, R.C., Hammer, P., Guibal, E., Taulemesse, J.-M., Garcia, O., 2014. Characterization of metal–biomass interactions in the lanthanum(III) biosorption on *Sargassum* sp. using SEM/EDX, FTIR, and XPS: Preliminary studies. *Chem. Eng. J.* 239, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.042>
- Oschmann, W., 2000. Microbes and Black Shales. En: Riding, R.E., Awramik, S.M., *Microbial Sediments*. Springer, Berlin, Heidelberg, 137–148. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04036-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04036-2_16)
- Padilla Prado, G.M., 2023. Variación estacional de la composición de pigmentos fotosintéticos y su importancia en la fisiología del quitón *Chiton articulatus* (*Polyplacophora Chitonida*). Tesis, Universidad Autónoma de Sinaloa, México. 111 pp.
- Pan, J., Bournod, C.N., Pizani, N.V., Cuadrado, D.G., Carmona, N.B., 2013. Characterization of microbial mats from a siliciclastic tidal flat (Bahía Blanca estuary, Argentina). *Geomicrobiol. J.* 30, 665–674. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.757998>
- Pan, J., Cuadrado, D.G., Bournod, C.N., 2017. Diatom-driven recolonization of microbial mat-dominated siliciclastic tidal flat sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix111>
- Pan, J., Perillo, V.L., Cuadrado, D.G., 2019. Quantification of microbial mat response to physical disruption in siliciclastic sediments. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 230, 106434. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106434>
- Pan, J., 2021. Microbes and Marine Sediments: A Lifelong Relationship on Earth's Biosphere. *Microbes Found. Stone Biosphere* 93, 57–88. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-63512-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-63512-1_3)
- Pang, Z., Mei, Y., Nikolic, N., Nikolic, M., Li, T., Peng, H., Liang, Y., 2023. From promoting aggregation to enhancing obstruction: A negative feedback regulatory mechanism of alleviation of trivalent chromium toxicity by silicon in rice. *J. Hazard. Mater.* 457, 131720. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131720>
- Paniagua-Michel, J., Garcia, O., 2003. Ex-situ bioremediation of shrimp culture effluent using constructed microbial mats. *Aquac. Eng.* 28, 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(03\)00011-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(03)00011-6)



- Park, D., Yun, Y.-S., Cho, H.Y., Park, J.M., 2004. Chromium Biosorption by Thermally Treated Biomass of the Brown Seaweed, *Ecklonia* sp. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 8226–8232. <https://doi.org/10.1021/ie049323k>
- Pawlisz, A.V., Kent, R.A., Schneider, U.A., Jefferson, C., 1997. Canadian water quality guidelines for chromium. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, 123–183. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:2<123::AID-TOX4>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:2<123::AID-TOX4>3.0.CO;2-A)
- Pellón, A., Benítez, F., Frades, J., García, L., Cerpa, A., Alguacil, F.J., 2003. Empleo de microalga *Scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. Using microalgae *scenedesmus obliquus* in the removal of chromium present in plating wastewaters. 39, 9-16. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2003.v39.i1.312>
- Pellón, A., Frades, J., Chacón, A., Pérez, E., Oña, A., del Carmen Espinosa, M., Alvariño, C.R., Mayarí, R., Escobedo, R., 2005. Eliminación de cromo y cadmio mediante *Scenedesmus obliquus* en estado inmovilizado. *Rev. CENIC Cienc. Quím.* 36, 175–180. ISSN 1015-8553
- Pérez, C.H., 2017. Aportes de zinc al estuario bahiense. Universidad Tecnológica Nacional, Bahía Blanca, Argentina. 192 pp.
- Pérez Rama, M., 2005. Respuesta al cadmio de la microalga marina *Tetraselmis suecica* (kylin) butch: relación entre tolerancia y compuestos tiólicos: aplicación de su biomasa viva para la retirada de cadmio del medio. Universidad de La Coruña, España. 242 pp.
- Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C., 1999. Geomorphological and Physical Characteristics of the Bahía Blanca Estuary, Argentina, 195–216. En: Perillo, G.M.E., Piccolo, María Cintia, Pino-Quivira, M., *Estuaries of South America*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60131-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60131-6_9)
- Perillo, G.M.E., Piccolo, M.C., Parodi, E., Freije, R.H., 2001. The Bahía Blanca estuary, Argentina, 205-2017. En: *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04482-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04482-7_15)
- Perillo, V.L., Pan, J., La Colla, N.S., Serra, A.V., Botté, S.E., Cuadrado, D.G., 2020. Short-term efficiency of epibenthic microbial mat components on phosphorus sorption. *Mar. Pollut. Bull.* 157, 111350. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111350>
- Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D., Muñoz, J., Zambrano, J., Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D., Muñoz, J., Zambrano, J., 2018.

- Determinación de cadmio y plomo en agua, sedimento y organismos bioindicadores en el Estero Salado, Ecuador. *Enfoque UTE* 9, 89–105. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.246>
- Pernil, R., Schleiff, E., 2019. Metalloproteins in the Biology of Heterocysts. *Life* 9, 32. <https://doi.org/10.3390/life9020032>
- Perri, E., Tucker, M.E., Słowakiewicz, M., Whitaker, F., Bowen, L., Perrotta, I.D., 2017. Carbonate and silicate biomineralization in a hypersaline microbial mat (Mesaieed sabkha, Qatar): Roles of bacteria, extracellular polymeric substances and viruses. *Sedimentology* 65, 1213–1245. <https://doi.org/10.1111/sed.12419>
- Petracci, P., 2023. Foraging areas of Orlog's gull in an estuarine ecosystem of Argentina: are they underprotected?. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3345929/v1>
- Pilco Arias, J.M., Miranda Jinde, T.K., 2020. Síntesis de partículas de óxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a partir de aguas residuales provenientes de la curtiembre Tesis, Andaluz de la ciudad de Ambato, Riobamba, Ecuador. 74 pp.
- Planer-Friedrich, B., Forberg, J., Lohmayer, R., Kerl, C.F., Boeing, F., Kaasalainen, H., Stefánsson, A., 2020. Relative Abundance of Thiolated Species of As, Mo, W, and Sb in Hot Springs of Yellowstone National Park and Iceland. *Environ. Sci. Technol.* 54, 4295–4304. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00668>
- Pradhan, D., Sukla, L.B., Sawyer, M., Rahman, P.K., 2017. Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: a review. *J. Ind. Eng. Chem.* 55, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.06.040>
- Pratolongo, P.D., Piovan, M.J., Cuadrado, D.G., 2016. Coastal Environments in the Bahía Blanca Estuary, Argentina. En: Ajmal Khan, M., Boër, B., Öztürk, M., Clüsener-Godt, M., Gul, B., Siegmars, W.B., Sabkha Ecosystems. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27093-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27093-7_10)
- Prieto-Barajas, C.M., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., 2018. Microbial mat ecosystems: structure types, functional diversity, and biotechnological application. *Electron. J. Biotechnol.* 31, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.001>
- Pringault, O., Aube, J., Bouchez, O., Klopp, C., Mariette, J., Escudie, F., Senin, P., Goni-Urriza, M., 2015. Contrasted effects of natural complex mixtures of PAHs and metals on oxygen cycle in a microbial mat. *Chemosphere* 135, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.037>

- Puerto Bahía Blanca, 2023. El gigante portuario. <https://puertobahia blanca.com/identidad/periodo5.php>. Acceso 15 de enero, 2024.
