

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Selección experimental de microorganismos: una nueva biotecnología para el reciclado de elementos clave y basura electrónica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Paloma María Martínez-Alesón García

DIRECTORES

Dra. Victoria López-Rodas
Dr. Eduardo Costas Costas
Dra. Camino García Balboa

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**SELECCIÓN EXPERIMENTAL DE
MICROORGANISMOS: UNA NUEVA BIOTECNOLOGÍA
PARA EL RECICLADO DE ELEMENTOS CLAVE Y
BASURA ELECTRÓNICA**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Dña. Paloma María Martínez-Alesón García

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. Victoria López-Rodas

Dr. Eduardo Costas Costas

Dra. Camino García Balboa

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal

Doctorado en Veterinaria



**SELECCIÓN EXPERIMENTAL DE
MICROORGANISMOS: UNA NUEVA BIOTECNOLOGÍA
PARA EL RECICLADO DE ELEMENTOS CLAVE Y
BASURA ELECTRÓNICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Dña. Paloma María Martínez-Alesón García

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Dra. Victoria López-Rodas

Dr. Eduardo Costas Costas

Dra. Camino García Balboa

A mi familia,
la que me ha tocado y la que he encontrado por el camino

*“El trabajo científico da satisfacción intelectual, y siento que, si hago lo que me gusta,
puedo ser mejor persona.”*

Ada E. Yonath

*“If I have seen farther than others, it is because I was standing on the shoulders of
giants.”*

Isaac Newton

Agradecimientos:

¡Toca cambio! Tras pandemia, Filomena y ahora guerra en Europa, sólo puedo cerrar esta etapa de mi formación, carrera y vida, en la que he crecido y cambiado, agradeciendo a todos los que han formado parte de ella y han hecho posible que termine bien.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis directores.

A **Eduardo Costas** sin la oportunidad que él me dio y sin sus ideas, este viaje no hubiera sido posible. Su pasión por la vida y su entusiasmo por los nuevos proyectos son lo que hizo que me enamorara de la ciencia. Gracias por todas las clases ya sean en el despacho, en el coche o en el barco. Por las conversaciones y consejos sobre este “Valle de lágrimas”. A **Victoria López Rodas**, por su ciencia y por el boli rojo con el que consigue mejorar las cosas. Por enseñarme a buscar el rigor siempre. Por sentarse con paciencia a “hacer papeles” y es que *“Nuestros dos principales problemas son la gravedad y el papeleo. Podemos derrotar la gravedad, pero a veces el papeleo es abrumador.”* (Wernher von Braun). A **Camino García-Balboa**, por tener la puerta del despacho siempre abierta y por meterte en el laboratorio cuando hacía falta. Por tantos cafés y biberones con y sin cigarro. Por los miedos y las ilusiones compartidas. Gracias por ayudarme a desmitificar lo inalcanzable y ponerme los pies en la tierra. Por ayudarme a encontrar soluciones cuando no las veía y por enseñarme a adaptarme a la incertidumbre. ¡Porque hemos tenido Química!

Y todo es más fácil cuando se tiene “una hermana mayor”, tengo que agradecer a la Dra. Beatriz Baselga, toda su LUZ (y paciencia) con la que no ha dudado en mostrarme el camino aun estando a kms de distancia. Por creer en mí y en mi trabajo.

Muchas gracias al Dr. Jose Luis García Fernández, por todo el tiempo, el ánimo y el seguimiento, muchas gracias por el cariño y por la mano de hierro en guante de seda. Gracias también a la Dra. Paloma García Fernández que no ha dudado en leerse con ojo crítico cualquier cosa que escribía y le mandaba. Gracias a Ana Ojanguren y a Sergio Cardona porque la forma también es importante y siempre mejoro con sus comentarios y aportaciones.

Tengo mucho que agradecer a toda la gente que he conocido en el laboratorio y durante mi aprendizaje estos años. A Eva por enseñarme y escucharme entre placas petri, greiners, autoclaves y muestras. Al Dr. Javier Benito, que es un ejemplo, por sus clases inclusivas en las que podíamos hablar de ciencia y estadística sin importar el tema. A Javier Cebrián (y al equipo de Innovagen), por traer todo y arreglar cualquier desastre de los duendes del laboratorio. A Julia, por asegurarse de que los pantalones no me queden grandes. A Rocío, “que todo lo puede” y al Fino, por darle “clase” a esta locura. A Anita, la mejor compañera en el laboratorio. Y mención con un cariño especial, a Héctor, y es que el camino es más fácil si no vas sólo.

Gracias a los distintos proyectos en los que he podido participar durante estos años he tenido la suerte de haber conocido a grandes profesionales como Marta Fernández, Laura Muro, Alberto Luengo, Mari Luz Reyes García y Damián y Manuel Córdoba. Gracias por su tiempo y lo que he aprendido de ellos, ya fuera en sus visitas al laboratorio o cuando he podido ir yo a verles a sus lugares de trabajo.

Y tantos nombres que me he encontrado en la Facultad de Veterinaria y en la UCM, profesores y PAS, que me han acogido y han hecho que sintiera que también es mi Facultad. ¡Gracias Manuela! ¡Gracias Alba! ¡Gracias María Arias! Y gracias también, al personal del CAI de ciencias geológicas y del CAI de microscopia electrónica, gracias por su paciencia y buen hacer.

Y gracias, gracias y gracias a la famiiiiiiiiaaa. Gracias a mis padres, por TODO, no sé cómo resumirlo mejor. A mis abuelos, por seguir conmigo y a la tata Felisa por su incansable martillo pilón. A mi hermano y Cris que preguntan siempre. A mis tíos, por su acompañamiento y por su consejo y apoyo en las distintas fases por las que he pasado estos años, desde los sueños empresariales hasta correcciones en los puntos y comas. Por escucharme, guiarme y darme seguridad ¡No creo que mucha gente pueda contar con tantos padrinos y tan buenos!

Muchas gracias Sergio, por escuchar mis miedos y recordarme lo que es importante, por cuidarme en el día a día y hacer la vida más fácil y más valiosa.

Gracias también a la otra familia, Álex, Eva, Jacobo, Carlota, Ana, Miguel, Manu, Marta “la primera”, Gema, Juan, Nico, Marta y Lucía, porque hacen que la vida avance y no se pare. Gracias por sus cumpleaños, bodas, nacimientos y funerales, gracias por adaptar las cañas a no-importa-qué-circunstancia que estemos viviendo. A Elena, por aprender qué es un microalga y a Fátima que hace ¡chas! y aparece a mi lado, a Cristina por los paseos entre frustraciones y becas fallidas y a Jorge por dar Vida con un café y una copa. A la Comunidad por ayudarme a mantener la fe y obligarme a contemplar. Y a mis Erasmus, es bonito tener otra familia a distancia. Termino con las chicas de la farmacia, ¡gracias por todos los cambios de turno! ¡El roce hace el cariño!

Por último, este trabajo no hubiera sido posible sin la financiación del proyecto de la UCM con N° OTRI: 346-2017. También tengo que agradecer el apoyo de la beca Martínez-Alesón García que ha ayudado a complementar mi soporte económico. Además, quiero agradecer al grupo Albiotox de la UCM su aportación para sufragar los gastos derivados de este trabajo de investigación y a la empresa Lyrsa-Derichsburg por su colaboración.

Índice

SÍMBOLOS Y SIGLAS	13
LISTA DE TABLAS	15
LISTA DE FIGURAS	16
I. RESUMEN	19
I. SUMMARY	21
II. ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS	23
III. INTRODUCCIÓN	25
1. El Antropoceno y los problemas asociados: el origen de la contaminación	26
2. Contaminación por metales	27
2.1. Nuevos residuos el auge de las tierras raras	29
2.2. El samario como modelo y su interacción con los organismos	33
3. Las soluciones de la vida: La Biotecnología	34
3.1. Historia, Actualidad y la biotecnología verde	34
3.2. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas	36
3.3. La Biorremediación y los microorganismos	39
3.4. ¿Biorremediar metales?	40
4. Buscando los microorganismos adecuados	42
4.1. Microorganismos adaptados a la contaminación por metales	42
4.2. Selección y mejora de microalgas con fines biotecnológicos: captura de metales	44
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
IV. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	49
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	51
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. Tierras raras, metales utilizados y basura tecnológica	54
1.1. Samario	54

1.2.	Residuos metálicos.....	54
2.	Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo.	55
2.1.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (ChlA)	55
2.2.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : cepa ChlSG (111,112)	56
2.3.	<i>Euglena</i> sp. (EugVP).....	56
2.4.	Consorcio bacteriano.....	56
2.5.	Cepa Gp4p.....	57
3.	Parámetros y características poblacionales	57
3.1.	La <i>fitness</i> maltusiana (m) y la tasa de crecimiento.....	57
3.2.	Coefficiente de selección.....	59
4.	Estudios de toxicidad del Sm.....	59
4.1.	Inhibición de crecimiento celular	60
4.2.	El efecto sobre el PSII.....	60
5.	Experimentos de selección de microorganismos.....	61
5.1.	Análisis de fluctuación	61
5.2.	Mejora de la captura: Selección por caída	63
6.	Estudios de medidas morfométricas: área, perímetro, eje mayor (<i>D</i>) y eje menor (<i>d</i>)	65
7.	Experimentos de biolixiviación	66
8.	Experimentos de captura	67
9.	Métodos analíticos.....	69
9.1.	Determinación de samario.....	69
9.2.	Determinación de metales	69
10.	Microscopía electrónica	70
10.1.	Microscopía electrónica de transmisión	70
10.2.	Microscopía electrónica de barrido	70
11.	Desarrollo de biosensor y la recta de calibrado	71

12. Análisis estadísticos	71
VII. RESULTADOS	73
CAPÍTULO I: Adaptación y selección de microalgas resistentes para aplicaciones biotecnológicas.	74
CAPÍTULO II: Selección fenotípica dirigida a mejorar la captura de Sm.....	79
1. Obtención de cepas:	80
2. Tasas de crecimiento y <i>fitness</i> maltusiana.....	80
3. Morfometría	82
4. Captura de samario.....	83
5. Relación de los parámetros obtenidos	86
CAPITULO III: Aplicaciones Biotecnológicas de microorganismos seleccionados.	88
III.I Microorganismos para la recuperación de metales a partir de residuos. Proceso secuencial: Biolixiviación y Biocaptura.	89
III.II Selección de microalgas para la detección de nuevas sustancias	96
VIII. DISCUSIÓN	98
Microalgas seleccionadas	99
Adaptación y resistencia al Sm.....	99
Mejora de la capacidad de captura	102
Un modelo complejo con microorganismos extremófilos.....	106
IX. CONCLUSIONES:.....	113
IX. CONCLUSIONS	115
X. BIBLIOGRAFÍA.....	117
XI. ANEXOS.....	141
Anexo 1.	141
Anexo 2.	143
Anexo 3.	145
Anexo 4.	155

Anexo 5.	160
Anexo 6.	174

SÍMBOLOS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BNA	Banco Nacional de Algas
CAI	Centro de Análisis de Investigación
CFc	Coeficiente de forma circular
CFd	Coeficiente de forma de los diámetros
ChlA	Cepa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> de la Facultad de Veterinaria de la UCM
ChlSG	Cepa extremófila de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CRM	<i>Critical Raw Materials</i> / Materias Primas Críticas
D	Diámetro mayor
d	Diámetro menor
DS	Desviación estándar
E _i	Rendimiento de extracción
EugVP	Cepa extremófila <i>Euglena</i> sp.
HREE	<i>Heavy rare earth elements</i> / Tierras raras pesadas
HTF	<i>Heat transfer fluid</i> / Fluido térmico caloportador
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> /Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> / Espectrometría de emisión óptica acoplada a plasma
JCR	Journal Citation Reports
L _i	Eficacia de Lixiviación
LREE	<i>Light Rare Earth Elements</i> / Tierras raras ligeras
<i>m</i>	Tasa de crecimiento maltusiana
MEGs	<i>Mobile Genetic Elements</i> / Elementos de transferencia de genes de resistencia
OMG	Organismos modificados genéticamente
OTUs	<i>Operational Taxonomical Units</i> / Unidades taxonómicas operativas
POP	<i>Persistent Organic Pollutant</i> / Contaminantes orgánicos persistentes
PSII	Fotosistema II

RAEE	Residuos de aparatos eléctricos y electrónicos
REE	<i>Rare Earth Elements</i> / Tierras raras
s	Coeficiente de selección
UCM	Universidad Complutense de Madrid
WB	<i>Wet Biomass</i> / Biomasa húmeda
μ	Tasa de mutación

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales actividades y procesos llevados a cabo por el hombre causantes de la contaminación.

Tabla 2. Resultados resumidos del análisis de fluctuación realizado con *C. reinhardtii* y la solución de Sm. Datos publicados en el trabajo Martínez-Alesón García et al. 2021.

Tabla 3. Coeficientes de selección de las cepas calculado a partir del fitness de las cepas a las 168h en medio BG11 sin Sm añadido.

Tabla 4. Datos del experimento de Captura de Sm de tres de las cepas resistentes obtenidas en el análisis de fluctuación y la cepa control.

Tabla 5. Valores de p obtenidos para las comparaciones ANOVA doble vía de las tasas de crecimiento de las cepas analizadas.

Tabla 6. Valores p del análisis de morfometría comparando las cepas Control, CSm0 y CSm4.

Tabla 7. Análisis químicos del contenido de metales en las fases sólidas de los residuos metálicos, al inicio (t0) y tras 7 y 15 días de biolixiviado. Se muestra el porcentaje de metal solubilizado estimado, calculado según la variación del contenido de metales.

Tabla 8. Composición de metales encontrados en el líquido obtenido después de la exposición del residuo de chatarras a las bacterias reductoras de Fe, en el día 7 de exposición y el día 15.

Tabla 9. Especies detectadas en la identificación del consorcio bacteriano con el número de lecturas por cada especie.

Anexo 1. Tabla modificada a partir de la publicada en (Martínez-Alesón García et al., 2021) que muestra las tasas de mutación obtenidas en trabajos anteriores que realizaron el análisis de fluctuación con clorofitas.

Anexo 2. Trabajos de investigación en los que han utilizado *C. reinhardtii* para el estudio de la captura de diferentes tierras y las condiciones en las que se ha dado esa captura.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales aplicaciones de las tierras raras y en el círculo interno la producción de tierras raras a nivel global en 2016. Podemos observar la supremacía de China en la producción mundial de estos elementos.

Figura 2. Gráfico con las publicaciones agrupadas por años a fecha de 29-06-2021, catalogadas en Web of Science (WOS) con las palabras “Green biotechnology”. En total la búsqueda devolvió 17900 resultados.

Figura 3. Árbol filogenético en el que observamos encuadrados los principales organismos que componen el fitoplancton. Rodeados en rojo se encuentran los grupos de microalgas utilizados en este trabajo. Modificada a partir de www.keweenawalgae.mtu.edu/https://www.glycomar.com/marine_natural_products_microalgae.htm

Figura 4. Búsqueda en la web WOS a fecha de 15-01-2022 de la palabra “microalgae” en la que se muestra el resumen por categorías que la propia web asigna. La búsqueda devolvió un total de 34272 publicaciones guardadas en la colección de WOS.

Figura 5. Esquema del diseño experimental.

Figura 6. (Martínez-Alesón García et al. 2021) Esquema del análisis de fluctuación llevado a cabo y los posibles resultados esperados. Existen tres posibles escenarios: a. Que no exista adaptación: en ningún tubo al final del experimento encontraremos células vivas; b. Adaptación fisiológica: las células se adaptarán al nuevo medio gracias a la exposición a ese tóxico y por lo tanto deberíamos encontrar un número similar de células en todos los tubos; c. Adaptación pre-selectiva: encontraremos tubos con células vivas, pero con diferentes concentraciones celulares.

Figura 7. Esquema del proceso de selección por caída empleado para seleccionar las células de ChlRSm que más Sm han capturado. A. En la parte superior de la bureta se colocó el inóculo con las microalgas. B. Esperamos cierto periodo de tiempo. C. Las células que primero cayeron fueron recogidas y se fundó un nuevo cultivo con ellas. (Foto de Congreso World Microbe Forum 2021)

Figura 8. Esquema del proceso para la determinación de la captura de Sm. Por un lado, la total, tanto el Sm adsorbido en la pared, como el absorbido en el interior

celular y por otro lado sólo la bioadsorción, medida tras un proceso de lavado con EDTA para eliminar el Sm adherido a la pared celular.

Figura 9. Modificada a partir de Martínez-Alesón et al. 2021. Resumen comparado de los datos de morfometría y tasas de crecimiento de los 13 resistentes obtenidos con el análisis de fluctuación.

Figura 10: Modificada a partir de Martínez-Alesón et al. 2021. Relación entre los distintos parámetros morfométricos y los resultados de la captura de Sm.

Figura 11: En la sección a y b observamos las curvas de crecimiento de las cepas Control, CSm0, CSm1, CSm2, CSm3 y CSm4 para los dos medios respectivamente BG₁₁ y Sm. En la sección c podemos observar m de las distintas cepas para los medios.

Figura 12. Gráficas con las comparaciones de los valores morfométricos de las tres cepas, Control, CSm0 y CSm4.

Figura 13. En este gráfico observamos como los dos pellets de la cepa CSm4, sin lavar (Pellet1) y lavado (Pellet 2) retienen más Sm que los analizados de la cepa CSm0.

Figura 14. En las secciones a y b podemos observar respectivamente los resultados obtenidos en la espectroscopia de rayos X de dispersión en el Control (Cepa Chla sin previa exposición al Sm) y de la Cepa CSm4 cultivada en BG₁₁+ Sm. Podemos constatar la presencia de Sm gracias al pico en 5,9 que observamos en la sección b de la imagen, pico que no aparece en el cultivo Control (sección a). En la sección c podemos observar las fotografías obtenidas con el microscopio JEOL-JEM 1400 de la cepa CSm4.

Figura 15. Observamos los coeficientes de correlación entre las tasas de crecimiento (m), los parámetros morfológicos y los ng/célula de Samario capturado. Para estos dos últimos valores de Sm retenido en los pellets lavados y sin lavar, observamos una correlación inversa fuerte (< -0.5) con los parámetros morfométricos área, eje mayor y eje menor, lo que supone que a menor tamaño celular mayor captura de Samario por célula. También observamos una correlación positiva entre la captura y retención de Sm y el crecimiento de las cepas en el medio con Sm, y tiene una tendencia inversa con la tasa de crecimiento m en el medio sin Sm. El perímetro, parece un indicador correlacionado positivamente con la captura de Sm, mientras que

los coeficientes CFd y CFc están relacionados de manera negativa, siendo más fuerte la relación con CFc.

Figura 16. (A y C) Imágenes de microscopio óptico y con autofluorescencia de la cepa EugVP y (B y D) de la cepa ChlSG. (E y F) micrografías de la cepa EugVP preparadas y tomadas con microscopía electrónica de barrido (SEM).

Figura 17. Concentración de la captura de metales en los pellets de las microalgas (ng). En las gráficas A, C, E, y G se observan las cantidades de los metales recuperados por EuVp en el tiempo ($t_1=0h$, $t_2=8h$, $t_3=144h$ y $t_4=288h$). Las gráficas B, D, F y H corresponden a las capturas de metales medidas en los pellet de ChlSG.

I. RESUMEN

SELECCIÓN EXPERIMENTAL DE MICROORGANISMOS: UNA NUEVA BIOTECNOLOGÍA PARA EL RECICLADO DE ELEMENTOS CLAVE Y BASURA ELECTRÓNICA

Introducción

La acumulación de basura electrónica y la extracción de metales críticos son una fuente de contaminación creciente en todo el planeta. La recuperación de metales a partir de residuos es una necesidad y los residuos metálicos pueden convertirse en fuente de materias primas indispensables para el material tecnológico de última generación, evitando su acumulación en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Los microorganismos son responsables del reciclaje en todos los ecosistemas del planeta. En los ecosistemas acuáticos las microalgas representan el 90% de la producción primaria del planeta y son unos organismos extraordinarios: unicelulares, haploides, fotosintéticos, con tiempos de generación cortos y organizados en grandes poblaciones siendo responsables de algunos de los ciclos biogeoquímicos más importantes. Son organismos muy antiguos y diversos adaptados a todo tipo de ambientes, capaces de degradar numerosas sustancias y de capturar metales.

Objetivos

Comprender los mecanismos evolutivos y las dinámicas de población de microorganismos (microalgas y bacterias), así como posibilidades de captura y reciclaje del Sm y otros elementos residuales de alto valor añadido.

Implementar nuevas técnicas de mejora de microalgas y consorcios bacterianos para la captura y reciclaje de elementos indispensables de la industria tecnológica. Proponer modelos experimentales para la biorremediación ambiental y la captura y reciclaje de elementos críticos.

Resultados y Síntesis

Utilizando microalgas de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, hemos estudiado su captura de Sm, un elemento clave en la industria tecnológica de última generación que puede servir como modelo para otras tierras raras, y mejorado esa captura de Sm. Hemos obtenido 13 cepas resistentes a este elemento y analizado sus fenotipos en busca de nuevos parámetros que permitan una mejor selección de microalgas para la captura de Sm. Hemos probado un sistema de

mejora de esta especie para la captura de Sm, seleccionando fenotípicamente las células que se sumergían más rápido tras la exposición al Sm.

Gracias a un procedimiento secuencial con microorganismos extremófilos aislados y mejorados, hemos obtenido un biolixiviado bacteriano del que hemos capturado metales de sólidos procedentes de una planta de residuos.

Conclusiones

El análisis de fluctuación permite seleccionar *C. reinhardtii* resistentes a altas concentraciones de Sm a un pH ácido ($\text{pH} \approx 3$). La resistencia al Sm no siempre incrementa la capacidad de capturar de Sm.

Una selección por caída optimiza la captura de Sm, obteniendo células de menor tamaño. Podemos capturar más Sm con células esféricas menores. Por tanto, la combinación de ambos procedimientos experimentales (fluctuación y caída) sería una buena forma de obtener *C. reinhardtii* resistentes con una capacidad mejorada para la biocaptura de Sm.

La utilización de microorganismos seleccionados y mejorados puede ayudar en el tratamiento de residuos con alto contenido en metales. Consorcios bacterianos disuelven metales de residuos y posteriormente, diferentes especies de microalgas pueden presentar distintos perfiles de captura partiendo del mismo residuo, siendo la pared celular uno de los factores importantes en esta captura.

I. SUMMARY

Introduction

E-scrap increase and the extraction of critical metals are growing pollution sources due to technological advances. Recovering metals from e-waste can be a real solution to avoid metal accumulation in terrestrial and aquatic ecosystems and give an outlet to the already accumulated garbage by transforming it into a source. Microorganisms are responsible for recycling in almost all ecosystems known on the planet. Microalgae represent 90% of the primary production in aquatic ecosystems. They are unicellular, haploid, and photosynthetic microorganisms that quickly grow in big populations. These ancient organisms are responsible for some of the biogeochemical cycles. It is a diverse group adapted to all types of mediums and capable of degrading and capturing metals.

Objectives

Understand the evolutionary mechanisms and the population dynamics of microorganisms as well as the possibilities of capturing and recycling Sm and other metals with high added value.

Develop techniques to improve microalgae and bacteria to capture and recycle substances needed for new technologies.

Proposal of new models for bioremediation, capture, and recycling.

Results and Synthesis

Using *Chlamydomonas reinhardtii* we did study the adaptation to high concentrations of Sm in acid pH. We obtain 13 resistant strains and study their phenotypes and morphometries. We propose that some of these parameters can help to select better populations to capture this element and we improved its capture in the laboratory, by selecting the individuals with a higher density after the exposure to this element.

To develop new practical approaches to recycling metals we have to choose enhanced microorganisms and extremotolerant microorganisms to set a sequential process. First bioleaching metals from e-scrap with a bacterial consortium and then capturing them with two different microalgae.

We also address the problem of pollution detection with the development of a patented system based on microalgae sensitivity to a substance used in solar thermal power plants.

Conclusions

The selection of resistant *C. reinhardtii* to high concentrations of Sm and acid pH does not always assure an augmented capability of capturing more Sm.

A phenotypic selection by choosing the individuals with a higher density after the Sm exposure improves the capture of Sm despite a smaller cell size.

Selecting enhanced microorganisms can help to develop new treatments for e-wastes.

Different species of microalgae can present different capture profiles being the cell wall one of the principal factors.

II. ESTRUCTURA GENERAL DE LA TESIS:

La presente memoria recoge los resultados originales que componen el trabajo de tesis doctoral. Los distintos trabajos de investigación básica y de investigación aplicada que la componen se encuentran en distintas fases de preparación y publicación en distintos congresos y revistas internacionales incluidas en el Journal Citations Reports (JCR) o como modelos comerciales. Incluye una introducción general, la hipótesis y objetivos, los materiales y métodos utilizados, una discusión que engloba todos los resultados y conclusiones.

Los resultados se presentan en 3 capítulos:

CAPITULO I: Adaptación y selección de microalgas resistentes para la captura de tierras raras: el caso del samario.

- P. Martínez-Alesón García, C. García-Balboa, J. Romero-López, V. López-Rodas, E. Costas & B. Baselga-Cervera **“Fluctuation analysis to select for Samarium bio-uptaking microalgae clones: the repurposing of a classical evolution experiment”**. Vol. 215, 1 June 2021, 112134 Ecotoxicology and Environmental Safety <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112134> (JCR-ISI: Q1 en 2019).
- P. Martínez-Alesón García, C. García-Balboa, H. M. Díaz-Alejo, V. López-Rodas, E. Costas & B. Baselga-Cervera Comunicación oral: **“Análisis de fluctuación para la obtención de poblaciones de microalgas que capturen samario”** en la VI Jornadas de Investigación en doctorado – PhDay Complutense (VETINDOC) (14 Oct 2020)

CAPITULO II: Selección fenotípica dirigida a mejorar la captura de Sm.

- P. Martínez-Alesón García *et al.* (Artículo en preparación)
- P. Martínez-Alesón; H. M. Díaz-Alejo; V. López-Rodas; E. Costas; Baselga-Cervera B.; García-Balboa C. **“Selection by density to find the best *Chlamydomonas reinhardtii* for Samarium bio-uptaking”** in the session 7 of the FEMS Online Conference on Microbiology (28-31 Oct 2020).

- P. Martínez-Alesón, C. García-Balboa, H. Díaz-Alejo, E. Costas Costas, V. López-Rodas, B. Baselga –Cervera. Póster: **Does size Matter? Sustainability in hands of the little ones: A morphometric approach to select *Chlamydomonas reinhardtii* for Samarium uptake.** En el congreso World Microbe Forum (20-24 Junio 2021) Poster ID: WMF21-1752.

CAPITULO III: Aplicaciones Biotecnológicas de microorganismos seleccionados.

III.I. Microorganismos extremófilos para la recuperación de metales a partir de residuos. Proceso secuencial: Biolixiviación y Biocaptura.

- C. García-Balboa, P. Martínez-Alesón García, V. López-Rodas, E. Costas and B. Baselga-Cervera “**Microbial biominers: sequential bioleaching and biouptake of metals from electronic scraps**”. Vol.11, 1 February 2022 Microbiology Open. DOI:10.1002/mbo3.1265
- P. Martínez-Alesón García, B. Baselga-Cervera H. Díaz-Alejo Guerrero, V. López-Rodas, E. Costas Costas and C. García-Balboa. Comunicación Oral: **Buscando en la Chatarra: Microorganismos capaces de recuperar metales.** En las VII Jornadas VetinDoc – V PhDay de la Facultad de Veterinaria de la UCM. (7-Oct 2021).

III.II: Selección de microalgas para la detección de nuevas sustancias.

- Reyes García, ML; Basail Izcue, PM; Díaz-Alejo Guerrero, HM; Martínez-Alesón García, PM; Martínez Esteban P. “**Biosensor Microalgal para la detección de HTF**”. ES2846473A1. 2021. Dueño de la Patente: Acciona Energía S.A. (100%).

III. INTRODUCCIÓN:

"Todo es veneno y nada es veneno, sólo la dosis hace el veneno"

(Paracelso s. XVI)

1. El Antropoceno y los problemas asociados: el origen de la contaminación

The spread of civilisation may be likened to a fire; first, a feeble spark, next a flickering flame, then a mighty blaze, ever increasing in speed and power.

-Nikola Tesla-

El hombre contamina desde que descubrió el fuego, sin embargo, la concentración de las personas en ciudades, el aumento exponencial de la población y el desarrollo industrial ha provocado que los productos y residuos derivados de nuestra actividad se acumulen y no puedan ser gestionados por el planeta a una velocidad suficiente como para compensarlo. El progreso del ser humano va de la mano del rápido crecimiento de la población, la urbanización desmesurada o los vertidos, contaminando el conjunto del medio ambiente: aire, agua y suelos (Hardoy & Satterthwaite, 1991). Podríamos decir que existe contaminación cuando se rompe el equilibrio con el medio. La contaminación antropogénica, derivada directamente de nuestro estilo de vida y de nuestros hábitos, incluye la contaminación del aire, contaminación del agua, contaminación de suelos, contaminación electromagnética y contaminación acústica (Arihila & Arihila, 2019). Y a esta clasificación podemos añadir la contaminación lumínica (M. A. Johnson, 2009). Todas ellas tienen el potencial de producir problemas de salud y de disminuir la calidad de vida, además de afectar a otros organismos de vida salvaje y de dañar ecosistemas.

El impacto de esta contaminación conlleva consecuencias negativas, como la falta de espacio, problemas energéticos, desertificación y sequías, erosión del medio, deslizamientos de tierra, inundaciones, avalanchas, extinción de especies, pérdida de biodiversidad, contaminación del agua y del suelo, calentamiento global, etc. (Commoner, 1998). Una de las principales características de los problemas medioambientales es que se miden a escala global, ya que las consecuencias son de ese orden y afectan a todo el mundo sin importar raza, edad, género, salud o capacidad intelectual. Esto hace que cada vez sea más frecuente incluir los problemas medioambientales dentro de las actividades y acuerdos de las organizaciones internacionales (Arihila & Arihila, 2019).

Dentro de la gran variedad de contaminantes ligados a nuestra actividad industrial, sin duda unos de los más conocidos por los escandalosos vertidos que se producen y por la gran toxicidad para los seres humanos, son los compuestos orgánicos persistentes (POPs, sus siglas en inglés *Persistent Organic Pollutants*), como los compuestos policlorados,

los bifenilos, los dibenzofuranos o las *p*-dioxinas, entre otros. Originalmente son 12 compuestos de naturaleza orgánica, creados por el hombre intencionadamente, o no, como resultado de su actividad industrial (United States Environmental Protection Agency, EPA). Ejemplos de estos compuestos los seguimos utilizando hoy en día para industrias renovables y son difíciles de sustituir por sus características, pero son también los que las hacen tan nocivos. Un ejemplo actual son los líquidos de transferencia de calor o HTF (por sus siglas en inglés: *Heat transfer fluid*), utilizados en las plantas termosolares para transportar el calor. Aunque existen diferentes composiciones de estos líquidos, entre ellos hay compuestos orgánicos y sintéticos. Si se calienta más allá del rango seguro de operación, pueden producirse fugas por los puntos de conexión en las tuberías, válvulas o ventilaciones del sistema, o si existe una mala ubicación de una válvula de seguridad o de ventilación del sistema. Otro ejemplo actual, es el de los vertidos intencionados o inintencionados de fármacos y sus metabolitos.

2. Contaminación por metales:

Unos de los elementos que los humanos llevamos utilizando desde la prehistoria son los metales. La contaminación con metales se inició cuando el hombre comenzó a usar herramientas y a fundir estos elementos hace unos 2000 años como con el caso del cobre (Hong, Candelone, Patterson, & Boutron, 1996). Los metales pesados son elementos naturales que pueden encontrarse en cualquier ecosistema de nuestro planeta. Muchos de ellos son esenciales para el desarrollo de la vida, ya que participan en diferentes procesos bioquímicos. Sin embargo, en ciertas concentraciones relativamente bajas y en determinadas condiciones ambientales pueden ser tóxicos para las células y pueden causar daños a nivel del ADN, provocando la muerte celular (Tchounwou, Yedjou, Patlolla, & Sutton, 2012). La repercusión de la contaminación por metales es tan importante, que podemos observar en la Tabla 1 que actualmente se encuentran en todas las categorías de contaminación del aire según la fuente o la actividad que la produce (Arihilam & Arihilam, 2019).

Tabla 1. Tabla creada a partir del trabajo de Arihilam *et al.* (Arihilam & Arihilam, 2019) donde se muestra las principales actividades y procesos llevados a cabo por el hombre causantes de la contaminación. Podemos observar como en todos ellos se encuentra implicada también la contaminación por metales.

Actividad	Acciones Contaminantes que implica	Metales Contaminantes Implicados
Obtención de energía por combustión	Principal fuente de producción de elementos traza potencialmente peligrosos; quema de madera, carbón y aceite.	As, Cu, Hg, Ni, Pb, Se y Zn
Industria metalúrgica	Emisión de polvo y aerosoles con alto contenido de elementos traza.	Cu, Ni, Pb, y Zn
Otros procesos industriales	Hornos de alta temperatura.	As, Cr, Cu, Ni, Pb, y Zn
Transporte	Tráfico de carretera, erosión de las pastillas de freno, erosión de las vías de tren (...)	Cu, Fe, Ni, Pb y Zn
Tratamiento de residuos	Incineración de residuos domésticos.	Cr, Cu, Ni, Pb y Zn.

Desde la revolución industrial, la tecnología ha hecho que la cantidad de metales pesados en el ambiente haya aumentado. Aunque podemos encontrar altas concentraciones de metales pesados en el medio ambiente *per se*, actividades como la minería, la industria, el uso de combustibles fósiles o la agricultura los han acumulado selectivamente (Dickinson et al., 2019; François et al., 2012; Nicholson, Smith, Alloway, Carlton-Smith, & Chambers, 2003; Valette-Silver, 1993). Es frecuente encontrarlos en las aguas industriales de minería, de agricultura y de producción animal. Algunos de estos metales que se consideran tóxicos incluso a bajas concentraciones son el cobre (Cu), el cadmio (Cd), el cromo (Cr), el manganeso (Mn), el hierro (Fe), el zinc (Zn), el mercurio (Hg) y el plomo (Pb) (Javanbakht, Alavi, & Zilouei, 2014). En la última década ha aumentado la preocupación por su toxicidad y se consideran como una amenaza tanto para la salud pública, como para el medio ambiente (Dickinson et al., 2019; Laghlimi, Baghdad, Moussadak, El Hadi, & Bouaziz, 2015; Peltier, Vincent, Finn, & Graham, 2010; Samanta et al., 2012), debido sobre todo a su persistencia durante largos periodos de tiempo y a su bioacumulación en las cadenas tróficas (Douay et al., 2013). Además de a los organismos superiores, esta contaminación con metales pesados puede afectar a diversos aspectos de las comunidades microbianas que habitan ese medio concreto, como la diversidad (Berg

et al., 2012; C. García-Balboa et al., 2013) la biomasa (Samanta et al., 2012) o incluso la actividad metabólica (Hoostal, Bidart-Bouzat, & Bouzat, 2008).

2.1. Nuevos residuos el auge de las tierras raras

Ya en 2016 se estimó que el volumen de residuos eléctricos y electrónicos era de 44,7 millones de toneladas métricas y se calcula que aumenta una media de 4,1 % cada año (Grand View Research, 2018). Su alto contenido en metales (Cao et al., 2016; Wäger, Schluep, Müller, & Gloor, 2012; Xue, Yang, Ruan, & Xu, 2012) los posicionan como una potencial fuente de contaminación. Sin embargo, algunos de estos metales tienen mucho valor, como en el caso del cobre, el hierro o el oro por lo que también se contemplan como una fuente de obtención de estos elementos (Cucchiella, D'Adamo, Lenny Koh, & Rosa, 2015; Wibowo & Deng, 2015). Unos de los elementos críticos que también podemos encontrar ya en estos residuos son las **tierras raras** (Q. Tan, Li, & Zeng, 2015). En estos desechos podemos encontrar valores más altos de estos elementos, que en fuentes naturales (Cao et al., 2016).

El aluminio (Al), el magnesio (Mg), el Cu, el Fe o el Zn han sido fundamentales para el desarrollo de la tecnología que hoy en día se utiliza. Sin embargo, en los últimos años gracias a las tierras raras, hemos podido mejorar las propiedades de estos metales, como la maleabilidad, la ductilidad, la fuerza o la resistencia. Denominamos como tierras raras al conjunto de los 15 lantánidos, el escandio (Sc) y el ytrio (Y). Desde la primera aplicación de las tierras raras en la industria, la creación de los mantos de gas incandescentes desarrollados en 1883 (Neary & Highley, 1984), los diferentes elementos que componen este grupo se han incorporado a multitud de industrias mejorándolas y permitiendo el desarrollo de la tecnología tal y cómo la conocemos hoy en día. Son las vitaminas de la industria actual (Balaram, 2019). Gracias a sus propiedades magnéticas y ópticas, son esenciales en el desarrollo de tecnologías más eficientes (Graedel et al., 2015). En la Figura 1, observamos que casi un 24 % se utilizan como elementos para procesos catalíticos. Son especialmente importantes en el desarrollo de tecnologías verdes como las células solares o las turbinas eólicas pero también en el sector militar por la precisión y potencia de sus propiedades magnéticas (Dushyantha et al., 2020). Otra de sus aplicaciones es en agricultura como fertilizantes, mejorando el crecimiento y la producción de cultivos, pero aumentando también su concentración en los suelos

fertilizados con estos productos (Tyler, 2004). En China se han utilizado en gran escala para mejorar el rendimiento y la calidad de ciertos suelos (Balaram, 2019).

Las múltiples aplicaciones para las que son necesarios: catalizadores industriales, fertilizantes en agricultura, medicina, bombillas, teléfonos móviles, baterías, superimanes, etc. ha aumentado su consumo global (Migaszewski & Gałuszka, 2015). En 2014 la Comisión Europea incluyó estos elementos como materias primas críticas (CRM) y en el último informe publicado en 2020 las categoriza como de alta necesidad (Bobba, Carrara, Huisman, Mathieux, & Pavel, 2020). De hecho para abastecer la demanda de estos elementos se hace necesario el desarrollo de nuevas formas de extracción de estos elementos (Alonso et al., 2012).

A pesar de su amplia distribución, como observamos en la Figura 1, la principal potencia explotadora es China con un 90 % de la producción de las tierras raras del mercado (Mancheri, Sprecher, Bailey, Ge, & Tukker, 2019), con sólo el 33,33 % de los yacimientos conocidos dentro de sus fronteras (Balaram, 2019). Esto puede deberse al alto coste medioambiental que supone la minería y las técnicas de procesado y extracción de estos elementos (Dushyantha et al., 2020). Por ejemplo la producción de 1 kg de óxidos de samario (Sm), europio (Eu) y gadolinio (Gd) emite 55 Kg de CO₂ (Weng, Jowitt, Mudd, & Haque, 2014). Para que otros países sean competitivos en este sector es necesario encontrar nuevos métodos de extracción eficientes, económicos y de bajo coste ambiental (Favot & Massarutto, 2019; Zhou, Li, & Chen, 2017).

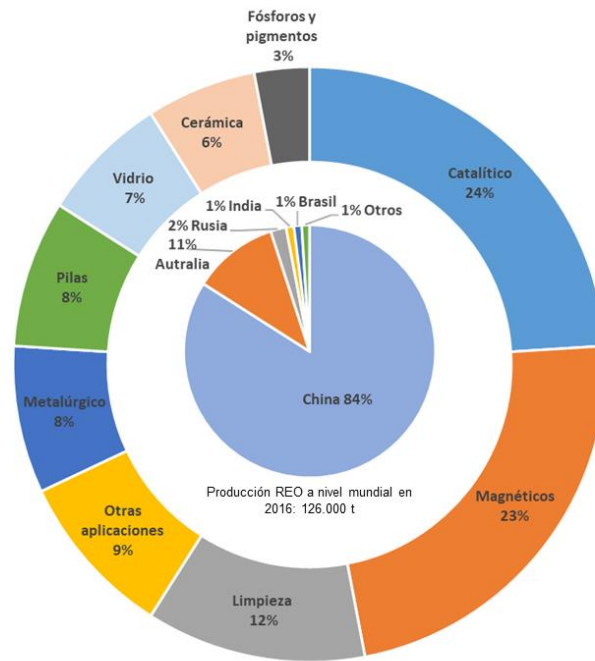


Figura 1. Imagen modificada y traducida de (Dushyantha et al., 2020) donde se observa en el círculo externo las principales aplicaciones de las tierras raras y en el círculo interno la producción de tierras raras a nivel global en 2016. Podemos observar la supremacía de China en la producción mundial de estos elementos.

El principal problema radica en su difícil extracción, ya que las tierras raras suelen encontrarse dispersas en fuentes no explotables (Haxel, Hendrick, & Orris, 2002). Se encuentran en pequeñas concentraciones y combinados en diferentes minerales como la bastnaesita, monacita, xenotima, allanita, euxenita, apatita, queralita, eudialita o loparita (Dushyantha et al., 2020). De hecho, a pesar de su nombre, en la corteza terrestre encontramos una abundancia comparable a la de otros metales. Su abundancia total es de 169,1 ppm (137,8 ppm de tierras raras ligeras y 31,3 ppm de tierras raras pesadas), y por ejemplo en el caso concreto del cerio (Ce) tiene una abundancia en la corteza terrestre similar a la del Cu (60-70 ppm) (Dushyantha et al., 2020).

Tras unas décadas de uso en la industria, empezamos a encontrar casos de contaminación por estos elementos (Klaver, Verheul, Bakker, Petelet-Giraud, & Négrel, 2014; Trifuoggi et al., 2018) y revisiones científicas discutiendo los efectos tóxicos de estos elementos sobre el medio ambiente (Balaram, 2019). Son elementos poco solubles en ambientes naturales y se encuentran en forma de traza o a concentraciones muy bajas. En ecosistemas acuáticos sin contaminar su presencia es del orden de $<0,01 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

(Gonzalez, Vignati, Leyval, & Giamberini, 2014), mientras que por ejemplo, los límites superiores de concentración de otros metales en agua potable son de $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el Fe o de $0,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para el Mn (RD 140/2003). Además del vertido directo en forma de fertilizantes y la extracción intensiva, se van acumulando residuos de basura electrónica con un alto contenido en tierras raras que, sin embargo, podrían ser útiles como fuente de reciclado de estos elementos. Las contaminaciones por vertidos de grandes cantidades de basura tecnológica están provocando el aumento de la concentración de tierras raras en subsuelos y en aguas subterráneas (Haxel et al., 2002). Se han encontrado niveles más altos de metales y tierras raras en un vertedero de vehículos en Brasil que en otros suelos de referencia y se está estudiando el impacto (Lange, Figueiredo, Enzweiler, & Castro, 2016). Estas nuevas minas urbanas pueden ser una buena fuente para la extracción de tierras raras ya que se encuentran en valores superiores a los de las minas naturales (Cao et al., 2016) y además su utilización permitiría la gestión de estos deshechos como fuente secundaria (Arya & Kumar, 2020). Esta estrategia ha sido propuesta por varios trabajos recogidos en la revisión de Balaram (2019) que plantean asegurar el suministro de las tierras raras, no sólo incrementando la extracción de fuentes primarias (antiguas minas, sedimentos marinos, cenizas o nuevos depósitos), si no también desarrollando procesos de extracción a partir de desechos industriales y electrónicos (Balaram, 2019). De esta basura electrónica, siendo su contenido alto en tierras raras y metales preciosos (Au, Ag, Pt, Pd, Rh) se estima que sólo se recicla el 12,5 % de los metales que contiene (Balaram, 2019). Esta propuesta ayudaría a que las industrias dedicadas a las tierras raras ayuden a alcanzar los objetivos de desarrollo de las Naciones Unidas como el de salud y bienestar (Objetivo 3), Agua Limpia y Salud pública (Objetivo 6) y producción y consumo responsable (Objetivo 12) y Acción clima (Objetivo 13) (Dushyantha et al., 2020). Pero el reciclado de las tierras raras desde estos materiales no es sencillo, por estar presentes en bajas concentraciones y muy dispersos. En materiales como las pantallas táctiles su distribución por todo el dispositivo no facilita su extracción. Los procesos de reciclado son aún poco eficientes y costosos y la única forma de que fueran factibles sería por imposición institucional (Balaram, 2019). Se necesitan nuevas investigaciones que faciliten estos procesos de reciclado y los hagan más accesibles.

2.2. El samario como modelo y su interacción con los organismos

Las tierras raras se encuentran clasificadas en tierras raras ligeras y tierras raras pesadas. El samario (Sm) es una tierra rara ligera, que nos sirve como modelo dentro de este grupo debido a su peso molecular intermedio (Brown, Rathjen, Graham, & Tribe, 1990). Aunque cada tierra rara posee sus características y un número atómico diferente, sí que presentan características físico-químicas comunes (Zhu et al., 2012) y respecto a la toxicidad de estos elementos en el fitoplancton parece no existir diferencias significativas (Tai, Zhao, Su, Li, & Stagnitti, 2010). El Sm es el tercer elemento según su peso molecular dentro de las tierras raras ligeras y en la naturaleza está compuesto principalmente por 7 isótopos según la USA Geological Survey.

Es una de las tierras raras más utilizadas (Chua, 1998): en fertilizantes, en filtros microondas, en imanes permanentes y en los mecanismos de control de la industria nuclear (Charalampides, Vatalis, Apostoplos, & Ploutarch-Nikolas, 2015; E. C. Giese, Caio, & Jordão, 2019; Pang, Li, & Peng, 2002; Tyler, 2004). En medicina nuclear, uno de sus isótopos (^{153}Sm) se utiliza para el tratamiento del dolor óseo en pacientes oncológicos (E. Giese, 2018; Sartor, 2004). También se aplica en procesos industriales concretos como la deshidrogenación de etanol (Hammond, 2000) o en la catálisis de plásticos bifenílicos policlorados (Emsley, 2011).

Está considerado como un elemento levemente tóxico al ingerirse y que en contacto con la piel o los ojos puede causar irritación (Pagano et al., 2015). Existe un límite máximo permitido de concentración de Sm en aguas de consumo humano $8,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Sneller, Kalf, Weltje, & Van Wezel, 2000) y debido a su uso en fertilizantes, el consumo humano a través de vegetales está siendo estudiado (Zhuang et al., 2017). No se le atribuye ningún papel biológico, pero sí se ha observado que aumenta el metabolismo de ciertos organismos (Čížková et al., 2019; Pang et al., 2002) y se le empieza a clasificar como un contaminante emergente antropogénico (Kulaksiz & Bau, 2013).

En aguas cercanas a zonas mineras, se han detectado valores de Sm entre 10^{-6} y 10^{-9} M ($0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,15\cdot 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y se ha observado su bioacumulación en microorganismos (Gammons, Wood, Jonas, & Madison, 2003; X. Li, Zhang, Wang, & Zhang, 1998; Mann, Fyfe, & Kerrich, 1988). Ya en 1988 se realizó un análisis de la presencia de múltiples elementos en muestras naturales cercanas a minas, encontrando en la muestra “EuglenaIII” presencia de prácticamente todos los lantánidos incluyendo Sm

(Mann et al., 1988). También se ha detectado su presencia en organismos superiores de la flora acuática como el Jacinto de agua (Chua, 1998).

Wang *et al.* (Wang, Zhang, & Wang, 2000) han estudiado el crecimiento de *Tetrahymena shanghaiensis* en presencia de dos tierras raras ligeras (La y Sm) y dos tierras raras pesadas (Y y Gd). Han observado un incremento del crecimiento celular a bajas concentraciones (concentración óptima de crecimiento para el Sm 0,125 mM), mientras que a altas concentraciones se producían efectos tóxicos (IC₅₀ de crecimiento poblacional del Sm 1,42 mM) (Wang et al., 2000). En la revisión Malhotra *et al.* (Malhotra et al., 2020) queda patente la importancia de realizar más estudios en condiciones controladas con organismos modelo para seguir esclareciendo los mecanismos de toxicidad y bioacumulación de las tierras raras, y en concreto de las que menos literatura encontramos, ya que la mayoría de la investigación se ha centrado en los elementos La, Gd, Nd, e Y.