- Qian, C., Zhan, Q., 2016. Bioremediation of Heavy Metal Ions by Phosphate-mineralization Bacteria and Its Mechanism. *J. Chin. Chem. Soc.* 63, 635–639. <https://doi.org/10.1002/jccs.201600002>
- Qureshi, F.F., Ashraf, M.A., Rasheed, R., Hussain, I., Rizwan, M., Iqbal, M., Yong, J.W.H., 2024. Microbial-assisted alleviation of chromium toxicity in plants: a critical review. *Plant Stress* 11, 100394. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100394>
- Rai, U.N., Singh, N.K., Upadhyay, A.K., Verma, S., 2013. Chromate tolerance and accumulation in *Chlorella vulgaris* L.: Role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. *Bioresour. Technol.* 136, 604–609. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.043>
- Raja, N.S., Nair, B.U., 2008. Chromium (III) complexes inhibit transcription factors binding to DNA and associated gene expression. *Toxicology* 251, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.07.052>
- Ramírez Marín, A., Torres de la Ossa, J.D., Torres Perdomo, M.F., Vásquez Canabal, M.J., Ocampo-Carmona, L.M., Ramírez Marín, A., Torres de la Ossa, J.D., Torres Perdomo, M.F., Vásquez Canabal, M.J., Ocampo-Carmona, L.M., 2023. Síntesis de micro y nanopartículas a partir de efluentes del decapado de la industria de galvanizado por inmersión en caliente. *Rev. ION* 36, 49–58. <https://doi.org/10.18273/revion.v36n1-2023004>
- Rand, M.D., Greenberg, A.E., Taras, M.J., 1976. Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th ed. American Public Health Association, Washington, USA. 1193 pp. ISBN 978-0-87553-078-9
- Rathnayake, I.V.N., Munagamage, T., Pathirathne, A., Megharaj, M., 2021. Whole cell microalgal-cyanobacterial array biosensor for monitoring Cd, Cr and Zn in aquatic systems. *Water Sci. Technol.* 84, 1579–1593. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.339>
- Raychaudhuri, S.S., Pramanick, P., Talukder, P., Basak, A., 2021. Polyamines, metallothioneins, and phytochelatin—Natural defense of plants to mitigate heavy metals, 227–261. En: Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819487-4.00006-9>

- Reid, A., Buchanan, F., Julius, M., J. Walsh, P., 2021. A review on diatom biosilicification and their adaptive ability to uptake other metals into their frustules for potential application in bone repair. *J. Mater. Chem. B* 9, 6728–6737. <https://doi.org/10.1039/D1TB00322D>
- Reinoso, D.M., Angeletti, S., Cervellini, P.M., Boldrini, D.E., 2020. Study of structural properties of acid-treated natural sediment and its application as a sustainable catalyst. *Braz. J. Chem. Eng.* 37, 679–690. <https://doi.org/10.1007/s43153-020-00066-2>
- Remelli, M., Nurchi, V.M., Lachowicz, J.I., Medici, S., Zoroddu, M.A., Peana, M., 2016. Competition between Cd(II) and other divalent transition metal ions during complex formation with amino acids, peptides, and chelating agents. *Coord. Chem. Rev., A Special Issue in Honor of Professor Henryk Kozlowski* 327–328, 55–69. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.07.004>
- Revie, R.W., 2011. *Uhlig's Corrosion Handbook*. John Wiley & Sons. 1284 pp. <https://doi.org/10.1002/9780470872864>
- Rhine, E.D., Garcia-Dominguez, E., Phelps, C.D., Young, L.Y., 2005. Environmental Microbes Can Speciate and Cycle Arsenic. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9569–9573. <https://doi.org/10.1021/es051047t>
- Ribeiro, L., Benyoucef, I., Poulin, M., Jesus, B., Rosa, P., Méléder, V., Du, G., Barillé, L., 2021. Spatio-temporal variation of microphytobenthos biomass, diversity and assemblage structure in the Loire Estuary, France. *Aquat. Microb. Ecol.* 87, 61–77. <https://doi.org/10.3354/ame01971>
- Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., Gillan, D.C., 2014. Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environ. Pollut.* 189, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.031>
- Rosén, L., Back, P.-E., Söderqvist, T., Norrman, J., Brinkhoff, P., Norberg, T., Volchko, Y., Norin, M., Bergknut, M., Döberl, G., 2015. SCORE: A novel multi-criteria decision analysis approach to assessing the sustainability of contaminated land remediation. *Sci. Total Environ.* 511, 621–638. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.058>
- Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., Vega, M., Bolado, S., 2018. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresour. Technol.* 263, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klünder, C., Schmitt-Jansen, M., 2007. Monitoring the effect of chemicals on biological

- communities. The biofilm as an interface. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1425–1434. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1051-8>
- Sacaca Cuellar, S.I., 2013. Distribución de bacterias sulfato reductoras en sedimentos de lagunas y turberas de la cuenca Milluni Cordillera Real, La Paz-Bolivia. Tesis, Universidad Mayor de San Andrés, Ciudad de La Paz, Bolivia. 109 pp.
- Salama, W., El Aref, M., Gaupp, R., 2015. Spectroscopic characterization of iron ores formed in different geological environments using FTIR, XPS, Mössbauer spectroscopy and thermoanalyses. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 136, 1816–1826. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.10.090>
- Sander, S., Koschinsky, A., Halbach, P., 2003. Redox speciation of chromium in the oceanic water column of the Lesser Antilles and offshore Otago Peninsula, New Zealand. *Mar. Freshw. Res.* 54, 745–754. <https://doi.org/10.1071/mf02074>
- Sandoval, G.M., 2006. Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Rev. CES Med. Vet. Zotec.* 1, 77–99. ISSN 1900-9607
- Sanmartín, P., Villa, F., Silva, B., Cappitelli, F., Prieto, B., 2011. Color measurements as a reliable method for estimating chlorophyll degradation to phaeopigments. *Biodegradation* 22, 763–771. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9402-8>
- Sapyen, W., Toonchue, S., Praphairaksit, N., Imyim, A., 2022. Selective colorimetric detection of Cr(VI) using starch-stabilized silver nanoparticles and application for chromium speciation. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 274, 121094. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121094>
- Sarin, V., Singh, T.S., Pant, K.K., 2006. Thermodynamic and breakthrough column studies for the selective sorption of chromium from industrial effluent on activated eucalyptus bark. *Bioresour. Technol.* 97, 1986–1993. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.001>
- Sathicq, M.B., Gomez, N., 2018. Effects of hexavalent chromium on phytoplankton and bacterioplankton of the Río de la Plata estuary: an ex-situ assay. *Environ. Monit. Assess.* 190, 229. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6619-1>

- Schroeder, D.C., Lee, G.F., 1974. Potential transformations of chromium in natural waters. *Water. Air. Soil Pollut.* 4, 355–365. <https://doi.org/10.1007/BF00280721>
- Seckbach, J., Oren, A., 2010. *Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer Science & Business Media. 606 pp. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3799-2>
- Seki, H., Suzuki, A., Maruyama, H., 2005. Biosorption of chromium (VI) and arsenic (V) onto methylated yeast biomass. *J. Colloid Interface Sci.* 281, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.167>
- Serra, A.V., Botté, S.E., Cuadrado, D.G., La Colla, N.S., Negrin, V.L., 2017. Metals in tidal flats colonized by microbial mats within a South-American estuary (Argentina). *Environ. Earth Sci.* 76, 254. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-6577-x>
- Sevastyanov, V.S., Kuznetsova, O.V., Fedulov, V.S., Fedulova, V.Y., Dushenko, N.V., Naimushin, S.G., Bychkova, Y.V., Krivenko, A.P., 2020. Accumulation of organic matter, heavy metals, and rare-earth elements in marine sediment at different distance from the Indigirka River delta. *Geochem. Int.* 58, 1313–1320. <https://doi.org/10.1134/S0016702920120046>
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N.K., Dumat, C., Rashid, M.I., 2017. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere* 178, 513–533.
- Shammi, M., Pan, X., Mostofa, K.M., Zhang, D., Liu, C.-Q., Song, W., 2017. Investigating extracellular polymeric substances from microbial mat upon exposure to sunlight. *Polym. Degrad. Stab.* 146, 192–200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.10.011>
- Sharma, A.D., 2009. Low chromate diet in dermatology. *Indian J. Dermatol.* 54, 293–295. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.55646>
- Shashirekha, V., Sridharan, M.R., Swamy, M., 2015. Biochemical response of cyanobacterial species to trivalent chromium stress. *Algal Res.* 12, 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.003>
- Shi, Y., Liu, Y., 2021. Evolution of extracellular polymeric substances (EPS) in aerobic sludge granulation: Composition, adherence and viscoelastic properties. *Chemosphere* 262, 128033. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128033>