3. Las soluciones de la vida: La Biotecnología

3.1. Historia, Actualidad y la biotecnología verde:

Tal y como observamos con el samario, son raros los elementos que no interaccionan con alguna forma de vida, ya sea creando un efecto tóxico o siendo aprovechado. La vida se desarrolla en casi cualquier medio con el que interacciona, y desde la antigüedad el ser humano ha aprovechado esas interacciones. Esa capitalización de las actividades que realizan los seres vivos permite el desarrollo de la **Biotecnología** como una ciencia multidisciplinar que emplea la biología, la química y la física para desarrollar procesos aplicados a otras ciencias como la medicina, la farmacia, las ciencias de los alimentos o las forestales. Karl Ereky (1919) empleó por primera vez este término para hablar de la producción cárnica y láctea (Fári & Kralovánszky, 2006). Actualmente se define biotecnología como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (Convention on Biological Diversity, Article 2. Use of Terms, United Nations. 1992). Aunque los orígenes de la biotecnología se remontan a la antigüedad, cuando el hombre empezó a desarrollar procesos de elaboración de alimentos y bebidas, fue con Louis Pasteur cuando se comenzó a modificar estos procesos con una base de conocimiento científico. El descubrimiento de los microorganismos y sus propiedades, abrió un sinfín de aplicaciones. En concreto, el proceso de fermentación es

de especial relevancia, se ha aplicado y sigue aplicándose en multitud de industrias, siendo uno de los procesos más estudiados hasta el desarrollo de la industria petroquímica.

Sin embargo, en 1953 con el descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) comienza el desarrollo de la biotecnología tal y como la entendemos actualmente, ligada al desarrollo de la ingeniería genética. Hoy en día gran parte del desarrollo de la biotecnología se basa en la modificación genética de microorganismos. La ingeniería genética permite modificar el material genético y utilizarlo como una herramienta para, por ejemplo, producir determinadas proteínas (ej. como la insulina o distintos tipos de enzimas) o la creación de vacunas y aunque cada vez es una herramienta más accesible, aún es muy costosa y se encuentra en continuo desarrollo (CM, AK, & SK, 2021).

Nuevas formas de hacer biotecnología siguen surgiendo, como el caso de la biotecnología azul, que consiste en aprovechar los recursos obtenidos de organismos marinos o la biotecnología gris, encargada de encontrar soluciones a problemas contaminantes y buscar un equilibrio sostenible entre las personas y el medio ambiente. La biotecnología verde, es la rama relacionada con el sector agrícola, ganadero y ambiental, que pretende crear soluciones que mejoren los procesos de estas disciplinas sin afectar al medio ambiente. Como observamos en la Figura 2, la investigación en biotecnología verde se encontraba en auge hasta el año 2019 cuando sufrió un parón en el 2020 por el desvío de recursos hacia la investigación sobre el SARS COV-2 y la enfermedad que ha provocado el estado de pandemia de este periodo (Búsqueda 29-06-2021 en WOS “Green biotechnology” 17900 resultados).

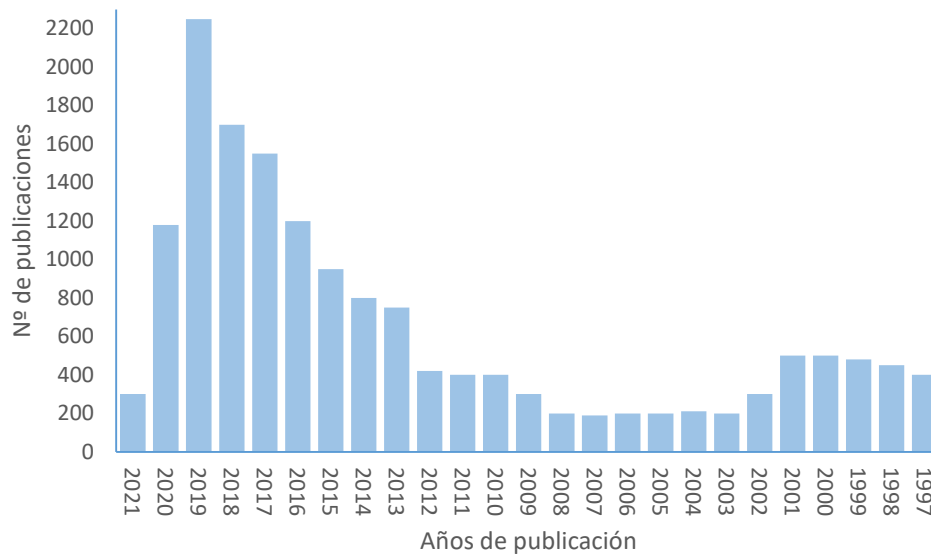


Figura 2. Gráfico con las publicaciones agrupadas por años a fecha de 29-06-2021, catalogadas en Web of Science (WOS) con las palabras “Green biotechnology”. En total la búsqueda devolvió 17900 resultados.

Dentro de la biotecnología verde se incluye la modificación genética de plantas o la utilización de microorganismos fotosintéticos para aplicaciones diversas como la biorremediación, la obtención de bioenergía o el desarrollo de biofertilizantes. Se habla de procesos verdes cuando estos tienen en cuenta la conservación de la energía, la prevención de la contaminación, el reciclado de desechos, el diseño de productos sostenibles y las tecnologías de gestión corporativas y medioambientales (Chen, Lai, & Wen, 2006). Urge encontrar nuevas fuentes de energía y tecnología sostenibles que trasformen nuestro estilo de vida (Yap et al., 2021) y aprender de las soluciones que la naturaleza emplea puede ayudarnos a encontrar una solución.

3.2. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas

Las aplicaciones biotecnológicas con microalgas, las podemos englobar dentro de esta biotecnología verde, por la característica común que presentan los integrantes de este grupo variado de microorganismos, la fotosíntesis. El término microalgas incluye un grupo de microorganismos unicelulares, fotoautótrofos muy diverso, que abarca organismos de diferentes *phyla* eucariotas, protistas y cianoprocariotas, y que forma parte del fitoplancton, los principales productores primarios y el inicio de todas las cadenas tróficas en agua tanto dulce como marina. Podemos observar en la Figura 3 los diversos

phyla que incluyen representantes de este grupo de organismos, apreciando la amplia variedad que lo componen. La clasificación de estos microorganismos es un tema de actual importancia para entender cómo se transfiere la energía desde los niveles más básicos de las cadenas tróficas compuestas por estos microorganismos hasta niveles superiores y sigue siendo objeto de estudio y discusión (Correa, Drews, Botelho, De Souza, & Tavano, 2017) y podemos encontrar distintos criterios de clasificación para estudiar sus distintas propiedades. En función de la composición de sus pigmentos, hay distintos grupos: *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas pardas); *Pyrrophyceae* (dinoflagelados); *Chrysophyceae* (algas doradas); *Bacillariophyceae* (Diatomeas) y *Rodophyceae* (Algas rojas) (Hemaiswarya, Raja, Ravikumar, & Isabel, 2013). Otras clasificaciones se centran en las características morfológicas: formas esféricas, cilíndricas, ovaladas o fusiformes y otras utilizan el tamaño: picoplancton (0,20- 2 μ m) nanoplancton (2-20 μ m) y microplancton (20-200 μ m) (Correa et al., 2017).

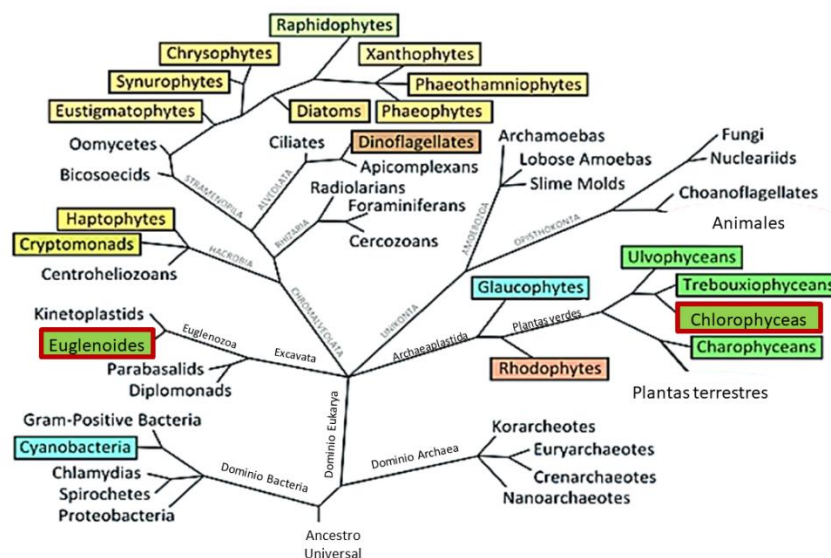
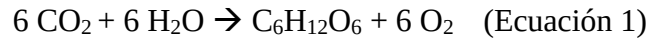


Figura 3: Árbol filogenético en el que observamos encuadrados los principales organismos que componen el fitoplancton. Rodeados en rojo se encuentran los grupos de microalgas utilizados en este trabajo. Modificada a partir de www.keweenawalgae.mtu.edu/ https://www.glycomar.com/marine_natural_products_microalgae.htm

Son microorganismos de interés biotecnológico por multiplicarse fácilmente, ajustando los nutrientes del medio y algunas especies en pocas horas pueden doblar su biomasa

(Okoro, Azimov, Munoz, Hernandez, & Phan, 2019). Esto hace que sean una herramienta económica y asequible. Pero, además, realizan la fotosíntesis, por lo que son capaces de capturar el CO₂ transformándolo en O₂, haciéndolas idóneas para desarrollar nuevas tecnologías verdes.



Las cianobacterias, incluidas en este grupo, parecen haber sido las responsables del aumento del oxígeno atmosférico permitiendo el desarrollo de la vida aerobia tal y cómo la conocemos (Cavalier-Smith, Brasier, & Embley, 2006). Pero los humanos no sólo hemos aprovechado el O₂ que estos microorganismos producen. En la antigüedad los aztecas o en China, los utilizaban para alimentación o como fertilizantes. Una búsqueda en WOS de la palabra “microalgae” basta para comprobar que la categoría mayoritaria de la investigación actual sobre estos microorganismos está dedicada a la Biotecnología aplicada, con 9802 registros como se muestra en la Figura 4. En esta misma imagen destaca también la segunda categoría, una de las aplicaciones en concreto que se ha estado desarrollando con estos microorganismos, la obtención de biocombustibles.



Figura 4. Búsqueda en la web WOS a fecha de 15-01-2022 de la palabra “microalgae” en la que se muestra el resumen por categorías que la propia web asigna. La búsqueda devolvió un total de 34272 publicaciones guardadas en la colección de WOS.

La principal aplicación de las microalgas se basa en la obtención de carotenoides, proteínas, vitaminas y algunos pigmentos que se utilizan en diversas industrias como la cosmética o la alimentaria tanto animal como humana. Sin embargo, además de esto y de la obtención de biofuels, también sirven para la realización de bioensayos para el control de la calidad del agua. Su fácil y económico manejo y su mayor sensibilidad a ciertos contaminantes las posicionan como mejores biomonitores que otros sistemas más complejos como sería el uso de peces. De aquí también radica la importancia de los estudios de toxicidad con nuevos contaminantes y con nuevas especies. Además, su metabolismo se utiliza para desarrollar sistemas de depuración y biorremediación.

3.3. La Biorremediación y los microorganismos

La biorremediación surge como una rama de la biotecnología en el siglo XX, cuando el daño de nuestros actos ya es patente. Las primeras patentes de remediación y las primeras investigaciones surgen como consecuencia de los vertidos de petróleo y gasolina. **Biorremediación** se define como el proceso por el que los microorganismos, son estimulados para degradar contaminantes peligrosos para el medio ambiente hasta niveles seguros en suelos, aguas, otras sustancias, materiales o sedimentos (Kulshreshtha, Agrawal, Barar, & Saxena, 2014). Sin embargo, también encontramos definiciones más amplias en las que se incluye el uso de otros organismos como hongos, plantas o enzimas de estos organismos para recuperar un medio ambiente alterado por contaminantes. Este proceso incluye la eliminación o la transformación del agente contaminante en un nuevo material que puede ser tratado de otra forma y en otro lugar. Algunos ejemplos de procesos de biorremediación son la fitorremediación, el uso de biorreactores, el compostaje, la biolixiviación o la bioestimulación (Kulshreshtha et al., 2014). Los microorganismos juegan un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio ecológico del planeta. Son responsables de los ciclos biogeoquímicos (47-50), del inicio o del cierre de las cadenas tróficas, así como del reciclado de moléculas complejas procedentes del metabolismo de los organismos o de contaminantes emergentes antropogénicos, convirtiendo residuos en nuevos recursos. Estas características pueden utilizarse para optimizar recursos, recaptando materiales de residuos, acelerando el proceso natural y dándoles una nueva vida sin los costes de una nueva producción o extracción, lo que puede resultar tremendamente útil en el caso de las tierras raras y otros metales críticos.

3.4. ¿Biorremediar metales?

3.4.1. Biorremediación como forma de vida

Los microorganismos encuentran sus fuentes de nutrientes allí donde desarrollan su vida y si en ese ambiente se encuentra algún contaminante, este puede convertirse en una fuente adicional de nutrientes de dos maneras diferentes, bien obteniendo el carbono necesario para su desarrollo o bien obteniendo energía mediante la ruptura de enlaces y la transferencia de electrones (procesos de oxidación reducción). Un contaminante que actúa como un aceptor de electrones va a ser reducido y un contaminante que pierde electrones va a ser oxidado. Un ejemplo típico de aceptor de electrones es el oxígeno, aunque otras moléculas pueden desempeñar este papel también, como los nitratos, los sulfatos, el hierro o el dióxido de carbono (Kulshreshtha et al., 2014). De esta forma los microorganismos son capaces de captar nutrientes inorgánicos de las aguas residuales como es el caso del nitrógeno y el fósforo, los cuales asimilan para su crecimiento (Alvarez, 2015).

La biorremediación sólo se entiende para aquellos compuestos que son biodegradables y no todos los contaminantes son susceptibles de degradarse completamente y mucho menos rápidamente (Kulshreshtha et al., 2014). Este es el caso de la contaminación por metales, al no ser materiales biodegradables se complican los procesos de biorremediación y eliminación del medio (He & Chen, 2014). Al no poder degradar estos elementos, vamos a buscar la retirada, si no total, parcial de estos contaminantes ya sea por procedimientos físicos, químicos o biológicos. En esta línea encontramos estudios que proponen la utilización de microalgas para la bioabsorción de metales y su uso como una herramienta biotecnológica muy útil para “la biorremediación” de metales (Martínez, Leyton, Cisternas, & Riquelme, 2018). De esta forma podremos eliminar el metal o las tierras raras del medio y concentrarlo para tratarlo de nuevas formas hasta su completa recuperación.

3.4.2. Las microalgas biosorbentes y bioacumuladoras de metales

Como hemos comentado con anterioridad, las microalgas, y los microorganismos en general, pueden bioacumular metales, como el Sm, e introducirlos en las cadenas tróficas, pero en este punto tenemos que diferenciar dos procesos distintos: la **bioadsorción o biosorción** y la **bioabsorción o bioacumulación**.

La **biosorción** es un proceso de captura donde un biomaterial o un biopolímero se une por procesos químicos o físicos a una sustancia (He & Chen, 2014). Se comenzó a estudiar a principios de los años 70 cuando se observó que las algas retenían elementos radioactivos incluyendo metales pesados en las aguas residuales de las estaciones nucleares (He & Chen, 2014). No es un proceso exclusivo de las microalgas, en general lo realizan las plantas que posean una pared celular cargada negativamente, lo que les permite captar iones positivos (Macfie & Welbourn, 2000). Estudios de laboratorio proponen este sistema como una tecnología asequible para la eliminación de metales pesados en soluciones acuosas (He & Chen, 2014). Comparado con otros métodos como la reducción química, el intercambio iónico, la precipitación de metales o la separación por membranas, es un proceso que presenta ciertas ventajas: bajos costes tecnológicos, baja cantidad de biosorbente inicial y pocos nutrientes requeridos (Sheng, Ting, & Chen, 2007).

Esa carga negativa de la pared, se debe en parte a la presencia de ficocoloides, un grupo de polímeros naturales que contienen grupos polares (metilos, sulfatos, pirúvicos, carboxilo, etc.) que además de la carga aniónica, poseen una estructura lineal lo que otorga a las células que lo poseen propiedades de intercambiadores de cationes y de quelantes. Estos grupos están presentes en las algas, que son capaces de concentrar hasta cuatro órdenes de magnitud de los oligoelementos disueltos en el medio marino (Cr, Pb, As, Hg, Sr, metales radioactivos, etc.) (Andrade Couce et al. 1985.; Lobban & Harrison, 1994). Aunque la membrana celular es la que separa el citoplasma del medio externo, la pared celular es la primera estructura que entra en contacto con el medio en las especies que la poseen. Pero en el caso de las microalgas no todas las especies la poseen (Ej. *Dunaliella salina*), ni todos los grupos (Ej. Euglenoides). Está compuesta principalmente por carbohidratos, proteínas y lípidos, que poseen grupos aniónicos capaces de interaccionar con los cationes metálicos capturándolos (Spain, Plöhn, & Funk, 2021). Existen estudios de espectroscopía, mostrando que entre los grupos funcionales involucrados en las uniones de la pared y los metales se encuentran los grupos carboxilo, hidroxilo, sulfato, tiol (sulfhidrilo), fosfato, amino, amido, imina, tioéter, fenol, carbonilo (cetona), imidazol, fosfonato y fosfodiéster (Javanbakht et al., 2014). Además hay microalgas como *Chlamydomonas* y *Porphyridium* capaces de sintetizar y excretar mucopolisacáridos principalmente compuestos por arabinogalactanos, fucosa y ácidos urónicos (Lembi & Waaland, 1988).

Estos procesos de biosorción pueden realizarse con los organismos vivos o sólo con la materia orgánica muerta y ambos métodos presentan ventajas e inconvenientes (Spain et al., 2021). Entre las ventajas del uso de las células vivas queremos destacar la posibilidad de **bioacumular** estos metales en las células. Este proceso de bioacumulación está mediado por la actividad enzimática de la célula, que puede biotransformar o alterar el contaminante haciendo su recuperación más difícil (Torres, 2020), pero la incorporación de los contaminantes a las células, hace que retirando las células del medio por procesos físicos sencillos como la centrifugación, la filtración o la floculación, o incluso mediante imanes (I. Kim et al., 2019) nos permitan retirar o reducir esa sustancia del medio, mejorando la situación inicial.

Además de la afinidad demostrada de estos microorganismo por diferentes metales (Doshi, Ray, Kothari, & Gami, 2006) existen evidencias científicas sobre las ventajas del uso de las microalgas para la bioabsorción de metales y en la biorremediación de iones metálicos (Gupta et al., 2016; He & Chen, 2014; Martínez et al., 2018). Por ejemplo, encontramos trabajos que han observado la adsorción y elución de oro, plata y cobalto (Hamdy, 2000) y la reducción de metales iónicos del medio (Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+}) con biomasa microalgal (Martínez et al., 2018). En el caso de las tierras raras, algunas especies son capaces de acumularlas y se ha propuesto su uso como bioindicadores de contaminación de estos elementos en aguas (Macmillan et al., 2019).

4. Buscando los microorganismos adecuados

4.1. Microorganismos adaptados a la contaminación por metales

Los microorganismos son bastante sensibles a la contaminación por metales, pero han demostrado desarrollar mecanismos de resistencia. Las bacterias en concreto adquieren estos mecanismos de resistencia por mutaciones cromosómicas o por elementos de transferencia de genes de resistencia (MGEs) (Bruins, Kapil, & Oehme, 2000; Giller, Witter, & Mcgrath, 1998). Existen casos de resistencia cruzada entre diferentes metales y también de con otros contaminantes emergentes como los antibióticos. Bruins *et al.* (2000) proponen que los microorganismos pueden desarrollar seis mecanismos de resistencia a metales (Bruins et al., 2000):

- exclusión por la permeabilidad de la pared
- intra- captura celular
- extra- captura celular

- transporte activo de salida mediante bombas de flujo
- detoxificación celular
- una reducción en la sensibilidad de las dianas celulares de interacción con los metales.

La exposición continua a metales determina procesos de adaptación fisiológica o epigenética (Belfiore & Anderson, 2001). La aparición de tolerancia a metales o de genes relacionados con el estrés celular mantienen una correlación positiva con el nivel de metales pesados encontrados en los sedimentos de donde fueron aislados los microorganismos (Besaury et al., 2013; Bouskill et al., 2013; X. F. Li, Yin, & Su, 2012; Lyautey et al., 2021; Seiler & Berendonk, 2012; Y. Zhao et al., 2019).

En el Anexo 1 se han recogido los trabajos en los que se ha estudiado la adaptación de *chlorophytas* a altas concentraciones de contaminantes o a aguas tóxicas utilizando una adaptación del clásico análisis de fluctuación (Victoria López-Rodas et al., 2001) que Luria y Delbrück desarrollaron en 1943 (Luria & Delbrück, 1943). El **análisis de Fluctuación** de Luria y Delbrück (Luria & Delbrück, 1943) fue un trabajo teórico y experimental desarrollado para entender si la naturaleza de las mutaciones que permiten, que una población de bacterias sobreviva a un agente tóxico (bacteriófago α), sigue un modelo general, preadaptativo y espontáneo; o si por el contrario, es un proceso específico, postadaptativo y dirigido. Gracias a los avances de los estudios de genética, en las décadas de 1940 y 1950 descubrieron que las bacterias tienen sistemas genéticos comparables con los de los organismos macroscópicos. Su rápido crecimiento los hacía modelos idóneos para los estudios de genética y evolución. Durante estos años, se establecieron las bases de la genética molecular desarrollando experimentos como el trabajo publicado en 1943 por Luria y Delbrück o el trabajo desarrollado en 1946 por Lederberg y Tatum sobre el intercambio de material genético por conjugación de las bacterias. Con la utilización de los microorganismos como modelo en investigación evolutiva, resurgieron viejas discusiones como la idea lamarckiana de que la adaptación era necesaria para ajustar las modificaciones de los organismos a los cambios ambientales, siendo los cambios ambientales el origen de estas variaciones, mecanismo contrario al propuesto por Darwin (Klemming, 2002). Por otro lado, gracias a la aplicación del concepto de selección natural de Darwin, se desarrollaron nuevos métodos

de cultivo como los medios de cultivo selectivos y enriquecidos, que permitieron el aislamiento de microorganismos.

En anteriores trabajos de nuestro grupo, se ha estudiado la adaptación de microorganismos eucariotas a aguas cercanas a minas de uranio (Baselga-Cervera, García-Balboa, Díaz-Alejo, Costas, & López-Rodas, 2019) y se ha observado que esa tolerancia a aguas de mina ácida supone que los organismos pueden desarrollar sus funciones vitales en ese medio concreto, lo que puede implicar la formación de sustancias poliméricas extracelulares (García-Meza, Barrangue, & Admiraal, 2005), la unión de metales a grupos de su pared celular o su internalización para quelarlos en el interior de la célula (Wilde & Benemann, 1993). Todos estos mecanismos pueden aprovecharse para aplicaciones biotecnológicas (Baselga-Cervera, García-Balboa, Díaz-Alejo, et al., 2019).

4.2. Selección y mejora de microalgas con fines biotecnológicos: captura de metales.

Desde el inicio de los tiempos hemos seleccionado organismos, desde las mejores semillas para la cosecha siguiente hasta qué animales eran domesticados y cuáles no. En el caso de los microorganismos, aunque no hemos sabido de su existencia hasta el siglo XVII, ha ocurrido igual. Un ejemplo de que esto ha sido así, aunque ni si quiera fuéramos conscientes, es el caso de nuestra microbiota intestinal.

Para mejorar la capacidad de los microorganismos de capturar metales, aunque los resultados son todavía fragmentarios, hay autores que proponen realizar pretratamientos en las condiciones de cultivo para mejorar la sorción de metales (Avilés, Loza-Tavera, Terry, & Moreno-Sánchez, 2003; Huang et al., 2019; Y. Li et al., 2019). Una segunda opción es la identificación de los genes y de las secuencias diana implicadas en la biocaptura de metales mediante técnicas de ingeniería genética (Cheng, Show, Lau, Chang, & Ling, 2019; Ibuot, Dean, McIntosh, & Pittman, 2017). Estas técnicas que son muy específicas, son caras y en general lentas, ya que suele haber muchos genes implicados en las rutas metabólicas asociadas a las metalotioneinas y por la complejidad de su material genético, empeora en el caso de los eucariotas.