- Shokravi, S., Bahavar, N., 2021. Effects of chromium (VI) at extreme alkaline condition (pH 11) on the survival, growth, photosystems and phycobilisome operation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain FS 78. *J. Appl. Phycol.* 33, 2909–2919. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02521-0>
- Shukla, A., Zhang, Y.-H., Dubey, P., Margrave, J.L., Shukla, S.S., 2002. The role of sawdust in the removal of unwanted materials from water. *J. Hazard. Mater.* 95, 137–152. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(02\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(02)00089-4)
- Shukla, D., Vankar, P.S., Srivastava, S.K., 2012. Bioremediation of hexavalent chromium by a cyanobacterial mat. *Appl. Water Sci.* 2, 245–251. <https://doi.org/10.1007/s13201-012-0044-3>
- Sibi, G., 2016. Biosorption of chromium from electroplating and galvanizing industrial effluents under extreme conditions using *Chlorella vulgaris*. *Green Energy Environ.* 1, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2016.08.002>
- Silva-Juarez, J.F., Chavez-Alegria, O., Gaxiola-Camacho, J.R., Millan-Almaraz, J.R., 2021. Diseño de concreto permeable para absorción de metales pesados en carreteras sustentables. *Tecnol. Cienc. Agua* 12, 293–334. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2021-04-07>
- Simonetti, P., Botté, S.E., Fiori, S.M., Marcovecchio, J.E., 2013. Burrowing crab (*Neohelice granulata*) as a potential bioindicator of heavy metals in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 110–118. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9804-1>
- Simonetti, P., Botté, S.E., Marcovecchio, J.E., 2017. Occurrence and spatial distribution of metals in intertidal sediments of a temperate estuarine system (Bahía Blanca, Argentina). *Environ. Earth Sci.* 76, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-6975-0>
- Singh, J.S., Singh, D.P., Dixit, S., 2011. Cyanobacteria: an agent of heavy metal removal, 223-243. En: Maheshwari, D.K., Dubey, R.C., *Bioremediation Pollutants*. IK International Publishing House, New Delhi, India. ISBN 978-93-81141-05-2
- Skrabal, S.A., Terry, C.M., 2002. Distributions of dissolved titanium in porewaters of estuarine and coastal marine sediments. *Mar. Chem.* 77, 109–122. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(01\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(01)00077-9)
- Souza, I.C., Morozesk, M., Azevedo, V.C., Mendes, V.A.S., Duarte, I.D., Rocha, L.D., Matsumoto, S.T., Elliott, M., Baroni, M.V., Wunderlin, D.A., Monferrán, M.V., Fernandes, M.N., 2021. Trophic transfer of emerging metallic

- contaminants in a neotropical mangrove ecosystem food web. *J. Hazard. Mater.* 408, 124424. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124424>
- Speake, M.A., Carbone, M.E., Spetter, C.V., 2020. Análisis del sistema socio-ecológico del estuario Bahía Blanca (Argentina) y su impacto en los servicios ecosistémicos y el bienestar humano. *Investig. Geográficas* 121–145. <https://doi.org/10.14198/INGEO2020.SCS>
- Srinivasan, K., Mahadevan, R., 2010. Characterization of proton production and consumption associated with microbial metabolism. *BMC Biotechnol.* 10, 1–10. <https://doi.org/doi:10.1186/1472-6750-10-2>
- Srivastava, D., Tiwari, M., Dutta, P., Singh, P., Chawda, K., Kumari, M., Chakrabarty, D., 2021. Chromium Stress in Plants: Toxicity, Tolerance and Phytoremediation. *Sustainability* 13, 4629. <https://doi.org/10.3390/su13094629>
- Stal, L.J., 2012. Cyanobacterial mats and stromatolites, 65-125. En: *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_4)
- StatSoft, Inc, 2007. STATISTICA (data analysis software system), versión 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). Acceso 2 de septiembre, 2024.