Otra aproximación es basarnos en la teoría evolutiva, que nos enseña como la selección es la fuerza que dirige la evolución de las especies, y como estas se van adaptando a nuevos escenarios gracias a mecanismos como la mutagénesis. Basándonos en estos conceptos podemos obtener poblaciones con características concretas que puedan aplicarse biotecnológicamente. Lo especifiquen o no, los trabajos que proponen la

utilización de cepas extremófilas aisladas de medios contaminados para la remediación de ese mismo medio, siguen este planteamiento. Pero hay pocos trabajos en los que se hayan seleccionado microorganismos y mejorado su capacidad de biorremediación en el laboratorio. Un ejemplo, es la obtención de la cepa de *Chlamydomonas*, ChlSG, mediante mecanismo de selección artificial para incrementar su habilidad de capturar uranio, descrita y caracterizada por su potencial biotecnológico (Baselga-Cervera *et al.*, 2018; Baselga-Cervera, García-Balboa, López-Rodas, *et al.*, 2019).

Puesto que uno de los factores más importantes en la captura de metales por microalgas es la pared celular, incluyendo el caso de las tierras raras (Kosak née Röhder, Brandt, Sigg, & Behra, 2018) los factores morfométricos celulares pueden estar relacionados con la captura y resultar interesantes para seleccionar estos microorganismos. Actualmente, se siguen realizando estudios de morfometría del fitoplancton tanto para entender cuál ha sido la evolución de las formas en estos organismos, como de sus propiedades bioquímicas implicadas en estos procesos y según la tecnología avanza se incluyen también estudios a niveles subcelulares (Baselga-Cervera, Costas, Bustillo-Avendaño, & García-Balboa, 2016; Uwizeye *et al.*, 2021). De hecho, se propone utilizar la morfometría que adopta *Euglena gracilis*, una especie sin pared celular, como indicador de la captura o no de metales (Xu *et al.*, 2021). Estos análisis se realizan en la actualidad con técnicas como la microscopía electrónica.

En concreto, la especie *Chlamydomonas reinhardtii* es un microorganismo modelo, útil en investigación por poseer un ciclo haplo-diploide, ser de fácil cultivo, ser móvil y porque la secuenciación de su genoma ha sido completada (Blaby *et al.*, 2014; Harris, 2001). Es amplia la bibliografía que encontramos entorno a la captura de tierras raras con microorganismos, pero es más limitada si nos centramos en *C. reinhardtii*. Este microorganismo ha sido utilizado por otros grupos en estudios de captura y bioabsorción de tierras raras resumidos en el Anexo 2. Estos estudios se han centrado principalmente en el desarrollo de modelos que permitan estimar los flujos de captura de tierras raras como el modelo del ligando biótico (BLM), que sirve como herramienta para comprender mejor la biodisponibilidad de los metales en medios líquidos y la capacidad de ser acumulados (Crémazy, Campbell, & Fortin, 2013; Q. G. Tan, Yang, & Wilkinson, 2017a; C. M. Zhao & Wilkinson, 2015). También se ha estudiado la importancia de ciertos factores en la biocaptura de estos elementos, como el pH (Yang, Hadioui, Wang, & Wilkinson, 2019) o la presencia de otros elementos como el Mg, el Ca, el ácido cítrico o

el ácido málico y otras tierras raras (Morel, Cui, Zerges, & Wilkinson, 2021; Yang & Wilkinson, 2018) por los posibles efectos de competición que puedan existir entre distintos iones trivalentes (Aharchaou, Bahloul, & Fortin, 2020). Sin embargo, todos estos trabajos han sido realizados en periodos de tiempo cortos (los de mayor tiempo de exposición han durado 2 h).

En este trabajo nos proponemos estudiar la captura del Sm y de un material más complejo como son los residuos con altos contenidos en metales, utilizando poblaciones vivas de un modelo de laboratorio como es *C. reinhardtii* y de microorganismos extremófilos/extremotolerantes aislados de lugares contaminados con altas concentraciones de metales.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

“Religion is a culture of faith; science is a culture of doubt.”

Richard P. Feynman

Hipótesis:

En los últimos años ha surgido el concepto de “metales críticos” por la alta demanda que existe para desarrollar nuevas tecnologías (Graedel et al., 2015). De entre estos metales destacan las tierras raras por el incremento en su utilización en diversas industrias y para desarrollar nuevas tecnologías. Además, en los últimos años su presencia entre los vertidos de metales se ha visto incrementado. En la naturaleza los microorganismos son los encargados de cerrar los ciclos biogeoquímicos que conocemos y son el inicio de las cadenas tróficas. En los últimos años se ha estudiado la capacidad que tienen algunos microorganismos para capturar estos y otros metales. Nos proponemos seleccionar microorganismos capaces de capturar elementos críticos como las tierras raras y mejorar su captura. Esto serviría también para su eliminación de zonas contaminadas con su presencia o su captura de residuos ya no aprovechables, ayudando a cerrar el ciclo de su utilización.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivos de investigación básica:

1. Conocer y comprender los mecanismos evolutivos y las dinámicas de población de microorganismos (microalgas y bacterias), así como las posibilidades de captura y reciclaje del samario, como ejemplo de tierra rara, y residuos metálicos.
2. Implementación de nuevas técnicas de mejora de microalgas y microorganismos para la captura y reciclaje de elementos indispensables de la industria tecnológica.

Objetivos específicos:

1. Aislamiento, selección y mejora de microorganismos extremófilos-extremotolerantes de ecosistemas acuáticos contaminados con tierras raras.
2. Estudio de la eficacia de la captación de metales por parte de los microorganismos seleccionados y estudio de las características morfométricas implicadas.
3. Desarrollo y obtención de un modelo de rendimientos eficaces a escala de laboratorio.

IV. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES:

Hypothesis:

In the last years, the concern about certain metals and metalloids has been augmented (29). These elements are highly demanded because of their need in the development of new and green technologies. Moreover, in the last years, it has been observed a rise of its presence as electronic waste and its spill is seen as a problem in the coming years. Microorganisms are responsible for the closure of the biogeochemical cycles, and this tiny form of life is the start of the trophic chains. Its ability to capture rare earth elements and other metals is being studied recently. We propose to study the ways of recycling these critical metals for which there is no substitution, improving microorganisms' capabilities of capturing these elements and their use in an iterative way. This would also serve to eliminate them from contaminated areas with their presence.

We set the following objectives:

General objectives:

1. To know and understand the adaptive mechanisms and the population dynamics of microalgae in the presence of rare earth elements, like Samarium, and the capture of metals from metallic wastages.
2. Development of new techniques to improve the metal capture of microalgae.

Specific objectives:

1. Isolation, selection and improvement of extremotolerant microorganisms in aquatic ecosystems with rare elements presence.
2. To study the capture of the microorganisms selected and compare them morphometrically.
3. Development and performance of a model on a laboratory scale

V. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Este trabajo tiene como objetivos centrales la obtención de organismos resistentes a metales de interés, Sm específicamente y tierras raras en general, y la selección de cepas con alto rendimiento en captura de metales disueltos en medio acuoso. Estos dos objetivos se abordaron experimentalmente bajo dos puntos de vista: 1) un modelo teórico basado exclusivamente en la resistencia y captura de un solo metal; 2) un ejemplo aplicado en el que se utilizó un residuo polimetálico procedente de una planta de reciclaje como fuente de metales.

Tras elegir una tierra rara como modelo, el Sm, elegimos como organismo modelo *C. reinhardtii* para seleccionar cepas resistentes a este elemento y realizar los estudios de morfometría y la mejora de la captura. La obtención de resistentes a Sm se realizó mediante el Análisis de Fluctuación y la selección de células óptimas en la captura de este metal, mediante el ensayo de selección por caída.

Para la aplicación de la captura en condiciones reales, se sometió un residuo sólido complejo procedente de una planta de reciclaje a un proceso secuencial, primero de biolixiviación bacteriana y a una posterior captura mediante dos cultivos diferentes de microalgas extremotolerantes. En la Figura 5 podemos observar un esquema del diseño experimental a seguir.



Figura 5. Esquema del diseño experimental.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS:

“The way to get started is to quit talking and begin doing.”

Walt Disney

1. Tierras raras, metales utilizados y basura tecnológica

1.1. Samario

El samario es una tierra rara ligera, que además de por su importancia y por las diversas aplicaciones ya comentadas en la introducción, nos sirve como modelo dentro de este grupo de tierras raras por su peso molecular intermedio (Brown et al., 1990). Aunque cada tierra rara posee características físico-químicas particulares, sí que presentan características comunes (Zhu et al., 2012). Por ejemplo, estos elementos parecen no presentar diferencias significativas en su toxicidad sobre las microalgas (Tai et al., 2010). Hemos utilizado una solución comercial de Sm (Carl Roth GmbH + Co. Laboratories, Roti®Star, Karlsruhe, Germany) en la cual el material de partida estaba en forma de Sm_2O_3 con una pureza del 99,99 %. La solución de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Sm contenía un 2 % (v/v) de HNO_3 lo que permitía que la especie Sm^{3+} fuera la mayoritaria y aseguraba disolución (Q. G. Tan, Yang, & Wilkinson, 2017b). Todos los medios que contenían Sm se prepararon añadiendo el volumen necesario de esta solución comercial para obtener la concentración requerida a agua bidestilada enriquecida con el caldo de cultivo BG₁₁. El pH de las soluciones obtenidas fue monitorizado con un pHmetro Sesión+ph3 (HACH®) y en caso de ser necesario se ajustó al pH deseado (3 o 6) con el volumen necesario de una solución 1 M de NaOH.

1.2. Residuos metálicos

Para desarrollar un modelo más real hemos utilizado también residuos metálicos, suministrados por la empresa LYRSA-Derichbourg, especializada en reciclado y gestión de residuos industriales y residuos electrónicos metálicos. El material suministrado consistía en la fracción resultante de un proceso mecánico de fraccionamiento y separación que realizan en la planta de procesamiento de residuos. Se trata de un sólido pulverulento compuesto por partículas de tamaño entre 0 y 3 mm. Estas fracciones ligeras procedentes del fragmentado y que contienen metales están clasificadas con el código LER 191004 de acuerdo con la Decisión 2014/955/UE, de la Comisión de 18 de diciembre de 2014 en la que se establece la lista europea de residuos. Son residuos principalmente destinados al vertido en lugares especialmente diseñados (código D5 de valorización y eliminación de residuos) aunque podrían destinarse también al reciclado o recuperación de materias primas (códigos R3 y R4 de valorización y eliminación de residuos). Su composición está detallada en la tabla 7.

Con este polvo se preparó el medio para los experimentos de biolixiviación (detallados en el punto 7 de Material y Métodos).

2. Microorganismos utilizados y condiciones de cultivo.

Hemos utilizado diversos tipos de microorganismos modelo obtenidos de la colección de microalgas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid: *Chlamydomonas reinhardtii* (ChlA); *Chlamydomonas reinhardtii*: cepa ChlSG; *Euglena* sp. (EugVP) y un consorcio bacteriano aerobio de bacterias quimiolitotrofas principalmente, obtenido de unas muestras de agua de mina de uranio.

2.1. *Chlamydomonas reinhardtii* (ChlA)

Una de las especies utilizadas es el microalga de agua dulce, *Chlamydomonas reinhardtii*, perteneciente al phylum Chlorophyta, a la familia Chlamydomonadaceae y al género *Chlamydomonas*. *Chlamydomonas* es un género de algas verdes, flageladas, de agua dulce, con un ciclo de vida haplo-diploide. Posee una forma elipsoide (Groendahl, Kahlert, & Fink, 2017) y puede tener dos o cuatro flagelos que permiten a la célula moverse hacia diferentes tropismos, como la luz o los nutrientes. Su genoma haploide, su fácil crecimiento y cultivo han permitido que sea utilizado como modelo tanto para estudios de fotosíntesis, en genética o en bioquímica y biología molecular (Salomé & Merchant, 2019).

Para seleccionar las poblaciones de *C. reinhardtii* resistentes, hemos realizado un análisis de fluctuación (descrito en el punto 5.1 de Material y Métodos). Para llevar a cabo el análisis de fluctuación y los estudios de morfometría y captura del Sm, se utilizó un clon de la especie *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (ChlA en adelante). En concreto, ChlA es una variedad salvaje aislada de unas muestras del Parque Nacional de Doñana (Andalucía, España) y que lleva creciendo durante más de 10 años en las mismas condiciones controladas de luz continua ($80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $\lambda=400\text{-}700 \text{ nm}$) y temperatura ($22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$). El cultivo de la cepa se realiza en cajas de cultivo celular con tapón venteado de 50 mL (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, NJ) con un volumen de 20 mL de medio. El medio utilizado es BG₁₁ preparado con agua bidestilada y partiendo de la solución comercial de BG₁₁50x (Sigma-Aldrich®, Chemie, Taufkirchen, Germany). Cada 20 días los cultivos son transferidos axénicamente en nuevo medio para mantener el crecimiento balanceado del cultivo.

2.2. Chlamydomonas reinhardtii: cepa ChlSG (Baselga-Cervera *et al.*, 2018;

Baselga-Cervera, García-Balboa, López-Rodas, *et al.*, 2019)

Para la captura de metales de los residuos metálicos en disolución, hemos utilizado dos cepas de microalgas diferentes. La primera de ellas, ChlSG, es también de la especie *Chlamydomonas reinhardtii*. Fue seleccionada y mejorada para la captura de uranio en el laboratorio, a partir de la especie recogida en una mina de uranio situada en Saelices (España). Es una cepa estudiada y patentada (cepa ChlSG (Baselga-Cervera *et al.*, 2018; Baselga-Cervera, García-Balboa, López-Rodas, *et al.*, 2019)). Se puede observar en la Figura 16 dos fotografías de esta cepa al microscopio óptico.

Para su cultivo y mantenimiento preparamos medio con agua ultrafiltrada de la mina de Saelices, enriquecida con caldo de cultivo estándar BG₁₁ (Sigma-Aldrich®) con un pH final de $3,6 \pm 0,2$ ($T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$). Las condiciones de cultivo están descritas en García-Balboa *et al.* 2013 (C. García-Balboa *et al.*, 2013) y son esencialmente las mismas que las descritas para ChlA en el apartado 2.1.

2.3. Euglena sp. (EugVP)

La otra cepa utilizada para la recuperación de metales del medio complejo obtenido de los residuos metálicos, es EugVP. Es un microalga del orden Euglenales, de la familia Euglenaceae, perteneciente al género *Euglena*, que fue aislada de otra mina de uranio situada en Villavieja (España). Los microorganismos englobados dentro de esta familia, son protistas capaces de vivir de forma autótrofa gracias a la presencia de cloroplastos, pero que en ausencia de luz pueden obtener energía de forma heterótrofa (J. I. Kim, Linton, & Shin, 2015; Marin, Palm, Klingberg, & Melkonian, 2003). En la figura 16, podemos observar fotografías de la cepa utilizada.

Las condiciones de cultivo son iguales que para las otras dos cepas de *Chlamydomonas*, utilizando el agua ultrafiltrada de la mina de Villavieja donde fue aislado este microorganismo, enriquecida con BG₁₁ comercial (Sigma-Aldrich®).

2.4. Consorcio bacteriano

El consorcio bacteriano utilizado en este trabajo, fue obtenido de unas muestras recogidas procedentes de una mina de uranio situada en la localidad de Villavieja, Salamanca (España) (Baselga-Cervera, García-Balboa, Díaz-Alejo, *et al.*, 2019; C. García-Balboa *et*

al., 2013). Para su obtención, inoculamos 10 mL de la muestra líquida procedente de la mina de Villavieja en 90 mL de medio 9K, un medio enriquecido para el crecimiento de bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes (Silverman' and Lundgren n.d.), a un pH = 3,05 (T= 20 °C). El consorcio obtenido se mantuvo por pases sucesivos en nuevo medio 9K. Una muestra del cultivo del consorcio bacteriano, se caracterizó mediante secuenciación del gen ARN ribosómico 16S. En resumen, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sedimento se suspendió en solución estabilizante, y se extrajo el ADN mediante ruptura mecánica con bolas de zirconita y posterior purificación en columna. Se amplificó el gen ARN16S con el kit 16S Barcoding kit (SQK-16S024) de Nanopore y se obtuvieron un mínimo de 2000 lecturas con la tecnología Oxford Nanopore, MinION FLO-MIN106. A partir de las lecturas, se obtuvieron las unidades taxonómicas operativas (OTU) mediante dos estrategias diferentes: Comparando en la base de datos Ribosomal Database Project de la Michigan State University, RDP con el programa USEARCH. El fichero.syntax obtenido se utilizó para calcular la proporción de cada OTU; y además se analizaron las lecturas de 16S con el software Epi2me de Oxford Nanopore.

2.5. Cepa Gp4p

Esta cepa microalgal fue la seleccionada de entre todas las que se probaron para el desarrollo del biosensor, incluido en el Capítulo 3 de esta memoria. Es una microalga de la especie *Scenedesmus obtusus*, del género *Scenedesmus*, familia Scenedesmaceae y clase Chlorophyceae. Crece formando colonias de 2 o 4 células. La cepa se encuentra depositada en el Banco Nacional de Algas (BNA) con nº de depósito BNA D32-09.

3. **Parámetros y características poblacionales**

Para caracterizar las distintas cepas de las especies *Chlamydomonas* y *Euglena*, se midieron y determinaron distintos parámetros como son: la *fitness* Malthusiana o la tasa de crecimiento y el coeficiente de selección.

3.1. La *fitness* Maltusiana (m) y la tasa de crecimiento:

La ***fitness*** o **eficacia biológica** es la capacidad de un organismo de reproducirse y está directamente relacionada con el legado genético que va a quedar en la siguiente generación (Michod, 1999). Refleja la probabilidad de que una población de organismos tenga éxito en la reproducción y el mantenimiento de ciertos caracteres (Sober, 1993).

Hemos estimado la *fitness* Malthusiana (m) en medios no selectivos y durante el crecimiento exponencial de nuestro organismos (Charlesworth, 1980). En concreto medimos la *fitness* Malthusiana de las cepas estudiadas en medio BG₁₁ utilizando la ecuación para cultivos en crecimiento exponencial de Crow y Kimura (1970):

$$N_t = N_0 e^{mt} \quad [\text{Ecuación 2}]$$

N_t = número de células a tiempo t

N_0 = número de células al inicio del experimento.

m = *fitness* Malthusiana

t = tiempo (días si no se indica lo contrario)

Para los cultivos de *Chlamydomonas* expuestos a Sm, el factor m se obtuvo tras medir el crecimiento por triplicado de las cepas resistentes obtenidas en el análisis de fluctuación y de la cepa ChlA, también en triplicados, nunca expuesta al Sm con anterioridad. Los cultivos crecieron en frascos greiner para cultivos celulares (Cellstar® Bio-one) con un volumen final de cultivo de 20 mL. El experimento se fundó con el mismo inóculo inicial de 10^7 células (N_0) en cada frasco y el crecimiento de los cultivos se monitorizó, contando el número de células con el contador de partículas Beckman Coulter Z2 Cell Counter en los días 4 y 8 (N_4 and N_8). Este método está basado en el principio Coulter que consiste en el paso de las partículas por un canal de un determinado diámetro donde circula una corriente eléctrica. Las partículas que entran inducen un cambio en la impedancia, lo que nos permite contar y conocer el número de partículas de un tamaño concreto, que se encuentran en un líquido conductor.

En el caso de las cepas extremotolerantes, los contajes de microorganismos para calcular las densidades de población de los cultivos, se realizaron por dos métodos distintos. En los cultivos de ChlSG los realizamos con el Coulter-counter, pero por la irregularidad intrínseca de las especies *Euglena sp.*, para los cultivos de EugVP, los contajes los realizamos con microscopio óptico en las cámaras graduadas FAST-READ® 102 (Biosigma®, Santa Cruz de Tenerife, Spain).

3.2. Coeficiente de selección

El concepto de ***fitness relativa*** permite comparar diferentes genotipos de una población. En condiciones concretas puede ser que unos genotipos estén siendo favorecidos frente a otros. Podemos medir la variación proporcional de la presencia de un genotipo respecto a una población control y calcular la presión selectiva para ese genotipo gracias al **coeficiente de selección** (s). En condiciones no selectivas, sólo BG₁₁ sin Sm, obtuvimos las tasas de crecimiento m^r para las cepas resistentes y la tasa de crecimiento para las células sensibles m^s y empleando la ecuación de Ayala y Kiger (Ayala & Kiger, 1980) calculamos el coeficiente de selección:

$$s_i = 1 - (m^r/m^s) \quad [\text{Ecuación 3}]$$

s_i = coeficiente de selección para la cepa i

m^r = tasa de crecimiento de la cepa resistente

m^s = tasa de crecimiento para cepa sensible

El coeficiente de selección se calculó sólo para el modelo básico con Sm, para las cepas resistentes a Sm obtenidas en el análisis de fluctuación. Para calcularlo, para cada cepa resistente utilizamos las medias de tres replicados y la *fitness* Malthusiana de cada cepa resistente (m^r) y la *fitness* Malthusiana de la cepa ChlA (m^s) utilizada como cepa control.

4. Estudios de toxicidad del Sm

Para establecer las dosis letales de selección de Sm y poder realizar el análisis de fluctuación realizamos un estudio previo de toxicidad de nuestra cepa ChlA al Sm. Para ello, se expuso la misma concentración de células (10^5 células·mL⁻¹) a diferentes concentraciones de Sm en medio BG₁₁ y se tomaron medidas a diferentes tiempos de exposición según cada parámetro.

Medimos el efecto de la toxicidad de los medios elaborados con Sm con dos parámetros diferentes: la inhibición del crecimiento celular y el efecto sobre el fotosistema II (PSII) de *C. reinhardtii*. Ambos parámetros se probaron sobre la misma serie de soluciones con diferentes concentraciones de Sm: $2 \cdot 10^{-7}$; $6,65 \cdot 10^{-7}$; $2 \cdot 10^{-6}$; $6,65 \cdot 10^{-6}$; $2 \cdot 10^{-5}$; $6,65 \cdot 10^{-5}$ M y a un pH~3.

4.1. Inhibición de crecimiento celular

La inhibición del crecimiento celular producida por la presencia de Sm se midió exponiendo a las concentraciones antes mencionadas de Sm, la cepa inicial ChlA y dejándola crecer en fase exponencial. Para cada concentración se fundaron tres replicados donde fueron contadas las concentraciones celulares en el Beckman Coulter Z2 Cell Counter (Beckman Coulter® Inc. Particle Characterization Group, Florida) a tres tiempos distintos: 0, 4 y 7 días.

$$Inh(\%) = [(N^{\circ} \text{ células Control} - N^{\circ} \text{ células dosis}_x) / N^{\circ} \text{ células Control}] \times 100\%$$

[Ecuación 4]

4.2. El efecto sobre el PSII

Puesto que el fotosistema II de las chlorophytas es un indicador de la salud de las microalgas y de si están sometidas a algún factor de estrés, además de los análisis de inhibición de crecimiento, medimos el rendimiento del PSII. Para ello utilizamos el fluorímetro ToxY-PAM, un medidor del rendimiento o *Yield* fotosintético, de doble canal (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany) que nos permite obtener el valor del rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (YII) de las poblaciones analizadas. Este método consiste en exponer el fotosistema de las poblaciones que puedan estar afectadas frente a un control, a un pulso de luz saturado (Genty, Briantais, & Baker, 1989; Schreiber, Schliwa, & Bilger, 1986). De este modo podemos identificar si existe alguna sustancia en el medio que afecte al flujo electrónico fotosintético.

Para calcular el porcentaje de inhibición utilizamos la siguiente ecuación:

$$Inh(\%) = [(Y(II)_{control} - Y(II)_{muestra}) / Y(II)_{control}] \times 100\% \quad [\text{Ecuación 5}]$$

$Y(II)_{muestra}$ = *Yield* cuántico efectivo del fotosistema II para cada tiempo de exposición al Sm

$Y(II)_{control}$ = *Yield* cuántico efectivo del fotosistema de las poblaciones control

Las mediciones de este parámetro en nuestros cultivos se realizaron en los siguientes tiempos: 0 h, 2 h, 24 h y 48 h.

5. Experimentos de selección de microorganismos

Hemos realizado dos tipos de experimentos de selección distintos: uno para obtener resistentes al Sm, Análisis de Fluctuación, y un segundo para mejorar la capacidad de captura del Sm, Selección por caída. Se describen a continuación.

5.1. Análisis de fluctuación

Para replicar el análisis de fluctuación de Luria y Delbrück (Luria & Delbrück, 1943), hemos utilizado la adaptación de López-Rodas *et al.* (Victoria López-Rodas *et al.*, 2001) que nos permite trabajar con microalgas en medio líquido y hemos querido aprovecharlo para obtener en el laboratorio una colección de cepas resistentes (Baos *et al.*, 2002b; Victoria López-Rodas *et al.*, 2001; Marvá *et al.*, 2010). El análisis de fluctuación de Luria y Delbrück (Luria & Delbrück, 1943) demostró que en las poblaciones clónicas de bacterias, antes de ser expuestas al bacteriófago α , surgían aleatoriamente mutaciones que permitían a estas bacterias sobrevivir al virus. Con el desarrollo teórico que elaboraron, explicaron que las diferencias que encontraban en el número de descendientes resistentes en las diferentes poblaciones de clones se debía al tiempo de aparición de esa mutación. En nuestro caso, el agente selectivo utilizado con las poblaciones de *C. reinhardtii* fue el medio con Sm y pH ácido ($\text{pH} \approx 3$). Para ello obtuvimos un cultivo parental de *C. reinhardtii* (ChlA) desde una población clonal aislada por diluciones sucesivas y crecida durante 7 días en un greiner en 100 mL de BG₁₁. Como se muestra en la Figura 6, en el tiempo 0 (t_0), fundamos el set 1 con 100 tubos inoculando 10^2 células (N_0) desde el cultivo parental y obteniendo un volumen final de 10 mL con BG₁₁. En cada tubo, las células crecieron en poblaciones separadas hasta alcanzar a los 9 días (N_t) una media de 10^5 células ($1,63 \cdot 10^5 (\pm 1,49 \cdot 10^5)$). En este momento (t_9), resuspendimos las células de cada tubo y añadimos a cada uno de ellos la cantidad de Sm necesaria ($1,33 \cdot 10^{-4}$ M) para alcanzar la dosis tóxica decidida tras el ensayo de toxicidad y el $\text{pH} \approx 3$. En este mismo momento fundamos también el set control (set 2) inoculando 50 tubos con 10^5 células del mismo cultivo parental usado para el set 1 y con la misma concentración tóxica de Sm. El volumen final en los 150 tubos que componían el experimento era de 12 mL y todos se mantuvieron en las mismas condiciones de luz y temperatura durante 120 días de crecimiento. Para cada tubo determinamos el número de partículas que contenía en el Beckman Coulter Z2 Cell Counter. Gracias al set 2, podemos calcular la varianza y calcular si hay diferencias significativas con los contajes del set 1. Para ello realizamos

un z-test de una cola, con la hipótesis de no encontrar diferencias entre los sets y con un rango de confianza $\alpha = 0,01$.

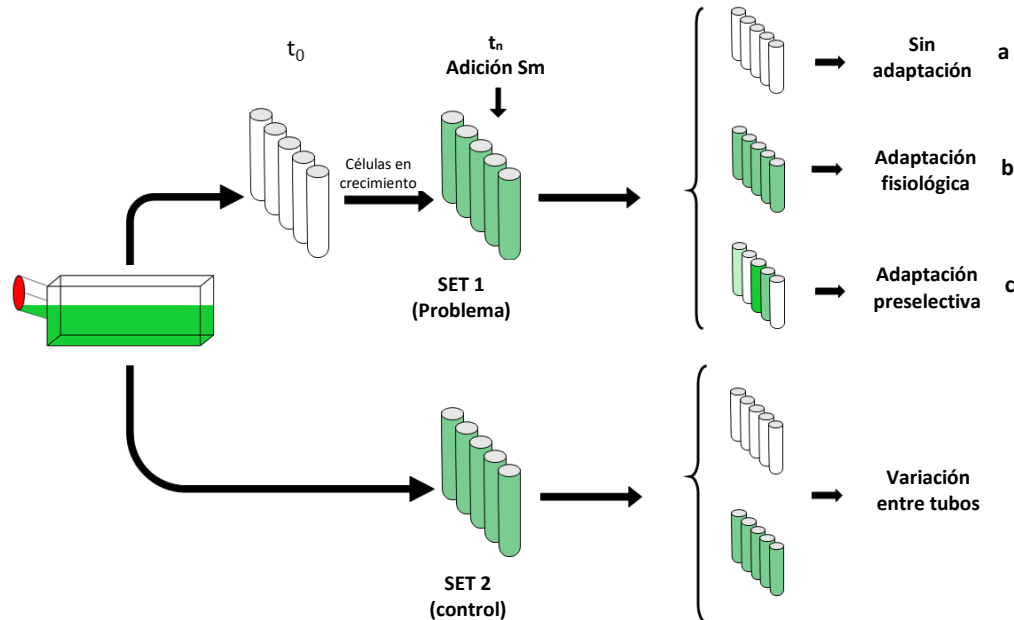


Figura 6. (Modificada de Martínez-Alesón García *et al.* 2021) Esquema del análisis de fluctuación llevado a cabo y los posibles resultados esperados. Existen tres posibles escenarios: a. Que no exista adaptación: en ningún tubo al final del experimento encontraremos células vivas; b. Adaptación fisiológica: las células se adaptarán al nuevo medio gracias a la exposición a ese tóxico y por lo tanto deberíamos encontrar un número similar de células en todos los tubos; c. Adaptación preselectiva: encontraremos tubos con células vivas, pero con diferentes concentraciones celulares.

Además, gracias al trabajo de Luria y Delbrück (Luria & Delbrück, 1943) podemos calcular la probabilidad de aparición de esa mutación calculando la tasa de mutación (μ).

$$P_0 = e - \mu (N_t - N_0) \text{ [Ecuación 6]}$$

N_0 = población inicial (10^2 células)

N_t = población final antes de exponer al tóxico (10^5 células)

P_0 = proporción de tubos con células no resistentes al final del experimento

μ = tasa de mutación

Para determinarla se comprobó la presencia de células vivas en los tubos poniendo una alícuota de cada uno en una cámara de conteo FAST-READ® 102 (Biosigma®, Santa

Cruz de Tenerife, Spain) y se observó con un microscopio con contraste de fases (Zeiss West Germany).

5.2. Mejora de la captura: Selección por caída

Una vez obtenidos los cultivos de *C. reinhardtii* resistentes al Sm quisimos estudiar si podíamos aumentar su capacidad de captura de Sm. Para ello preparamos un cultivo mezcla con partes iguales de todos los resistentes obtenidos en el análisis de fluctuación y que llamamos CSm0. Dejamos crecer este cultivo en presencia de Sm ($2,66 \cdot 10^{-5}$ M) durante 15 días y realizamos un experimento de selección por caída, asumiendo que se depositarían antes en el fondo de una bureta aquellas células que más Sm hubieran capturado.

5.2.1. Aproximación teórica:

Cómo el fitoplancton se hunde, ha sido objeto de estudio en diversos trabajos y son diversos autores los que han utilizado la ley de Stokes como modelo para explicarlo (Bannon & Campbell, 2017; Durante, Basset, Stanca, & Roselli, 2019; Gemmell, Oh, Buskey, & Villareal, 2016; Waite, Fisher, Thompson, & Harrison, 1997). Hemos considerado que las células de *Chlamydomonas* tenían forma esférica, por lo que utilizamos la siguiente ecuación de Stokes:

$$\psi = \frac{2gr^2(\rho_p - \rho_{BG})}{9\eta\phi} \quad [\text{Ecuación 7}]$$

ψ = velocidad de caída de la partícula ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

g = fuerza de la gravedad ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-2}$) [$9,8 \text{ m s}^{-2}$]

r = radio de la esfera (cm)

ρ_p = densidad de la célula ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

ρ_{BG} = densidad del medio BG₁₁ ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

ϕ = factor de resistencia

η = viscosidad dinámica del líquido ($\text{g} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

Para este experimento propuesto, asumimos que todas las células utilizadas, pertenecientes a la misma cepa, poseen la misma forma (ϕ). Además, al ser depositadas de la misma forma y en el mismo medio, la fuerza de la gravedad (g), la densidad del medio (ρ_{BG}) y la viscosidad dinámica del medio líquido (η) asumimos también que van a

ser constantes para todas las células que caerán por la misma bureta. Por lo tanto, planteamos que las principales diferencias entre las células que caigan antes y las que queden suspendidas o tarden más en caer, estarán en el radio de la célula (r) o en la densidad de la célula (ρ_p).

Recogiendo las células que primero caen, esperamos seleccionar las células que más Sm hayan capturado aumentando su densidad, que podrían coincidir a su vez con las células que menor radio tengan, pero que al ser esféricas corresponderían a una mayor superficie proporcional de la pared.

5.2.2. Desarrollo práctico:

Tras los 15 días en los que el cultivo de CSm0 estuvo creciendo en presencia de Sm, el cultivo fue sometido a un tratamiento de 2 h de oscuridad (Waite et al., 1997). Tras este tiempo, se depositó un inóculo de 10^5 células en lo alto de una bureta de cristal (60 cm largo x 11cm diámetro) llena con medio BG₁₁ sin Sm. Las buretas se encontraban envueltas de forma que únicamente se permitía el paso de luz ($7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) por la parte superior. Las células se depositaron sin generar turbulencias y debido al pretratamiento de oscuridad, la mayoría permanecieron en lo alto por el tropismo lumínico. Podemos observar un esquema del proceso en la figura 7.

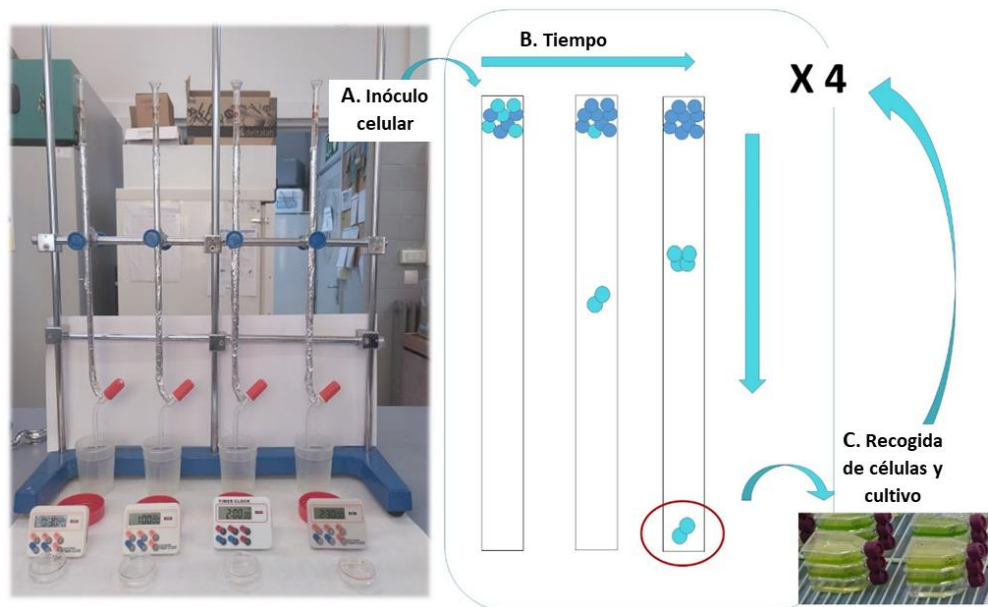


Figura 7. Esquema del proceso para seleccionar las células de resistentes al Sm que más Sm han capturado. A. En la parte superior de la bureta se colocó el inóculo con las

microalgas. B. Esperamos cierto periodo de tiempo. C. Las células que primero cayeron fueron recogidas y se fundó un nuevo cultivo con ellas. (Foto de Congreso World Microbe Forum 2021)

Cada 30 minutos, una alícuota de 0,2 mL era recogida del final de la bureta y observada al microscopio para comprobar la llegada de las células. Cuando al menos 20 células fueron contadas, se extrajo 1 mL de la bureta que se inoculó en un nuevo greiner de 20 mL, fundándose la población CSm1. Esta nueva población se dejó crecer de nuevo en medio con Sm terminando un ciclo de la selección artificial. Se llevaron a cabo 4 ciclos sucesivos, obteniendo las poblaciones CSm1, CSm2, CSm3 y CSm4.

6. Estudios de medidas morfométricas: área, perímetro, eje mayor (*D*) y eje menor (*d*)

Para realizar estudios comparativos entre las cepas, realizamos medidas morfométricas de las distintas cepas seleccionadas. La estimación de las medidas estéricas y morfológicas de los microorganismos, en especial del fitoplancton, ha sido objeto de estudio de diversos trabajos (Baselga-Cervera et al., 2016; E. Costas, Fernández, Piqueras, & Valera, 1988; E Costas, González-Gil, Aguilera, & López-Rodas, 1992; Rico, Altamirano, López-Rodas, & Costas, 2006). Para llevar a cabo las medidas, las células de cada cepa fueron fotografiadas con una cámara AxioCam MRc (Zeiss) acoplada a un microscopio óptico Zeiss West Germany. En el momento de realizar los fotogramas, los cultivos se encontraban en crecimiento asincrónico para asegurar una equidad en la mezcla de formas celulares presentes en el ciclo de vida de *Chlamydomonas sp.* en las distintas cepas. Para realizar las fotos se colocaron distintas alícuotas de cada cultivo en varias cámaras de recuento comercial (FAST-READ® 102 counter chamber (Biosigma®)). Todas las imágenes fueron procesadas y analizadas de la misma forma, gracias al software de libre acceso ImageJ 1.52u free software (“ImageJ,” n.d.). En primer lugar, fueron transformados a una escala de grises con el formato 8-bit y con el modo *make binary*. Las rectas de la rejilla de la cámara de contaje sirvieron como distancia conocida como patrón para realizar las medidas (distancia conocida de 0,25 mm). Todas las partículas en los límites de la cuadrícula o superpuestas con otras células fueron descartadas. En total, para cada partícula analizada obtuvimos cuatro parámetros: área,

perímetro, eje mayor (D) y eje menor (d). Con estos valores obtenidos calculamos además dos estimadores de asimetría, el coeficiente de forma de diámetros (CFd) y el coeficiente de forma circular (CFc) (Renau-Piqueras, Gómez-Perretta, Guerri, & Sanchis, 1985):

$$CFd = d/D \quad [\text{Ecuación 8}]$$

d =diámetro menor medido de las células.

D = Diámetro mayor medido de las células.

$$CFc = (4\pi A)/P^2 \quad [\text{Ecuación 9}]$$

A = área medida de las células.

P = perímetro medido de las células.

7. Experimentos de biolixiviación

El residuo metálico cedido por la empresa Lyrsa, descrito en el apartado 1.2. de Material y Métodos, es un sólido. Para favorecer el crecimiento de los cultivos de microalgas en presencia de metales y aumentar la superficie de captura, disolvimos los metales que se encontraban en fase sólida. De esta forma logramos dos objetivos: reducir la concentración de metales en los sólidos y obtener un medio de cultivo líquido al que exponer las microalgas. Utilizamos un proceso de biolixiviación con un consorcio bacteriano aislado de muestras contaminadas con altas concentraciones de metales, descrito en el apartado 2.4. de Material y Métodos.

Lo llevamos a cabo en frascos Erlenmeyer de 250 mL con un volumen final de 100 mL de medio 9K (pH 2,05) sin añadir ninguna fuente de energía extra (ni Fe ni S) y con un 1 % (w/v) de residuos. Dos de los frascos, fueron inoculados con 20 mL de cultivo saturado del consorcio bacteriano y dos frascos se mantuvieron como control. Todos ellos se mantuvieron en agitación (250 rpm) y en oscuridad a una temperatura de 30 °C durante 15 días. Se recogieron los volúmenes completos de los frascos en dos tiempos diferentes: los días 7 y 15. Las muestras fueron filtradas con un filtro estéril de 0,45 micras para separar la fase sólida de la líquida. La fase líquida obtenida con el lixiviado fue analizada para conocer la concentración de 39 elementos distintos y guardada para utilizar en la siguiente fase de captura con microalgas. La fase sólida también fue guardada para analizar la composición respecto del material de partida.

La eficacia de lixiviación de las bacterias (L_i) se calculó para cada elemento con la ecuación:

$$L_i = (C_{ie} * V) / m \text{ [Ecuación 10]}$$

Según la cual:

L_i = eficacia de lixiviación para cada elemento i (mg/g)

C_{ie} = concentración del elemento i en el lixiviado a un tiempo e (mg/L)

m = masa del material (g)

V = volumen final de la solución de lixiviado (L)

Para cada elemento, además se calculó el rendimiento de extracción (E_i) dependiendo la habilidad de lixiviación de la concentración inicial de ese metal en el material de partida, y calculándolo según la siguiente ecuación:

$$E_i (\%) = (L_i / C_{in}) * 100 \text{ [Ecuación 11]}$$

Donde:

E_i = rendimiento de extracción del elemento i (%)

L_i = eficacia de lixiviación para cada elemento i (mg/g)

C_{in} = la concentración del elemento i en el material (mg/g).

8. Experimentos de captura

Los experimentos de captura consistieron en exponer las poblaciones de microalgas estudiadas a unas concentraciones conocidas de Sm o a una solución compleja que contenía una mezcla de varios metales, en las que han crecido cierto periodo de tiempo determinado en cada caso. Según el inóculo inicial y el volumen de los cultivos, el tiempo de exposición era mayor o menor, recogién dose ya cerca del inicio de la fase estacionaria del cultivo.

En los estudios realizados con las cepas resistentes al Sm, tras ese periodo, determinamos el número de células de los cultivos y los cultivos se centrifugaban a 2000 g durante 3 min. Recogimos el sobrenadante para su posterior análisis y se pesó la biomasa obtenida. En el caso de los estudios con Sm, quisimos medir también si el Sm capturado había sido en parte internalizado por las microalgas, por lo que en algunos de los replicados se realizaron lavados de los pellets con 5 mL de una solución 0,005 % de EDTA en BG₁₁ durante 15 min (Panak *et al.*, 2000; Baselga-Cervera *et al.*, 2018). Tras este lavado se volvió a centrifugar, guardando de nuevo el sobrenadante y el pellet para su posterior análisis. Podemos observar un esquema del procedimiento completo en la Figura 8.

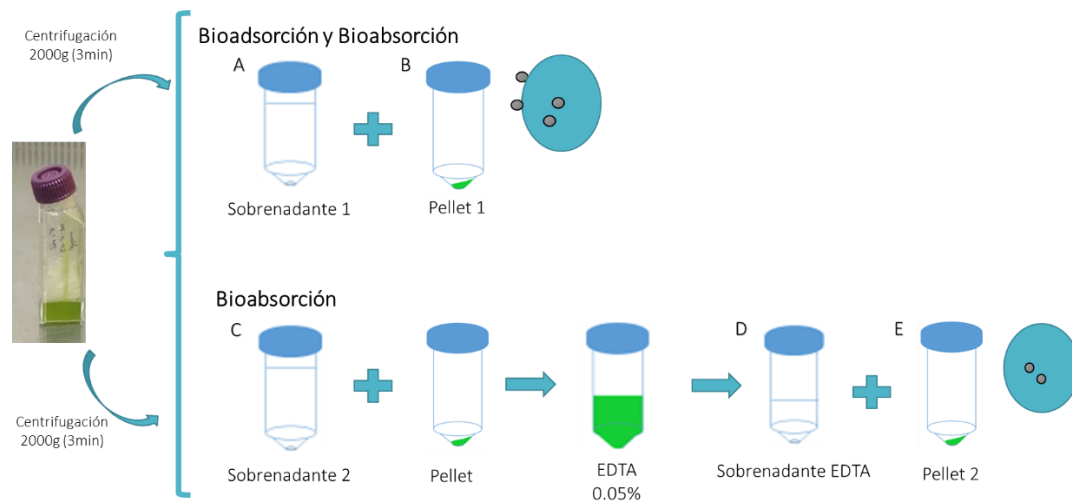


Figura 8. Esquema del proceso para la determinación de la captura de Sm. Por un lado, la total, tanto el Sm adsorbido en la pared, como el absorbido en el interior celular y por otro lado sólo la bioadsorción, medida tras un proceso de lavado con EDTA para eliminar el Sm adherido a la pared celular.

Para determinar la captura con los residuos metálicos, el procedimiento general fue el mismo que el explicado para el estudio de la captura con Sm, sólo que el medio de exposición de las microalgas se preparó con el lixiviado obtenido gracias al consorcio bacteriano. Ambas cepas, ChlSP y EugVP crecieron durante 20 días, hasta alcanzar la fase estacionaria. Doce greiners con un volumen final de 10 mL fueron fundados, cuatro para *Chlamydomonas*, cuatro para *Euglena* y cuatro sin células como control químico. Cada caja de cultivo contenía 9 mL de lixiviado obtenido a los 15 días de exposición con las bacterias (filtrado y con un pH = 3,55) y 1 mL de cultivo celular. El inóculo inicial para la cepa ChlSG fue de $\sim 3,5 \pm 1,1 \times 10^5$ células y para la cepa EugVP $\sim 2,1 \pm 0,5 \times 10^3$ células. Para cada uno de los grupos experimentales (*Chlamydomonas* sp., *Euglena* sp. y los controles), todo el volumen de los frascos fue recogido en cuatro tiempos distintos: 0, 6, 144 y 288 horas.

En todas las muestras se comprobó la viabilidad de las células con contraste de fases en el microscopio óptico invertido (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen, Germany) y se calculó la densidad celular contando las células en un hemocitómetro (FAST-READ®102 Biosigma®, Santa Cruz de Tenerife, Spain). El resto del volumen de cada muestra fue centrifugado (4000 rpm durante 15 minutos), guardando los pellets para el posterior

análisis de concentración de metales. No realizamos los lavados con EDTA, en este caso sólo nos interesaba la captura total que es el total de metales que podremos concentrar.

9. Métodos analíticos

Los análisis químicos para determinar la presencia de metales se realizaron en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de técnicas geológicas de la UCM.

9.1. Determinación de samario

La determinación de Sm en las muestras de los medios, los sobrenadantes, las soluciones de lavado con EDTA y los diferentes pellets, se realizó con Espectrometría de Masas - Plasma inductivamente acoplado (ICP-MS, Bruker Aurora Elite). En las muestras líquidas, tras un proceso de acidificación, se determinaron las concentraciones totales de Sm. En el caso de las muestras con pellets, antes de determinar la concentración total de Sm, con las muestras se realizó una digestión ácida con una solución de 65 % HNO_3 y 30 % de H_2O_2 (Suprapure, Sigma-Aldrich) en una ratio 4:1 v/v y se secaron a 100 °C en vasos de digestión de Parr (Moline, USA) durante 12 h.

9.2. Determinación de metales

Las determinaciones de la composición de metales de los residuos electrónicos se realizaron también en el CAI de ciencias geológicas de la UCM. Se analizaron para las diferentes fases del proceso (biolixiviación y biocaptura). Los análisis de las muestras sólidas necesitaron una digestión previa a 220 °C, en una solución de agua regia (3 HCl: 1 HNO_3), realizada en presencia de microondas y alta presión. Los análisis se realizaron con un espectrómetro de emisión óptica acoplado a plasma (ICP-OES, Arcos).

Las muestras líquidas se acidificaron con HNO_3 antes del análisis. Las concentraciones de metales se midieron igual que para el Sm en un ICP-MS. Para los pellets con contenido celular, se realizaron digestiones en medio ácido (0,2 ml de HNO_3 65 % suprapur) durante 24 h a 40 °C en botes de Teflon Savillex. Los análisis se realizaron también con el ICP-MS.

10. Microscopía electrónica

Para observar las células realizamos también distintas preparaciones con microscopía electrónica y determinamos la presencia de Sm en las preparaciones pertinentes.

10.1. Microscopía electrónica de transmisión:

Para el cultivo seleccionado por caída CSm4 se comprobó la presencia de Sm y se analizaron las cepas con microscopía electrónica de transmisión (MET). Para ello, realizamos lavados del pellet con medio sin Sm concentrando las células de los cultivos mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 min y resuspendiendo suavemente en medio sin Sm. Fijamos la muestra en frío (4 °C) con glutaraldehído al 2,5 % durante 1 h. Centrifugamos (2500 rpm durante 10 min) y añadimos el cacodilato sódico 1 M y 0,5 mg·L⁻¹ de sacarosa para conservar la osmolaridad durante la fijación y esperamos durante 30 min más. En la muestra postfijada la teñimos con tetra-óxido de osmio al 1 % durante 1 h a 4 °C en oscuridad. Lavamos con suero Ringer 3 veces y comenzamos el proceso de deshidratación con soluciones de Ringer y etanol en proporciones ascendentes de etanol. Una vez alcanzado el 100 % de etanol, comenzamos con las soluciones ascendentes de etanol : acetona y una vez alcanzado el 100 % de acetona repetimos el procedimiento para realizar la infiltración en resina Spurr con mezclas acetona: resina Spurr hasta alcanzar el 100 % de resina Spurr. La polimerización de la resina se realizó en el ICTS-Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la UCM, en una estufa a 65 - 70 °C durante 48 h. Los bloques polimerizados se cortaron y colocaron en rejillas de cobre. Las imágenes de las células fueron obtenidas en el microscopio JEOL-JEM 1400 (Jeol Ltd., Tokyo, Japón). Este microscopio se encuentra equipado con espectroscopia de rayos X por dispersión, que permite la realización de microanálisis de elementos con una resolución de 127eV.