- Steinberger, R.E., Holden, P.A., 2005. Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5404–5410. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5404-5410.2005>
- Stolz, J.F., 2000. Structure of Microbial Mats and Biofilms, 1-8. En: Riding, R.E., Awramik, S.M., *Microbial Sediments*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04036-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04036-2_1)
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Straub, K.L., Benz, M., Schink, B., 2001. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34, 181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00768.x>
- Strawn, D.G., Sparks, D.L., 1999. The use of XAFS to distinguish between inner- and outer-sphere lead adsorption complexes on montmorillonite. *J. Colloid Interface Sci.* 216, 257–269. <https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6330>
- Streitenberger, M.E., Baldini, M.D., 2010. Deterioro de un área recreacional por efectos del volcado de líquidos cloacales. *Rev. Argent. Microbiol.* 42, 307–310. ISSN 0325-7541



- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnol. Adv.* 29, 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009>
- Sun, Y.C., Lin, C.Y., Wu, S.F., Chung, Y.T., 2006. Evaluation of on-line desalter-inductively coupled plasma-mass spectrometry system for determination of Cr(III), Cr(VI), and total chromium concentrations in natural water and urine samples. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 61, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.01.007>
- Sundar, K., Mukherjee, A., Sadiq, M., Chandrasekaran, N., 2011. Cr(III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar River basin. *J. Hazard. Mater.* 187, 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.077>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., Shin, K.-H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 51–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>
- Tabari, S., Saravi, S.S.S., Bandany, G.A., Dehghan, A., Shokrzadeh, M., 2010. Heavy metals (Zn, Pb, Cd and Cr) in fish, water and sediments sampled from Southern Caspian Sea, Iran. *Toxicol. Ind. Health* 26, 649–656. <https://doi.org/10.1177/0748233710377777>
- Tabelin, C.B., Igarashi, T., Villacorte-Tabelin, M., Park, I., Opiso, E.M., Ito, M., Hiroyoshi, N., 2018. Arsenic, selenium, boron, lead, cadmium, copper, and zinc in naturally contaminated rocks: A review of their sources, modes of enrichment, mechanisms of release, and mitigation strategies. *Sci. Total Environ.* 645, 1522–1553. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.103>
- Tahir, S.S., Naseem, R., 2007. Removal of Cr(III) from tannery wastewater by adsorption onto bentonite clay. *Sep. Purif. Technol.* 53, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.08.008>
- Tang, X., Huang, Y., Li, Y., Wang, L., Pei, X., Zhou, D., He, P., Hughes, S.S., 2021. Study on detoxification and removal mechanisms of hexavalent chromium by microorganisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111699. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111699>
- Tejada Tovar, C., Quiñones Bolaños, E., Tejeda Benitez, L., Marimón Bolivar, W., 2015. Absorción de cromo hexavalente en soluciones acuosas por cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*). *Prod. Limpia* 10, 9–21. <https://doi.org/10.22507/pml.v10n1a1>

- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B.P., Das, N., 2014. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *J. Environ. Manage.* 146, 383–399. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>
- ThermoFisher, 2023. Aluminum. <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/materials-science/learning-center/periodic-table/other-metal/aluminium.html>. Acceso 15 de enero, 2024.
- ThermoFisher, 2023. Carbon. <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/materials-science/learning-center/periodic-table/non-metal/carbon.html>. Acceso 15 de enero, 2024.
- Tiwari, S., Patel, A., Prasad, S.M., 2020. Phytohormone up-regulates the biochemical constituent, exopolysaccharide and nitrogen metabolism in paddy-field cyanobacteria exposed to chromium stress. *BMC Microbiol.* 20, 206. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01799-3>
- Tsukazaki, C., Ishii, K.-I., Matsuno, K., Yamaguchi, A., Imai, I., 2018. Distribution of viable resting stage cells of diatoms in sediments and water columns of the Chukchi Sea, Arctic Ocean. *Phycologia* 57, 440–452. <https://doi.org/10.2216/16-108.1>
- Unceta, N., Séby, F., Malherbe, J., Donard, O.F.X., 2010. Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1097–1111. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3417-1>
- Underwood, G.J.C., Paterson, D.M., Parkes, R.J., 1995. The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1243–1253. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.7.1243>
- Vaiopoulou, E., Gikas, P., 2020. Regulations for chromium emissions to the aquatic environment in Europe and elsewhere. *Chemosphere* 254, 126876. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126876>
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B., Singh, S.N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* 41, 1075–1082. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00426-9)