10.2. Microscopía electrónica de barrido

Las fotos de microscopía electrónica obtenidas para observar la morfología de *Euglena*, se realizaron con microscopía electrónica de barrido (SEM) en el CAI de Microscopía Electrónica de la UCM. Las células de EugVP se separaron del medio por centrifugación. La fijación se realizó con paraformaldehído (4 %) y glutaraldehído (2,5 %) al mismo pH de cultivo de las células (pH~3) durante 1 h a 4 °C. Las muestras postfijadas se lavaron dos veces con agua bidestilada y deshidrataron con sucesivas disoluciones crecientes de

agua y etanol hasta el 70 %. Los pasos sucesivos, del 70 % al 100 % y el punto crítico se realizaron al día siguiente en las instalaciones del CAI, donde además se cubrió las muestras con una película de oro para su observación en el microscopio SEM6400.

11. Desarrollo de biosensor y la recta de calibrado

Un biosensor es un dispositivo analítico que transforma procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas que permiten la medición de parámetros biológicos o químicos. Suelen estar constituidos por un receptor biológicos que detecta una sustancia y un transductor que interpreta la reacción de ese reconocimiento biológico y la traduce en una señal cuantificable. La utilización de microalgas como biosensores ya ha sido propuesta para el caso de los metales, como por ejemplo para la contaminación del Cr (Sanchez-Fortún et al., 2009).

El HTF es un fluido térmico se encontraba compuesto principalmente por difenilo y éter difenílico, dos compuestos derivados del benceno. Para el desarrollo de este trabajo hemos aprovechado la fluorescencia que las microalgas son capaces de emitir por contener clorofila como pigmento fotosintético. Igual que se explica en el apartado 4.2 de Material y Métodos, los compuestos que resulten tóxicos pueden afectar el funcionamiento del PSII de estos microorganismos interfiriendo en la emisión de esta fluorescencia.

Tras la realización de varias curvas de dosis-efecto, hemos seleccionado una clorofita lo suficientemente sensible a este compuesto, como para observar modificaciones cuando este compuesto aumenta su presencia. Con la cepa Gp4p (descrita en el apartado de 2 de Material y Métodos) se realizó una recta de calibrado, estudiando cómo inhibían las sucesivas concentraciones de HTF, la fluorescencia emitida tras un pulso de iluminación estándar.

12. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con los softwares GraphPad Prism 8.4.2 para Windows (GraphPad Prims, n.d.) y el software estadístico R (R Core Team, 2019).

Las diferencias entre las *fitness* de las cepas obtenidas y los controles se realizaron con análisis paramétricos, one-way ANOVA y Tukey HSD post-hoc.

Para comparar los crecimientos en los medios con Sm y sin Sm de los clones obtenidos en la selección por caída utilizamos un test ANOVA de doble vía.

Para los estudios comparativos de morfometría, los datos se compararon con el test Kruskal-Wallis con un test de Wilcox post-hoc.

Para analizar las diferencias entre las cepas en cuanto a las tasas de crecimiento, se realizó un test no paramétrico de dos colas y comparación múltiple (Kruskall-Wallis test). Las correcciones del test múltiple se realizaron con el test de Dunn. Se estableció un valor de $\alpha = 0,05$ para confirmar si existían diferencias o no. Los valores están expresados en medias y desviación estándar (DS).

Para el experimento de captura de Sm de las cepas seleccionadas con el análisis de fluctuación, se estudiaron las correlaciones entre los parámetros seleccionados con el test no paramétrico de Spearman. Para las correlaciones entre las cepas obtenidas de la selección por caída utilizamos el test de Pearson. En todos los casos se estableció un valor de $p < 0,05$.

VII. RESULTADOS:

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them.”

William Lawrence Bragg

“La verdad no cambia porque sea o no sea creída por la mayoría de las personas”

Hipatia de Alejandría

CAPÍTULO I: Adaptación y selección de microalgas resistentes para aplicaciones biotecnológicas.

El trabajo de adaptación y selección de poblaciones de *C. reinhardtii* con el objetivo de obtener cepas resistentes y estudiar su captura de Sm. Para ello realizamos un estudio de la toxicidad del Sm para la cepa ChlA y a continuación se llevó a cabo el análisis de fluctuación. Tras el estudio de la adaptación genotípica de *C. reinhardtii* a altas concentraciones de Sm, analizamos los fenotipos obtenidos. Además, estudiamos la capacidad para capturar este metal de cuatro fenotipos distintos. Los resultados han sido publicados en la revista *Ecotoxicology and Environmental Safety* y presentados en un congreso:

- Martínez-Alesón García P, García-Balboa C, Romero-López J, López-Rodas V, Costas E, Baselga-Cervera B. Fluctuation analysis to select for Samarium bio-uptaking microalgae clones the repurposing of a classical evolution experiment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Jun 1;215:112134. (**Anexo 3**)
- P. Martínez-Alesón García, C. García-Balboa, H. M. Díaz-Alejo, V. López-Rodas, E. Costas & B. Baselga-Cervera Comunicación oral: “Análisis de fluctuación para la obtención de poblaciones de microalgas que capturen samario” en la VI Jornadas de Investigación en doctorado – PhDay Complutense (VETINDOC) (14 Oct 2020)

(El conjunto de resultados que obtuvimos se pueden consultar al completo en el artículo adjunto en el Anexo 3).

Respecto al estudio de la toxicidad de los medios preparados con Sm, a dosis bajas de $2 \cdot 10^{-7}$ M y de $6,65 \cdot 10^{-7}$ M el crecimiento celular se recuperaba, e incluso aumentaba un 11 %. Sin embargo, para las dosis más altas ($2 \cdot 10^{-5}$ M y $6,65 \cdot 10^{-5}$ M) sí que se mantiene el daño observado con el análisis de la inhibición del fotosistema II, y a los 7 días de crecimiento, la inhibición del crecimiento es superior al 80 %. Podemos observar todos los datos en el anexo 3 y 4.

Para asegurarnos la letalidad, duplicamos el valor de la mayor dosis de Sm probada, exponiendo a nuestros dos sets de células a $1,33 \cdot 10^{-4}$ M de Sm. En el análisis de fluctuación obtuvimos 13 tubos con células resistentes a altas concentraciones de Sm y pH ácido. Encontramos que sí existían estas diferencias con una $z = 10,14$ y $p < 0,0001$. Los resultados del análisis de fluctuación los observamos resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados resumidos del análisis de fluctuación realizado con *C. reinhardtii* y la solución de Sm. Datos publicados en el trabajo Martínez-Alesón García *et al.* 2021. (Martínez-Alesón García *et al.*, 2021)

<i>C. Reinhardtii</i> + Sm	Set1	Set2
Nº de cultivos replicados	99	50
0	86	0
$15 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^5$ céls	2	49
$1 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$ céls	6	1
$> 5 \cdot 10^6$ céls	5	0
Media	$4,87 \cdot 10^5$	$2,32 \cdot 10^4$
Varianza	$1,56 \cdot 10^6$	$2,32 \cdot 10^4$
CV (Varianza/Media)	3,20	1,39
Z-Test de una cola	10,14 **** (0,0001)	
Fluctuación	Sí	
Tasa de mutación (μ)	$8.65 \cdot 10^{-7}$	

Los fenotipos de las trece cepas obtenidas en el análisis de fluctuación fueron estudiados, obteniendo sus tasas de crecimiento, que podemos observar en la Tabla 3 y los perfiles morfométricos resumidos en la Figura 9. De estas cepas seleccionamos 3 para los análisis

de captura de Sm: SmR9, SmR17 y Sm59. Tanto SmR9 como SmR17 presentaron un aumento de más del 50% respecto de la cepa ChlA en todos los parámetros medidos y SmR9 poseía el mayor eje d y la mayor *fitness*. SmR17 es la que mayor área poseía y SmR59 fue seleccionada de entre el resto de cepas como representante de los valores intermedios en casi todos los parámetros menos en el CFd, lo que implica asimetría celular.

Tabla 3. Coeficientes de selección de las cepas calculado a partir del *fitness* de las cepas a las 168 h en medio BG₁₁ sin Sm añadido.

Cepas	m ₂ (168 h)	w	s
control	0,438	-	-
SmR1	0,457	1,042	-0,042
SmR5	0,460	1,050	-0,050
SmR9	0,469	1,071	-0,071
SmR13	0,461	1,052	-0,052
SmR17	0,456	1,041	-0,041
SmR27	0,459	1,047	-0,047
SmR51	0,459	1,048	-0,048
SmR52	0,463	1,057	-0,057
SmR55	0,471	1,074	-0,074
SmR57	0,462	1,055	-0,055
SmR59	0,457	1,043	-0,043
SmR63	0,462	1,054	-0,054
SmR77	0,462	1,055	-0,054

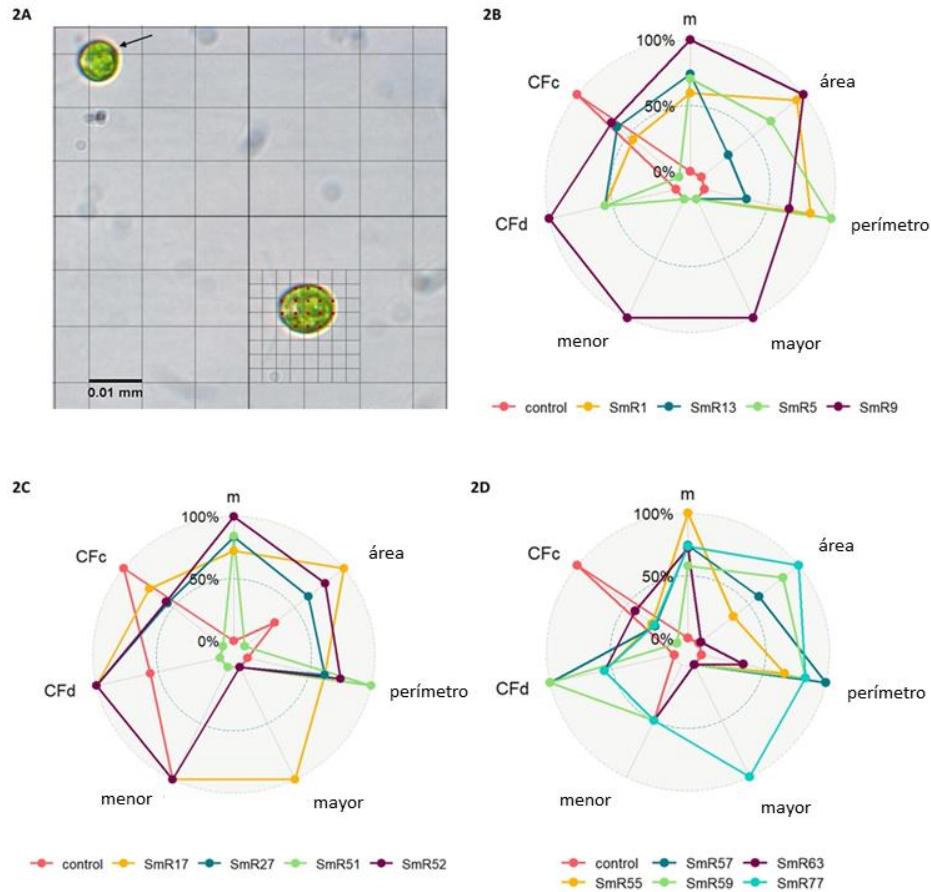


Figura 9. Modificada a partir de Martínez-Alesón *et al.* 2021. En ella observamos los perfiles morfométricos de las 13 cepas resistentes obtenidas y comparados entre ellos, teniendo como referencia la cepa control ChIA.

Los experimentos de captura indicaron que la cepa SmR17 capturó la mayor cantidad de Sm, $46,64 \mu\text{g} \cdot \text{Sm} \cdot \text{g}^{-1}$ de (WB) y $3,26 \cdot 10^{-7}$ ng Sm por célula, como podemos observar en la Tabla 4. Nuestros datos muestran que la cepa control, que no había sido expuesta con anterioridad al Sm capturó más de este elemento por célula que las otras dos cepas resistentes estudiadas SmR59 y SmR9. Con estas tres cepas estudiadas buscamos también si existía una relación entre alguno de los parámetros fenotípicos y la captura de Sm, y como observamos en la Figura 10, encontramos una correlación positiva de 0,52 entre la captura de Sm y el diámetro mayor y una correlación negativa, de -0,56 con el CFd y de -0,55 con el número de células.

Tabla 4: Datos del experimento de Captura de Sm de las tres cepas resistentes estudiadas y la cepa control.

Muestra	ng Totales de Sm Pellet	ng Totales de Sm EDTA Pellet	$\mu\text{g Sm} \cdot \text{g de WB} \pm \text{SD}$	ng de Sm $\cdot$ célula	Nº total de células
Control	11 $\pm$ 1	8,4 $\pm$ 0,8	28,89 $\pm$ 2,63	2,68 $\cdot$ 10 ⁻⁷	41,12 $\pm$ 0,57 $\cdot$ (10 ⁶)
SmR9	7,7 $\pm$ 0,8	5 $\pm$ 0,5	14,82 $\pm$ 1,54	1,54 $\cdot$ 10 ⁻⁷	50,1 $\pm$ 0,42 $\cdot$ (10 ⁶)
SmR17	15 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	42,64 $\pm$ 2,84	3,26 $\cdot$ 10 ⁻⁷	45,96 $\pm$ 0,23 $\cdot$ (10 ⁶)
SmR59	8,8 $\pm$ 0,5	7,5 $\pm$ 0,8	15,61 $\pm$ 1,59	1,63 $\cdot$ 10 ⁻⁷	54,09 $\pm$ 0,41 $\cdot$ (10 ⁶)

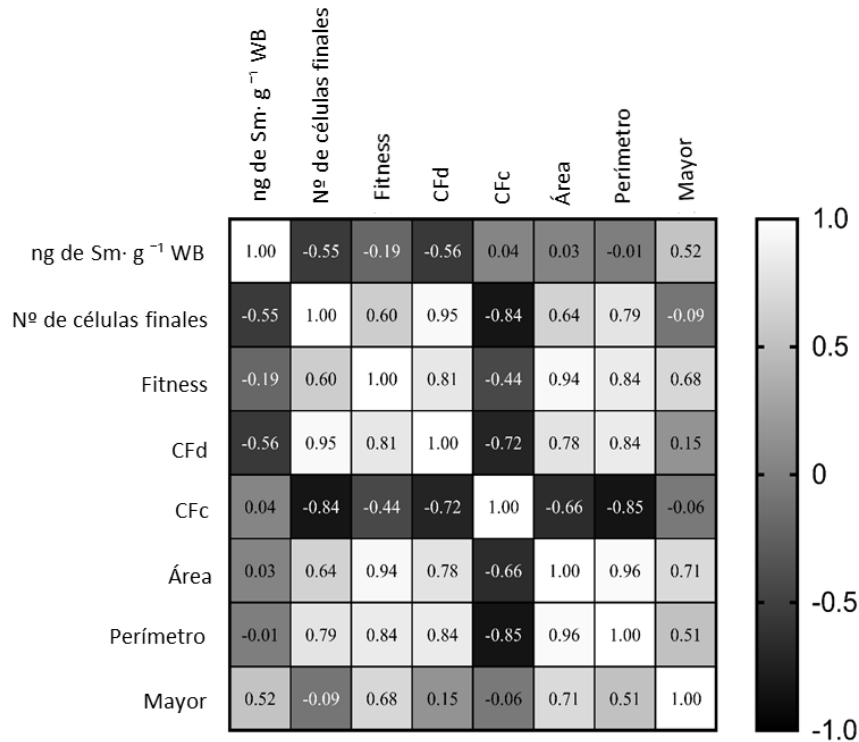


Figura 10. Figura modificada a partir de Martínez-Alesón García *et al.* (Martínez-Alesón García *et al.*, 2021). Relación entre los distintos parámetros morfométricos y los resultados de la captura de Sm.

CAPÍTULO II: Selección fenotípica dirigida a mejorar la captura de Sm.

Esta segunda parte recoge los resultados presentados en dos congresos y que están pendientes de publicación como artículo.

Llevamos a cabo un proceso de mejora para seleccionar cepas que capturaran más samario. Además, estudiamos la morfometría de ambas poblaciones para ver si estábamos realizando una selección hacia un fenotipo en concreto.

- P. Martínez-Alesón García et al. Artículo en preparación
- P. Martínez-Alesón; H. M. Díaz-Alejo; V. López-Rodas; E. Costas; Baselga-Cervera B.; García-Balboa C. **“Selection by density to find the best *Chlamydomonas reinhardtii* for Samarium bio-uptaking”** in the session 7 of the FEMS Online Conference on Microbiology (28-31 Oct 2020).
- P. Martínez-Alesón, C. García-Balboa, H. Díaz-Alejo, E. Costas Costas, V. López-Rodas, B. Baselga –Cervera. Póster: **Does size Matter? Sustainability in hands of the little ones: A morphometric approach to select *Chlamydomonas reinhardtii* for Samarium uptake.** En el congreso World Microbe Forum (20-24 Junio 2021) Poster ID: WMF21-1752.

1. Obtención de cepas:

Con el método de selección descrito en el apartado 5.2 de Material y Métodos, obtuvimos en total 4 cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* resistentes al Sm, a partir de la primera población CSm0, compuesta por la mezcla de las cepas resistentes obtenidas en el análisis de fluctuación. Las distintas poblaciones obtenidas según el esquema de la Figura 6, han sido nombradas: CSm1, CSm2, CSm3 y CSm4 según el número de ciclos de selección por caída que realizamos para obtenerlas. Así la cepa CSm4 la obtuvimos tras el 4º ciclo de selección por caída.

A continuación, presentamos los resultados obtenidos de las comparaciones realizadas entre la cepa control ChlA, la cepa sin selección por caída CSm0 y la cepa CSm4 seleccionada tras 4 ciclos de caída:

2. Tasas de crecimiento y *fitness* maltusiana

Tras obtener las poblaciones de cepas con el método de selección descrito en el apartado 5.2 de Material y Métodos, y tras comparar como era su crecimiento en dos medios distintos: BG₁₁ y BG₁₁ + Sm, entre ellas y con la población control ChlA, observamos que para los dos medios en los que se midió su crecimiento, un primer periodo de adaptación (≈ 5 días). En la Figura 11 podemos observar las curvas de crecimiento de las 6 cepas: Control, CSm0, CSm1, CSm2, CSm3 y CSm4, en los dos medios. Al comparar las tasas de crecimiento como se muestra en la Tabla 5, no observamos diferencias significativas entre las cepas en medio sin Sm, y en el medio con Sm observamos que sólo hay diferencias significativas entre la cepa Control y CSm0 ($p=0,0135$), entre CSm0 y CSm2 ($p=0,0009$) y entre CSm0 y CSm3 ($p=0,0002$). Además, podemos observar que las tasas de crecimiento de todas las cepas excepto de CSm0 y CSm4 disminuyen en presencia de Sm.

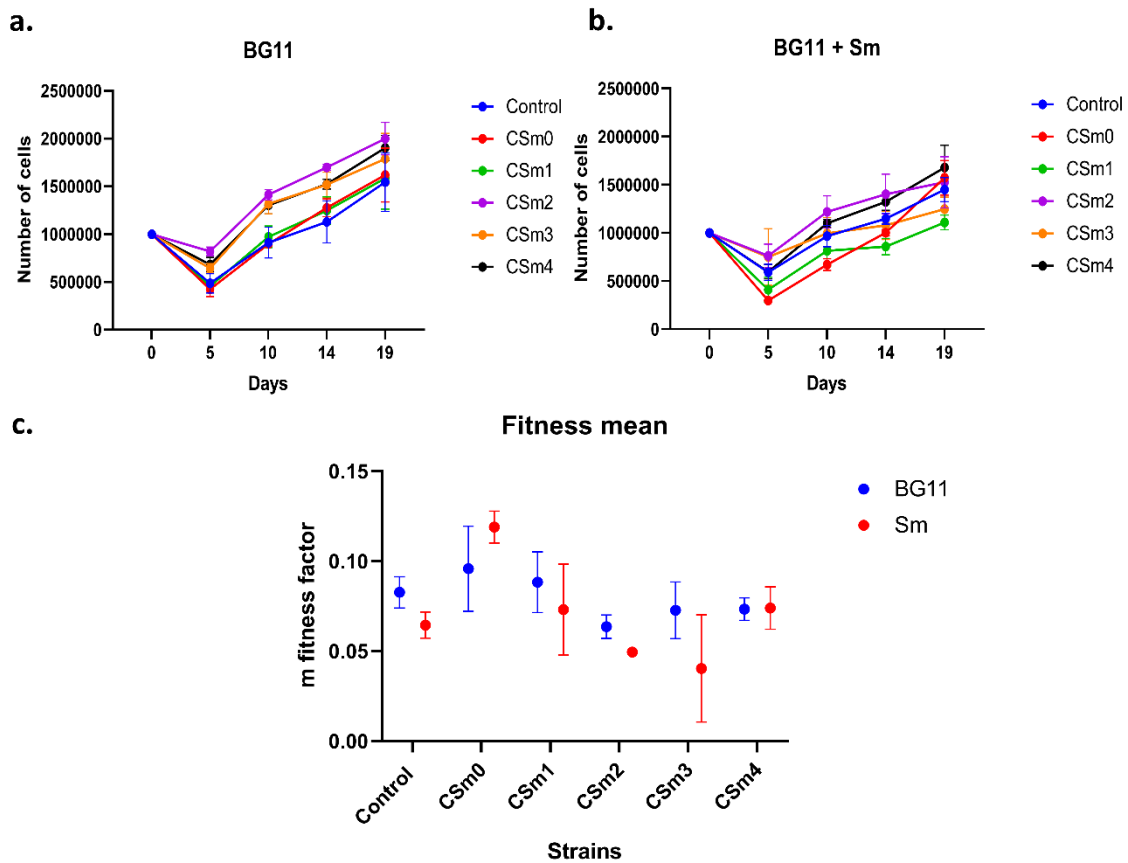


Figura 11: En la sección a y b observamos las curvas de crecimiento de las cepas Control, CSm0, CSm1, CSm2, CSm3 y CSm4 para los dos medios respectivamente BG₁₁ y Sm. En la sección c podemos observar *m* de las distintas cepas para los medios.

Tabla 5. Valores de p obtenidos para las comparaciones ANOVA doble vía de las tasas de crecimiento de las cepas analizadas.

Cepas comparadas	Valor de p
CSm0: Sm vs. Control:Sm	0,0135
CSm3:Sm vs. CSm0:BG11	0,0114
CSm2:BG11 vs. CSm0:Sm	0,0115
CSm2:Sm vs. CSm0:Sm	0,0009
CSm3:Sm vs. CSm0:Sm	0,0002
CSm3:Sm vs. CSm1:BG11	0,0421

3. Morfometría

Las medidas morfométricas obtenidas para las tres cepas, Control, CSm0 y CSm4, muestran que las células de la cepa Control son las mayores tanto por el eje mayor (D) como el menor (d) y que según estos parámetros las células obtenidas en la selección por caída CSm4 son significativamente menores comparadas (ANOVA una vía) con las otras dos cepas ($p < 0,0001$ para ambas comparaciones).

Si nos fijamos en la Figura 12 podemos observar esta misma tendencia con las medidas del área, en las que el mayor tamaño de media lo presenta la cepa Control y la de menor área es CSm4 ($p < 0,0001$).

La cepa que presenta un mayor perímetro es CSm0, mientras que la cepa Control y CSm4 presentan unos valores más parecidos hasta el punto de no encontrar diferencias estadísticas con los datos obtenidos. Sí es cierto, que de nuevo CSm4 presenta valores inferiores a CSm0.