- Van Volkshuisvesting Ministerie, M., 2000. Circular on target values and intervention values for soil remediation-Dutch target and intervention values. *Neth. Gov. Gaz. Neth.*

- Vanzin, G., Peel, H., Wang, W., Bosworth, L., Yang, Z., Vega, M.A.P., Root, C., Brady, A., Mariscal, G.R., Rodríguez, A.A., Ticona, J., Paredes, L.M., Sharp, J.O., 2023. Scalable and customizable parallel flow-through reactors to quantify biological processes related to contaminant attenuation by photosynthetic wetland microbial mats. *MethodsX* 10, 102074. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102074>
- Verma, S.K., Khandegar, V., Saroha, A.K., 2013. Removal of chromium from electroplating industry effluent using electrocoagulation. *J. Hazard. Toxic Radioact. Waste* 17, 146–152. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000170](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000170)
- Villagrasa, E., Egea, R., Ferrer-Miralles, N., Solé, A., 2020. Genomic and biotechnological insights on stress-linked polyphosphate production induced by chromium (III) in *Ochrobactrum anthropi* DE2010. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02875-6>
- Villagrasa, E., Bonet-Garcia, N., Solé, A., 2021. Ultrastructural evidences for chromium(III) immobilization by *Escherichia coli* K-12 depending on metal concentration and exposure time. *Chemosphere* 285, 131500. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131500>
- Wadhawan, A.R., Stone, A.T., Bouwer, E.J., 2013. Biogeochemical controls on hexavalent chromium formation in estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8220–8228. <https://doi.org/10.1021/es401159b>
- Wang, G.-H., Cheng, C.-Y., Liu, M.-H., Chen, T.-Y., Hsieh, M.-C., Chung, Y.-C., 2016. Utility of *Ochrobactrum anthropi* YC152 in a microbial fuel cell as an early warning device for hexavalent chromium determination. *Sensors* 16, 1272. <https://doi.org/10.3390/s1608127210.3390/s16081272>
- Wang, S., Zhou, Y., You, X., Wang, B., Du, L., 2023. Quantification of the antagonistic and synergistic effects of Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup> bioaccumulation by living *Bacillus subtilis* biomass using XGBoost and SHAP. *J. Hazard. Mater.* 446, 130635. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130635>
- Wani, A.L., Ara, A., Usmani, J.A., 2015. Lead toxicity: a review. *Interdiscip. Toxicol.* 8, 55–64.
- Wani, A.L., Hammad Ahmad Shadab, G.G., Afzal, M., 2021. Lead and zinc interactions – An influence of zinc over lead related toxic manifestations. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 64, 126702. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126702>

- Watermann, F., Hillebrand, H., Gerdes, G., Krumbein, W.E., Sommer, U., 1999. Competition between benthic cyanobacteria and diatoms as influenced by different grain sizes and temperatures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187, 77–87. <https://doi.org/10.3354/meps187077>
- Wei, L., Li, Q., Li, H., Ye, H., Han, D., Guo, Z., Lek, S., 2022. Speciation-specific Cr bioaccumulation, morphologic and transcriptomic response in liver of *Plectropomus leopardus* exposed to dietary Cr(III) and Cr(VI). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 241, 113744. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113744>
- Wise, J.P., Wise, S.S., Kraus, S., Shaffiey, F., Grau, M., Chen, T.L., Perkins, C., Thompson, W.D., Zheng, T., Zhang, Y., Romano, T., O'Hara, T., 2008. Hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to the North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) lung and testes fibroblasts. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 650, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.09.007>
- Wu, L.H., Luo, Y.M., Xing, X.R., Christie, P., 2004. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture* 102, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.002>
- Wu, M.S., Xu, X., Zhao, Q., Y. Wang, Z., 2017. Simultaneous removal of heavy metals and biodegradation of organic matter with sediment microbial fuel cells. *RSC Adv.* 7, 53433–53438. <https://doi.org/10.1039/C7RA11103G>
- Wysocka, I., Vassileva, E., 2016. Determination of cadmium, copper, mercury, lead and zinc mass fractions in marine sediment by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry applied as a reference method. *Microchem. J.* 128, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.05.002>
- Xavier, J.C., Costa, P.E.S., Hissa, D.C., Melo, V.M.M., Falcão, R.M., Balbino, V.Q., Mendonça, L.A.R., Lima, M.G.S., Coutinho, H.D.M., Verde, L.C.L., 2019. Evaluation of the microbial diversity and heavy metal resistance genes of a microbial community on contaminated environment. *Appl. Geochem.* 105, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.04.012>
- XPSfitting, 2023. Aluminum. <https://www.xpsfitting.com/search/label/Aluminum>. Acceso 15 de enero, 2024.
- XPSfitting, 2023. Oxygen 1s Curve. <https://www.xpsfitting.com/search/label/Oxygen>. Acceso 15 de enero, 2024.

- XPSfitting, 2023. Nitrogen. <https://www.xpsfitting.com/search/label/Nitrogen>. Acceso 15 de enero, 2024.