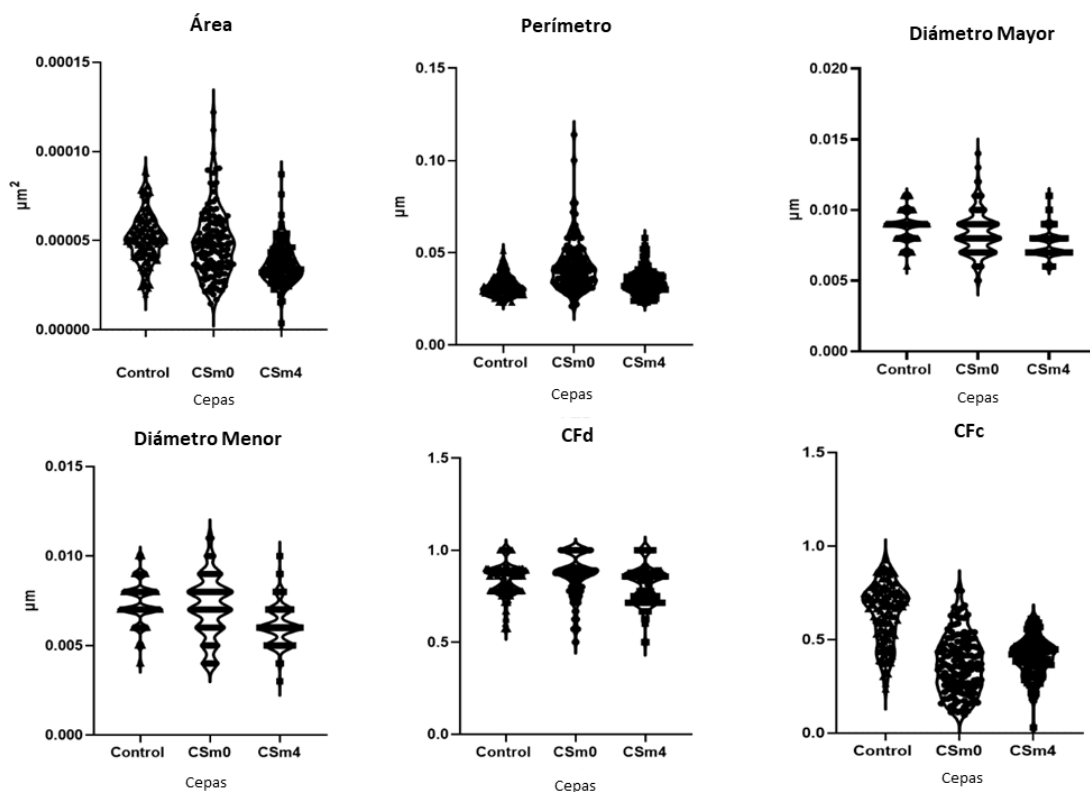


Figura 12. Gráficas con las comparaciones de los valores morfométricos de las tres cepas, Control, CSm0 y CSm4.

En cuanto a los coeficientes de forma de diámetros (CFd), no encontramos diferencias significativas al comparar las dos cepas resistentes al Sm con el Control, aunque parece

que difieren más entre las dos resistentes al Sm, la CSm0 y la CSm4 ($p=0,0009$), como observamos en la Tabla 6. Si observamos el CFc, sí que encontramos más diferencia al comparar ambas cepas, CSm0 o CSm4, con la cepa control. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en el CFc de CSm0 y CSm4.

Tabla 6. Valores p del análisis de morfometría comparando las cepas Control, CSm0 y CSm4.

Valor p	Control vs. CSm0	Control vs. CSm4	CSm0 vs. CSm4
Área	0,2162	<0,0001	<0,0001
Perímetro	<0,0001	0,1063	<0,0001
Eje mayor (D)	0,0067	<0,0001	<0,0001
Eje menor (d)	0,3919	<0,0001	<0,0001
CFd	0,3502	0,0455	0,0009
CFc	<0,0001	<0,0001	0,0629

4. Captura de samario

Para los experimentos de captura de Sm entre las cepas CSm0 y CSm4, como se muestra en la Figura 13, observamos que, en ambos pellets, el analizado sin lavados y el que se sometió a lavados con EDTA, retuvieron más Sm en el caso de la cepa CSm4. Además de la presencia de Sm en los pellets tras los lavados, pudimos comprobar la presencia de este elemento en las muestras procesadas de CSm4 para microscopía electrónica, con los microanálisis realizados mediante espectroscopia de rayos X por dispersión, donde se observa un pico cercano a 5,9 (Figura 14).

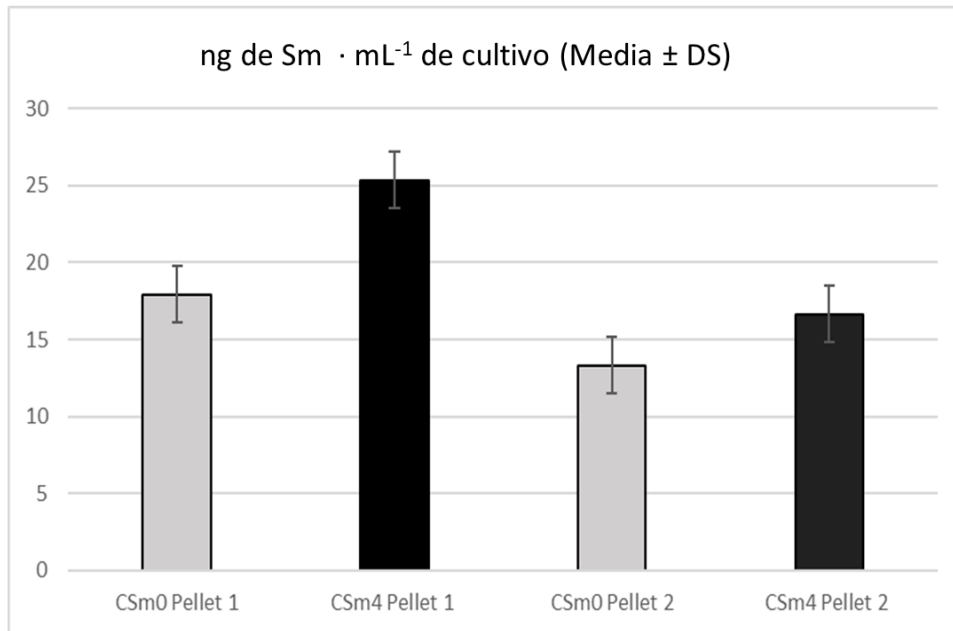


Figura 13. En este gráfico observamos como los dos pellets de la cepa CSm4, sin lavar (Pellet 1) y lavado (Pellet 2) retienen más Sm que los analizados de la cepa CSm0 (un incremento del 41% y del 25% respectivamente).

En la Figura 14 también podemos observar las micrografías obtenidas de CSm4, donde se observa la ultraestructura de *Chlamydomonas*. En las C1, C2 y C3 observamos las células casi enteras y en la micrografía C4 se observa en más detalle parte del retículo.

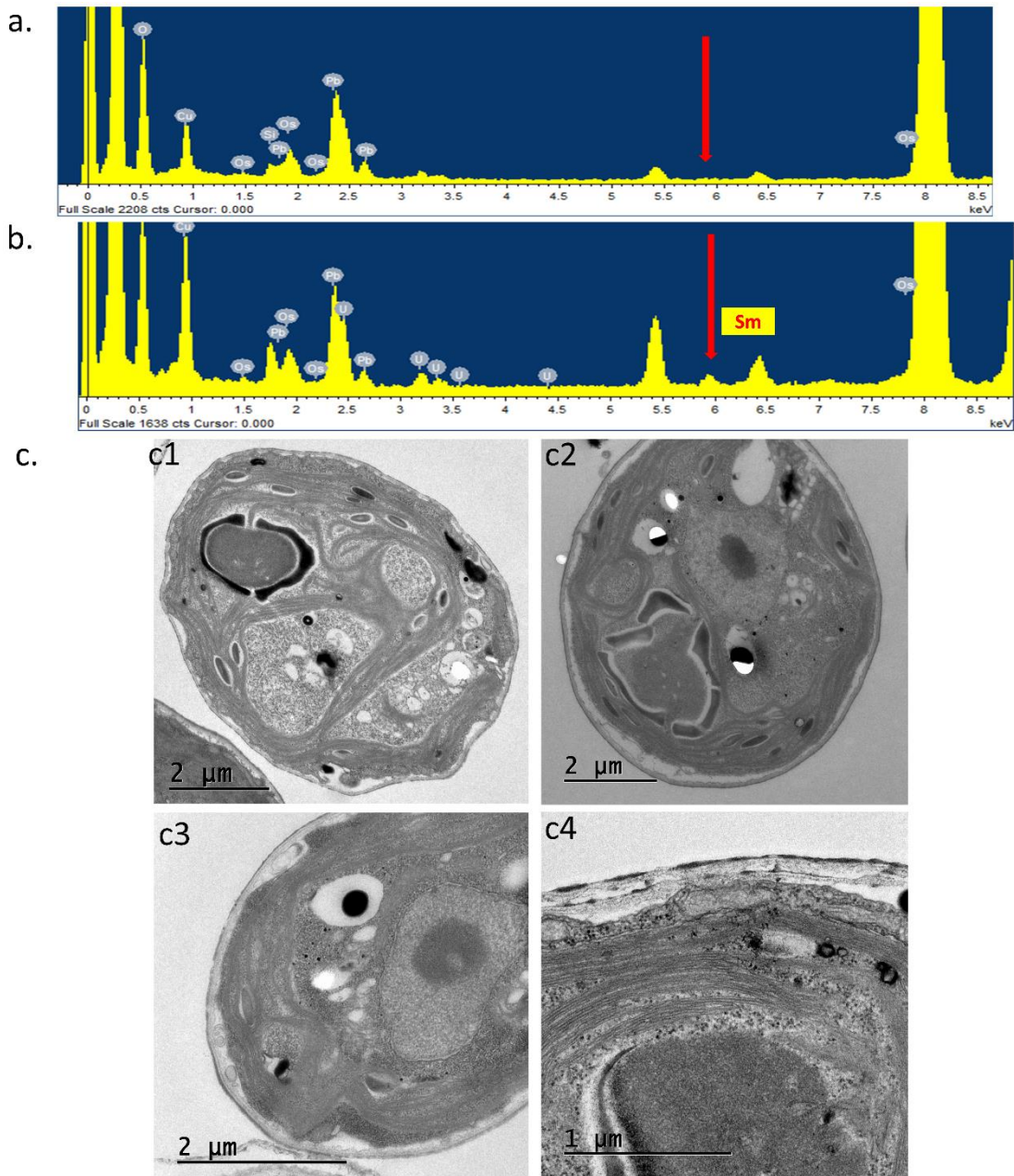


Figura 14. En las secciones a y b podemos observar respectivamente los resultados obtenidos en la espectroscopia de rayos X de dispersión en el Control (Cepa Chla sin previa exposición al Sm) y de la Cepa CSm4 cultivada en BG₁₁ + Sm. Podemos constatar la presencia de Sm gracias al pico en 5,9 que observamos en la sección b. de la imagen, pico que no aparece en el cultivo Control (sección a.). En la sección c. podemos observar las fotografías obtenidas con el microscopio JEOL-JEM 1400 de la cepa CSm4.

5. Relación de los parámetros obtenidos

En la Figura 15 podemos observar como el área y los dos ejes tienen una correlación negativa fuerte (de $\approx -0,8$, $-0,07$ y $-0,08$ respectivamente) con la captura de Sm, tanto para el pellet lavado, como para el pellet sin lavar. Sin embargo, el perímetro tiene una correlación positiva de $\approx 0,5$ con la retención de Sm. Los coeficientes de forma, tanto CFd como CFc tienen una relación negativa, siendo mayor en el caso de CFc ($\approx -0,9$).

En cuanto a la relación con las tasas de crecimiento en los medios con y sin Sm podemos relacionar positivamente la captura, con la tasa de crecimiento en el medio con Sm y de una forma negativa, aunque la correlación no parece tan robusta ($-0,13$) en el caso del medio sin Sm. Para los valores de Sm retenido en los pellets lavados y sin lavar, observamos una correlación inversa fuerte ($< -0,5$) con los parámetros morfométricos área, eje mayor y eje menor, lo que supone que a menor tamaño celular mayor captura de samario por célula.

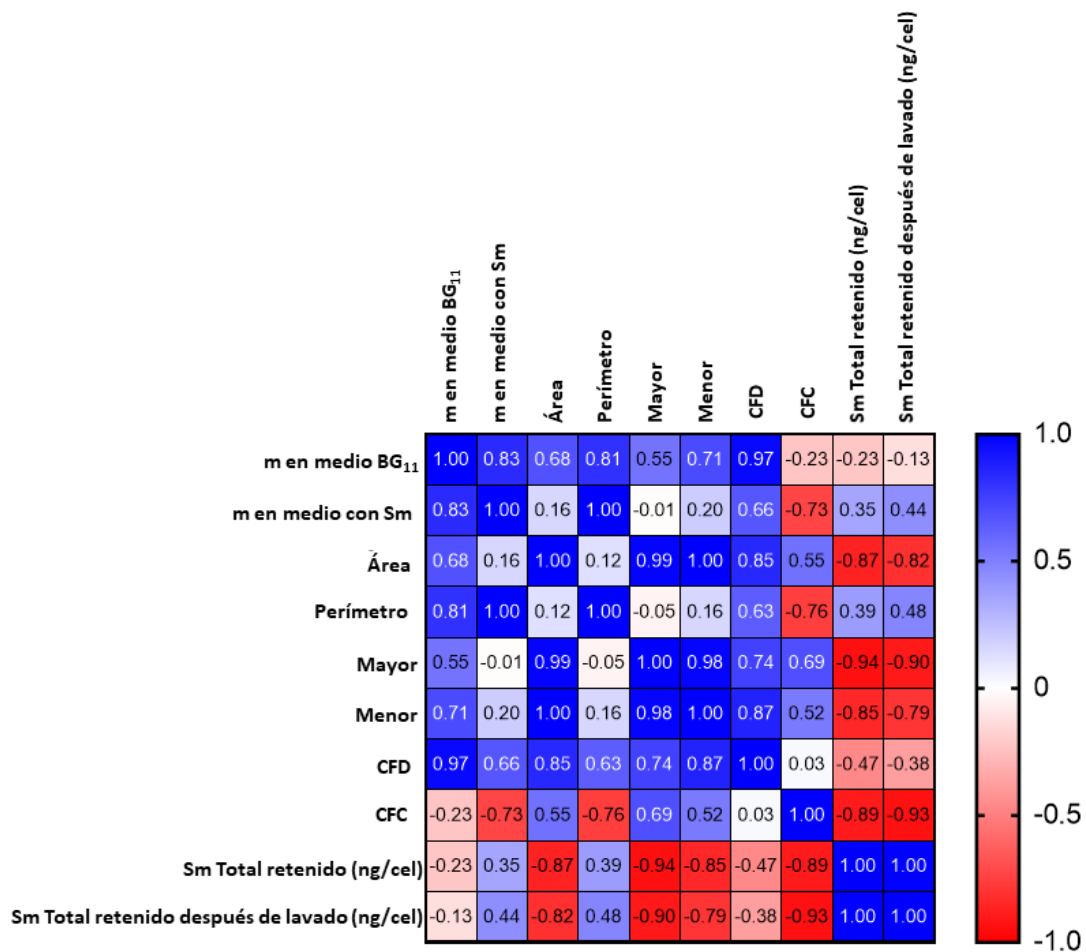


Figura 15. En el gráfico podemos observar los coeficientes de correlación obtenidos del test de correlación de Pearson para todos los parámetros analizados: tasa de crecimiento

en BG₁₁, tasa de crecimiento con Sm, área, perímetro, diámetro mayor, diámetro menor, CFd, CFc, Sm capturado y Sm absorbido. Para este análisis hemos utilizado la captura de Sm de la cepa control utilizada en el primer capítulo de esta tesis.

CAPITULO III: Aplicaciones Biotecnológicas de microorganismos seleccionados.

En este capítulo se aborda desde un punto de vista aplicado, los resultados de dos aplicaciones biotecnológicas desarrolladas en base a los estudios de selección de microorganismos y de investigación básica que hemos realizado: la recuperación de metales a partir de residuos y la detección de sustancias en medios contaminados.

III.I. Microorganismos para la recuperación de metales a partir de residuos. Proceso secuencial: Biolixiviación y Biocaptura.

III.II Selección de microalgas para la detección de nuevas sustancias.

III.I Microorganismos para la recuperación de metales a partir de residuos. Proceso secuencial: Biolixiviación y Biocaptura.

En esta parte recogemos los resultados obtenidos de la aplicación práctica a escala de laboratorio, del uso de microorganismos para la recuperación de metales a partir de materia prima obtenida en la industria de gestión de residuos metálicos. Desarrollamos un proceso de disolución y captura de metales a partir de residuos sólidos obtenidos mediante fraccionamiento físico. El objetivo era desarrollar un procedimiento catalizado principalmente por microorganismos que va a consistir en primer lugar, en la biolixiviación de sólidos conteniendo metales y la obtención de un líquido con una alta concentración de metales; y en un segundo paso en la captura y retención de esos metales gracias a la utilización de microalgas. Para el primer paso, los microorganismos utilizados fueron un consorcio de bacterias quimiolitotróficas (en su mayoría hierrooxidantes) y la captura y retención se llevó a cabo con dos especies de microalgas extremófilas, *Chlamydomonas sp.* y *Euglena sp.* Estos resultados han sido publicados en la revista Microbiology Open. DOI: 10.1002/mbo3.1265

- C. García-Balboa, P. Martínez-Alesón García, V. López-Rodas, E. Costas & B. Baselga-Cervera. “Microbial biominers: sequential bioleaching and biouptake of metals from e-scrap”. 2022. Microbiology Open. DOI: 10.1002/mbo3.1265 (Anexo 5)
- P. Martínez-Alesón García, B. Baselga-Cervera H. Díaz-Alejo Guerrero, V. López-Rodas, E. Costas Costas and C. García-Balboa. Comunicación Oral: Buscando en la Chatarra: Microorganismos capaces de recuperar metales. VII Jornadas VetinDoc – V PhDay de la Facultad de Veterinaria de la UCM. (7-Oct 2021).

En la tabla 7 y 8 se recogen las concentraciones de los metales encontradas durante el proceso de biolixiviación, en los sólidos y en los líquidos respectivamente. Además en la tabla 7 observamos los resultados del rendimiento de extracción del consorcio utilizado, con el cual obtuvimos un rendimiento superior al 99% para el Al, el Co y el Cu y superior al 98% para el Zn. En la Tabla 8, encontramos los valores de la eficacia del consorcio ya en el día 7 y podemos observar distintos órdenes de magnitud para distintos elementos: $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para elementos como Al, Cu, Fe y Zn; $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de elementos como Ag, As, Au, Ba, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, La, Li, Mn, Mo, Nd, Ni, Pb, Pr, Rb, Sn, Sr, Ti, U, V, W, Y y Zr; y un tercer grupo de elementos detectados en ordenes de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$: Be, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Nb, Pt, Sb, Sm, Tb, Th, Tm, Yb.

Tabla 7. Análisis químicos del contenido de metales en las fases sólidas de los residuos metálicos, al inicio (t_0) y tras 7 y 15 días de biolixiviado. Se muestra el porcentaje de metal solubilizado estimado, calculado según la variación del contenido de metales. Tabla modificada a partir de García-Balboa et al. 2022 (García-Balboa, Martínez-Alesón García, López-Rodas, Costas, & Baselga-Cervera, 2022).

Metal ($\mu\text{g/g}$)	Sólido Inicial ($\pm$ ES)	Consortio Bacteriano					
		Sólido tras 7 días de lixiviación ($\pm$ ES)	Sólido tras 15 días de lixiviación ($\pm$ ES)	% Sólido Solubilizado ($t=7\text{d}$)	% Sólido Solubilizado ($t=15\text{d}$)	E _i (7 días)	E _i (15 días)
Al	5862 $\pm$ 1465	3823 $\pm$ 955	4038 $\pm$ 1009	34,78	31,12	>99	80
Ba	3347 $\pm$ 836	2175 $\pm$ 543	2175 $\pm$ 543	35,02	35,02	0,2	0,1
Ca (%)	6 $\pm$ 1,5	1,5 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 1	75,00	36,67	NA	NA
Cd	27 $\pm$ 6,7	9 $\pm$ 2,2	1,2 $\pm$ 0,3	66,67	95,56	53,7	31,5
Co	92 $\pm$ 23	36 $\pm$ 9	39 $\pm$ 9	60,87	57,61	>99	38,7
Cr	694 $\pm$ 173	524 $\pm$ 131	533 $\pm$ 133	24,50	23,20	10,9	0,2
Cu	1007 $\pm$ 251	470 $\pm$ 117	571 $\pm$ 142	53,33	43,30	>99	72,9
Li	142 $\pm$ 35	79 $\pm$ 19	79 $\pm$ 19	44,37	44,37	8,5	6,1
Mg	4587 $\pm$ 1146	2179 $\pm$ 544	2779 $\pm$ 694	52,50	39,42	NA	NA
Mn	3298 $\pm$ 824	2559 $\pm$ 639	2265 $\pm$ 566	22,41	31,32	22,5	19,6
Mo	98 $\pm$ 24	79 $\pm$ 19	81 $\pm$ 20	19,39	17,35	14	0
Ni	430 $\pm$ 107	186 $\pm$ 46	232 $\pm$ 58	56,74	46,05	57,5	40
P	776 $\pm$ 194	338 $\pm$ 84	212 $\pm$ 53	56,44	72,68	NA	NA
Pb	1623 $\pm$ 405	891 $\pm$ 222	918 $\pm$ 229	45,10	43,44	35	2
Ti	5179 $\pm$ 1294	3412 $\pm$ 853	2492 $\pm$ 623	34,12	51,88	1,5	0
Zn	7279 $\pm$ 1819	402 $\pm$ 100	640 $\pm$ 160	94,48	91,21	>98	93,8

Tabla 8. Composición de metales encontrados en el líquido obtenido después de la exposición del residuo de chatarras al consorcio bacteriano, en los días 7 y 15 de exposición y la eficacia de lixiviación (L_i). Tabla modificada de García-Balboa et al. 2022 (García-Balboa et al., 2022).

Metal	Consortio			Control
	Día 7	Día 15	L_i 7d	Día 15
	(ng·ml ⁻¹ ± ES)		(mg · g ⁻¹)	(ng·ml ⁻¹ ± ES)
Ag	23±5,75	< 1,0	0,0023	< 1,0
Al	79548±19887	46893±11723	7,9548	< 1,0
As	103±25,7	< 10	0,0103	<10
Au	23±5,75	<1,0	0,0023	23±5,7
Ba	78±19,5	36±9	0,0078	24±6
Be	1,7±0,425	1,6±0,4	0,00017	<1,0
Bi	13±3,25	<1,0	0,0013	<1,0
Cd	145±36,2	85±21,25	0,0145	1±0,25
Ce	82±20,5	52±13	0,0082	<1,0
Co	1234±308	356±89	0,1234	3,1±0,775
Cr	756±189	13±3,25	0,0756	6±1,5
Cu	11030±2757	7337±1834	1,103	206±51,5
Dy	7,1±1,77	5,8±1,45	0,00071	<0,10
Er	2,4±0,6	1,9±0,475	0,00024	<0,10
Eu	3±0,75	2,4±0,60	0,0003	<0,10
Fe	90000±22500	365±91,2	9	<10
Gd	14±3,5	6,4±1,60	0,00014	<0,10
Ho	1,1±0,275	0,75±0,185	0,00011	<0,10
La	52±13	34±8,5	0,0052	<0,10
Li	120±30	87±21,75	0,012	68±17
Lu	0,46±0,155	0,29±0,07	0,000046	<0,10
Mn	7414±1853	6476±1619	0,7414	<10
Mo	137±34,2	<1,0	0,0137	33±8,25
Nb	3,9±0,975	<1,0	0,00039	<1,0
Nd	103±25,7	63±15,7	0,0103	<0,10
Ni	2472±618	1757±439	0,2472	28±7
Pb	5688±1422	330±82,5	0,5688	<1,0
Pr	25±6,25	14±3,5	0,0025	<0,10
Pt	<1,0	<1,0	0,000001	<1,0
Rb	21±5,25	20±5	0,0021	18±4,5
Sb	11±2,75	<1,0	0,00066	7,5±1,87
Sm	6,6±1,65	5,4±1,35	0,00066	<0,10
Sn	102±25,5	<10	0,0102	<10
Sr	718±179,5	637±159	0,0718	121±30,2
Tb	1±0,25	1±0,25	0,0001	<0,10
Th	8,8±2,2	2±0,5	0,00088	<1,0

Ti	769±192	<1,0	0,0769	<1,0
Tm	0,38±0,095	0,28±0,07	0,000038	<0,10
U	253±63,25	158±39,5	0,0253	<1,0
V	216±54	<1,0	0,0256	24±6
W	16±4	<1,0	0,0016	3,3±0,82
Y	50±12,5	40±10	0,005	<0,10
Yb	2,3±0,575	1,7±0,4	0,00023	<0,10
Zn	71518±17879	68387±17096	7,1518	23±5,7
Zr	157±39,2	<1,0	0,0157	<1,0

Caracterizamos el consorcio utilizado por secuenciación y se encontró la presencia de las especies nombradas en la Tabla 9, siendo las dos mayoritarias *Acidiphilium multivorum* y *Leptospirillum ferriphilum*. Del resto de especies el número de lecturas fueron al menos 100 veces inferior por lo que consideramos que los principales actores durante el experimento de biolixiviación son *A. multivorum* y *L. ferriphilum*.