- XPSfitting, 2023. Silicon. <https://www.xpsfitting.com/search/label/Silicon>. Acceso 15 de enero, 2024.
- XPSfitting, 2023. Using Adventitious Carbon for Charge Correcting. <https://www.xpsfitting.com/search/label/carbon>. Acceso 15 de enero, 2024.
- Xu, N., Braida, W., Christodoulatos, C., Chen, J., 2013. A Review of Molybdenum Adsorption in Soils/Bed Sediments: Speciation, Mechanism, and Model Applications. *Soil Sediment Contam. Int. J.* 22, 912–929. <https://doi.org/10.1080/15320383.2013.770438>
- Xu, H., Zou, L., Guan, D., Li, W., Jiang, H., 2019. Molecular weight-dependent spectral and metal binding properties of sediment dissolved organic matter from different origins. *Sci. Total Environ.* 665, 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.186>
- Yadav, S., Prajapati, R., Atri, N., 2016. Effects of UV-B and heavy metals on nitrogen and phosphorus metabolism in three cyanobacteria. *J. Basic Microbiol.* 56, 2–13. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500504>
- Yan, G., Gao, Y., Xue, K., Qi, Y., Fan, Y., Tian, X., Wang, J., Zhao, R., Zhang, P., Liu, Y., Liu, J., 2023. Toxicity mechanisms and remediation strategies for chromium exposure in the environment. *Front. Environ. Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1131204>
- Yin, X., Zhao, L., Fang, Q., Zi, R., Fang, F., Yang, X., Ding, G., 2024. Effects of biochar amendment on the surface and underground runoff and soil loss of karst slopes at the microplot scale. *CATENA* 238, 107857. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2024.107857>
- Zakeri, H.A., Bakar, L.A., 2013. Copper-, Lead- and Mercury-Induced Changes in Maximum Quantum Yield, Chlorophyll A Content and Relative Growth of Three Malaysian Green Macroalgae. *Malays. J. Fundam. Appl. Sci.* 9. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v9n1.76>
- Zamora-Castro, J., Paniagua-Michel, J., Lezama-Cervantes, C., 2008. A novel approach for bioremediation of a coastal marine wastewater effluent based on artificial microbial mats. *Mar. Biotechnol.* N. Y. N 10, 181–189. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9050-0>
- Zhadra, T., Tazhibayeva, S.M., Kujawski, W., Zayadan, B., Musabekov, K., Adilbekova, A., 2021. Analysis of Cr(III) Ions Adsorption on the Surface of Algae: Implications for the Removal of Heavy Metal Ions from Water. *East.-*

- Eur. J. Enterp. Technol. 4, 112. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2021.237532>
- Zhang, H., Tan, Y., Zhou, Y., Liu, J., Xia, X., 2024. Light-dark fluctuated metabolic features of diazotrophic and non-diazotrophic cyanobacteria and their coexisting bacteria. *Sci. Total Environ.* 910, 168702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168702>
- Zhang, Weixing., Majidi, Vahid., 1994. Monitoring the cellular response of *Stichococcus bacillaris* to exposure of several different metals using in vivo <sup>31</sup>P NMR and other spectroscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1577–1581. <https://doi.org/10.1021/es00058a007>
- Zhang, Y., Zheng, J., 2020. Bioinformatics of metalloproteins and metalloproteomes. *Molecules* 25, 3366. <https://doi.org/10.3390/molecules25153366>
- Zhao, J., Shen, X.-J., Domene, X., Alcañiz, J.-M., Liao, X., Palet, C., 2019. Comparison of biochars derived from different types of feedstock and their potential for heavy metal removal in multiple-metal solutions. *Sci. Rep.* 9, 9869. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46234-4>
- Zhao, Y., Gao, J., Zhou, X., Li, Z., Zhao, C., Jia, X., Ji, M., 2023. Bio-immobilization and recovery of chromium using a denitrifying biofilm system: Identification of reaction zone, binding forms and end products. *J. Environ. Sci.* 126, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.03.050>
- Zhou, X., Zhai, S., Zhao, Y., Liu, D., Wang, Q., Ji, M., 2021. Rapid recovery of inhibited denitrification with cascade Cr(VI) exposure by bio-accelerant: Characterization of chromium distributions, EPS compositions and denitrifying communities. *J. Hazard. Mater.* 411, 125087. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125087>