Tabla 9. Especies detectadas en la identificación del consorcio bacteriano con el número de lecturas por cada especie. En esta tabla se muestran sólo las especies que se detectaron con 10 o más lecturas. El resto de especies detectadas se pueden consultar en el artículo completo o en los repositorios allí citados.

Especie	Nº de Lecturas
<i>Acidiphilium multivorum</i>	30887
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	14367
<i>Acidiphilium rubrum</i>	93
<i>Granulibacter bethesdensis</i> CGDNIH1	91
<i>Dulcicalothrix necridiiformans</i> V13	85
<i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	82
<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>	62
<i>Acidocella aluminiidurans</i>	50
<i>Chamaesiphon minutus</i>	38
<i>Acidiphilium cryptum</i>	36
<i>Komagataeibacter medellinensis</i>	35
<i>Acidibrevibacterium fodinaquatile</i>	34
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	31
<i>Arboricoccus pini</i>	29
<i>Loriellopsis cavernícola</i>	29
<i>Hydrocarboniphaga daqingensis</i>	28
<i>Acidiphilium organovorum</i>	26
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	25
<i>Endobacter medicaginis</i>	22
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	21

<i>Telmatocola sphagniphila</i>	21
<i>Vicinamibacter silvestris</i>	21
<i>Gluconobacter oxydans</i>	19
<i>Acidisoma sibiricum</i>	18
<i>Acidomonas methanolica</i>	18
<i>Roseomonas mucosa</i>	18
<i>Cylindrospermum stagnale</i>	17
<i>Neobacillus niacini</i>	16
<i>Acidiphilium acidophilum</i>	15
<i>Reyranella massiliensis 521</i>	14
<i>Acidocella aminolytica</i>	13
<i>Mycobacterium florentinum</i>	13
<i>Reyranella soli</i>	12
<i>Limosilactobacillus reuteri subsp. Reuteri</i>	11
<i>Mycobacterium triplex</i>	11
<i>Alcaligenes faecalis</i>	10
<i>Algisphaera agarilytica</i>	10
<i>Ligilactobacillus murinus</i>	10

Para los experimentos de captura de metales a partir del líquido obtenido del proceso de lixiviación utilizamos dos cepas microalgales diferentes, aisladas de aguas cercanas a minas, una perteneciente al género *Euglena* y otras al género *Chlamydomonas*. Podemos observarlas en las fotografías de la Figura 16.

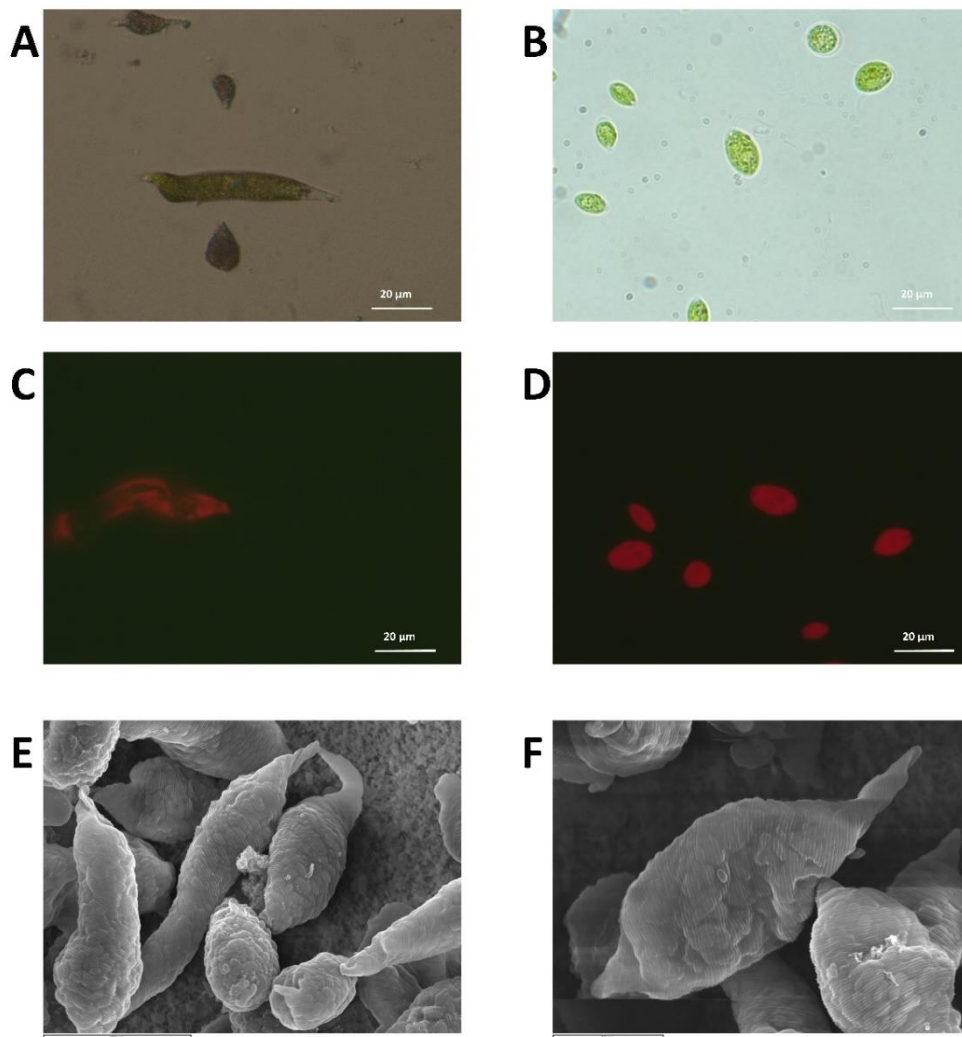


Figura 16. (A y C) Imágenes de microscopio óptico y con autofluorescencia de la cepa EugVP y (B y D) de la cepa ChlSG. (E y F) micrografías la cepa EugVP preparadas y tomadas con microscopía electrónica de barrido (SEM).

Debido a las distintas características que presentan estos dos géneros de microalgas, podemos observar que capturaron distintas concentraciones de metales. Podemos observar un resumen de los metales capturados por cada una expresados en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa húmeda en la Figura 17.

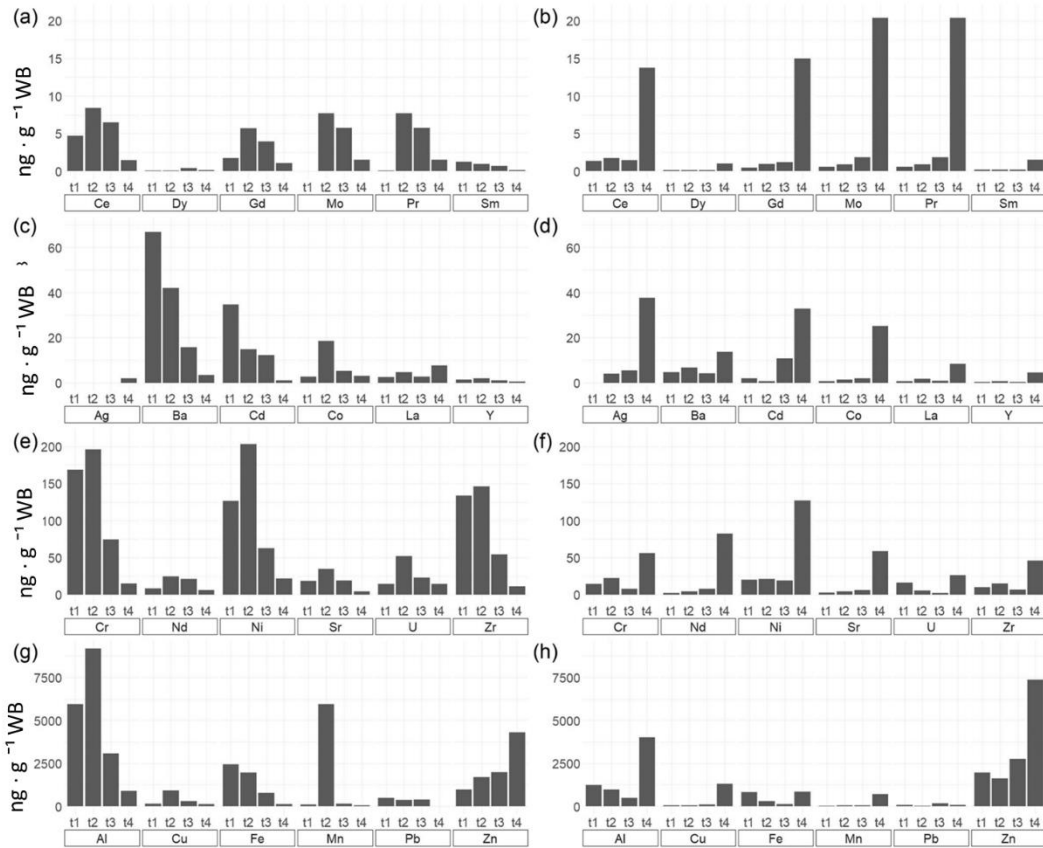


Figura 17. Figura modificada de Garcia Balboa et al. 2022 (García-Balboa et al., 2022). Muestra gráficamente la concentración de la captura de metales en los pellets de las microalgas (ng). En las gráficas A, C, E, y G se observan las cantidades de los metales recuperados por EuVp en el tiempo (t1 = 0 h, t2 = 8 h, t3 = 144 h y t4 = 288 h). Las gráficas B, D, F y H corresponden a las capturas de metales medidas en los pellets de ChlSG.

III.II Selección de microalgas para la detección de nuevas sustancias.

Esta patente es el resultado de los estudios pertinentes de toxicidad de HTF entre varias especies de la colección de microalgas de la Facultad de Veterinaria de la UCM y la realización de las rectas de calibrado correspondientes. Este proyecto se realizó gracias a la colaboración de la empresa Acciona Energía S.A. y al trabajo de la empresa Phytotek S.L. La solicitud de la patente pública puede consultarse al completo en el Anexo 6.

- Reyes García, ML; Basail Izcue, PM; Díaz-Alejo Guerrero, HM; Martínez-Alesón García, PM; Martínez Esteban P. “Biosensor Microalgal para la detección de HTF”. ES2846473A1. 2021. Dueño de la Patente: Acciona Energía S.A. (100%).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 473**

21 Número de solicitud: 202030068

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.01.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.07.2021

71 Solicitantes:

ACCIONA ENERGÍA, S.A. (100.0%)
Avda. Ciudad de la Innovación, nº 5
31621 Sarriñena (Navarra) ES

72 Inventor/es:

REYES GARCIA, Mari Luz;
BASAIL IZCUE, Pedro Miguel;
DIAZ-ALEJO GUERRERO, Héctor Miguel;
MARTÍNEZ - ALESÓN GARCÍA, Paloma María y
MARTÍNEZ ESTEBAN, Paloma

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Biosensor microalgal para la detección de HTF**

57 Resumen:

Biosensor microalgal para la detección de HTF. Biosensor para la detección de HTF que comprende un biodetector formado una población de microalgas y un sistema de transducción de señal configurado para medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas. La disminución en la fluorescencia emitida por las microalgas en presencia de una muestra indicaría la presencia de HTF en la misma. En función de los valores de fluorescencia obtenidos es posible cuantificar la cantidad de HTF existente en la muestra. La invención también se refiere, por tanto, al uso del biosensor y al método para la detección de HTF.

ES 2 846 473 A1

VIII. DISCUSIÓN:

“Conserva celosamente tu derecho a reflexionar, porque incluso el hecho de pensar erróneamente es mejor que no pensar en absoluto”

Hipatia de Alejandría

“Hay que coger el bisturí y analizar tus propias ideas, confrontándolas con las de los demás”

María Teresa Miras Portugal

Microalgas seleccionadas

Los datos experimentales obtenidos, aportan nuevas evidencias que demuestran el valor de nuestras especies de microalgas para la biorremediación del medio ambiente y para la captura de lantánidos. Primero en un modelo de recuperación de un solo elemento, el Sm, como representante de las tierras raras ligeras y después en un modelo de recuperación más complejo como es la recuperación de metales y tierras raras presentes en un caldo complejo obtenido tras un proceso de biolixiviación polimetálico, procedente de residuos con altos contenidos en metales. Nuestros resultados indican que la selección fenotípica de *Chlamydomonas* para la captura de lantánidos ayuda a incrementar la captura de samario.

Adaptación y resistencia al Sm

Con el experimento de fluctuación se ha estudiado la adaptación de *chlorophytas* a ambientes extremos. En el Anexo 1 encontramos algunos de estos trabajos resumidos, y observamos que en los experimentos realizados con la especie *C. reinhardtii*, los valores de la tasa de mutación se encuentran entre $9,61 \cdot 10^{-6}$ y $3,8 \cdot 10^{-7}$. Ness *et al.* (2012) calcularon la tasa de mutación de *C. reinhardtii* de una forma directa, sin la adición de ningún agente selectivo, secuenciando el genoma entero de una cepa tras 350 generaciones, obteniendo una tasa de mutación de $3,23 \cdot 10^{-10}$ /lugar/generación y una tasa de mutación de $2,08 \cdot 10^{-10}$ /base/generación (Ness, Morgan, Colegrave, & Keightley, 2012). Trabajos recientes como el de Monroe *et al.* (2022) ponen de manifiesto el debate aún abierto sobre la naturaleza azarosa o dirigida de las mutaciones en eucariotas (Monroe et al., 2022). No podemos establecer comparaciones directas entre los dos tipos de trabajos, ya que hay que tener en cuenta que la sustitución de un nucleótido por generación puede no tener ningún efecto sobre el fenotipo del organismo, sí nos da una idea de lo improbable que es que se dé este tipo de mutación. En nuestro experimento, podríamos estar obteniendo resistentes repetidos en los distintos tubos y que para obtener un resistente se pueden necesitar varias mutaciones puntuales o su combinación.

Gracias al análisis de fluctuación realizado, obtuvimos 13 cepas supervivientes de las cuales estudiamos los fenotipos morfométricos y las tasas de crecimiento (Martínez-Alesón García et al., 2021). Para nuestra sorpresa, al medir las tasas de crecimiento en condiciones no selectivas de los resistentes obtenidos y compararlas con la cepa control, todas presentaban una tasa de crecimiento mayor (Tabla 3). Este resultado no concuerda

con el coste de *fitness* esperado de la adaptación al Sm. Sospechamos que este resultado está influenciado por trazas de Sm que se encontraran presentes y que favorecieran el crecimiento del cultivo.

Durante el estudio de la toxicidad del Sm en *C. reinhardtii*, a bajas concentraciones, por debajo de $6,65 \cdot 10^{-7}$ M, observamos un aumento en el crecimiento de la cepa ChlA y también un aumento en el rendimiento del PSII respecto del control sin exposición al Sm. Este hecho de que a bajas concentraciones las tierras raras promueven el crecimiento de las plantas se repite con el Sm y con otras tierras raras, (Pang et al., 2002; Tyler, 2004; Zhang & Shan, 2001). Aunque no está claro el mecanismo, son varios los autores que han observado que estos elementos en forma de traza influyen sobre el crecimiento de las microalgas (Evseeva, Geras'kin, Majstrenko, Brown, & Belykh, 2010; Goecke et al., 2015; Gong et al., 2011).

Este efecto positivo en el crecimiento de los cultivos se ha observado en situaciones de privación de nutrientes como el Ca^{2+} , el Mg^{2+} o el Mn^{2+} pero también se ha relacionado con mecanismos de eliminación de radicales libres de oxígeno (Valcheva-Traykova, Saso, & Kostova, 2014) o de compensación del estrés (Volland et al., 2014). Algunos lantánidos como el La, Ce, Nd, Eu o el Gd han sido postulados como buenos sustitutos del Ca en casos de déficit de este elemento en cultivos de *Desmodesmus quadricauda* (Miazek, Iwanek, Remacle, Richel, & Goffin, 2015) y Goecke et al. (2015) demostraron que los lantánidos pueden reemplazar elementos esenciales, como el Ca o el Mg, mejorando la situación de los cultivos en estado de privación de estos elementos (Goecke et al., 2015). Sin embargo, en casos de deficiencia de Mn, los lantánidos a bajas concentraciones empeoran el crecimiento de *D. quadricauda*, agravando el estado de estrés de los cultivos. Esto ha sido aprovechado por algunos autores que han propuesto métodos de pretratamiento de los microorganismos, modificando los nutrientes del medio para mejorar la captura de metales. Por ejemplo, Čížková et al. (2019) realizaron un tratamiento previo cultivando *Desmodesmus quadricauda* en un medio pobre en nutrientes esenciales, para aumentar la capacidad de captura de estos metales de una arcilla roja rica en lantánidos (Čížková et al., 2019).

Podríamos pensar que este efecto positivo sobre la *fitness* puede ayudar a optimizar la biocaptura. Sin embargo, al contrario de lo esperado, la cepa SmR9 que presentaba la *fitness* Malthusiana más elevada de entre las cepas obtenidas y estudiadas, fue la que menos Sm retuvo y observamos un coeficiente de correlación negativo de 0,6 entre los

ng de Sm capturados y el número final de células en el cultivo. Esto puede explicarse porque los cultivos se encontraban llegando a la fase estacionaria, y los que más rápido crecieron, se encontraban en una fase más avanzada que los de crecimiento más lento al ser analizados. Estos datos coinciden con los obtenidos por Baselga-Cervera *et al.* (2018) según los cuales, sólo se encontraron diferencias significativas de la captura del uranio en la fase mid-log exponencial, ya que al aproximarse a la fase estacionaria, procesos de desorción de las células podrían estar produciéndose (Baselga-Cervera *et al.*, 2018). Este factor será por lo tanto determinante a la hora de seleccionar el tiempo de recogida de microalgas de cara a la optimización de procesos de captura de metales.

Observando los resultados de captura de las cepas resistentes elegidas, sólo 1 de las 3, SmR17, mejoró los resultados de ChlA, la cepa control que no había sido expuesta al Sm. En medios contaminados con metales, se ha relacionado la resistencia a metales con los mecanismos de resistencia a antibióticos (Dickinson *et al.*, 2019). Cuando esta resistencia está mediada por cambios genéticos, da como resultado mecanismos de resistencia cruzada metal-antibióticos (Baker-Austin, Wright, Stepanauskas, & McArthur, 2006; Dickinson *et al.*, 2019; Peltier *et al.*, 2010; Seiler & Berendonk, 2012). Esto podría explicar por qué las otras dos cepas estudiadas, SmR9 y SmR59 capturaban menos Sm que la cepa control, ya que la resistencia puede estar mediada por mecanismos de expulsión de estos elementos, similares a los que ocurren con los antibióticos, como cambios en la permeabilidad o una mayor expresión de bombas de salida (Baker-Austin *et al.*, 2006). En el caso de eucariotas encontramos también descritos estos mecanismos de resistencia y de defensa a metales que Priyadarshini *et al.* (2019) (Priyadarshini, Priyadarshini, & Pradhan, 2019) clasifican como:

- mecanismos de biosorción,
- mecanismos de acumulación intracelular,
- detoxificación por mecanismos quelantes y
- exclusión por mecanismos de transporte de salida.

La cepa SmR17 capturó la mayor cantidad de Sm, ($46,64 \mu\text{g Sm} \cdot \text{g}^{-1}$ de WB y $3,26 \cdot 10^{-7}$ ng Sm·célula⁻¹) y el análisis de correlación mostró que el tamaño del eje mayor y el coeficiente de selección se relacionaban de forma positiva con los ng totales bioacumulados. SmR17 fue elegida para los experimentos de captura por ser la de mayor área, sin embargo, todas las cepas obtenidas en el análisis de fluctuación resultaron mayores en área y volumen que la cepa inicial (ChlA), menos SmR51, por lo que no

podemos deducir que un mayor tamaño asegure una mayor captura. De estos mismos datos, también observamos que los coeficientes de forma indicaban que las células resistentes eran menos redondas. Por lo que sí podemos decir que la presión ejercida por las altas concentraciones de Sm y pH ácido seleccionó cepas con *fitness* superiores, con un tamaño mayor y más asimétricas que la cepa control.

Existen otros trabajos en los que se han observado los efectos que los metales provocan en las microalgas, como Volland *et al.* (2014), que observaron las modificaciones morfométricas que el Cu, el Zn, el Al, el Cd, el Cr, el Fe y el Pb producían en individuos de la especie *Micrasterias sp.* (Volland et al., 2014). Además, se ha propuesto utilizar técnicas morfométricas para estudiar las distintas formas que adopta *Euglena gracilis* como indicador de la captura o no de metales (Xu et al., 2021). Con este trabajo también abrimos la puerta a profundizar en qué factores morfológicos pueden resultar útiles para la selección de cepas con aplicaciones biotecnológicas, en concreto para la captura de metales.

La obtención de microorganismos resistentes capaces de capturar metales y continuar reproduciéndose, resuelve una de las ventajas atribuidas a la utilización de la biomasa muerta como un mejor sistema de biosorción (Torres, 2020). La utilización de biomasa viva además puede resultar ventajoso desde un punto de vista de aprovisionamiento y reducción de costes, pues no haría falta cosechar biomasa para utilizarla como biomasa muerta luego. Además, pueden existir procesos de detoxificación como sugiere A. Malik 2004 para el caso del Cd (Malik, 2004) que pueden permitir un mayor rendimiento o una transformación de las sustancias capturadas. Sin embargo, como comenta en su revisión E. Torres (2020) es un tema controvertido y complejo debido a las múltiples ventajas y desventajas que presentan la utilización de biomasa viva o muerta para la biosorción (Torres, 2020), probablemente se debiera valorar para cada caso qué sistema presenta más ventajas que inconvenientes.

Mejora de la capacidad de captura

La opción más directa para la obtención de cepas resistentes a metales mejorando su captura es la modificación genética directa. Ibuot *et al.* (2017) estudiaron una cepa de *C. reinhardtii* con el gen CrMTP4 sobreexpresado, responsable de proteínas transportadoras de cationes. Sin embargo, a pesar de conseguir una mejora en la resistencia y captura de Cd, esta cepa no podía competir con la resistencia y la captura de Cd de las cepas

Chlorella luteoviridis, *Parachlorella hussii* y *Parachlorella kessleri* adaptadas de forma natural (Ibuot et al., 2017). La modificación directa del genoma para la obtención de cepas resistentes a metales es un trabajo demasiado laborioso ya que los mecanismos de resistencia a metales desarrollados por las cepas adaptadas de forma natural son multigénicos y las bases moleculares de la resistencia a metales están controladas por múltiples genes en eucariotas (Siripornadulsil, Traina, Pal, Verma, & Sayre, 2002). El estudio de la información genómica relacionada con la resistencia a metales en eucariotas (Balzano et al., 2020), junto con otras formas de seleccionar microalgas resistentes y la identificación de genes relacionados con la captura de metales podrían abrir nuevos caminos para mejorar la captura de metales con microalgas.

En el caso concreto de las tierras raras, uno de estos métodos para aumentar la capacidad de captura de estos metales, podría ser el propuesto por Čížková *et al.* (2019) en el que se expone *Desmodesmus quadricauda* a un medio pobre en nutrientes esenciales como pretratamiento, para obtener lantánidos de una arcilla roja (Čížková et al., 2019). Métodos como el análisis de fluctuación o la selección por caída, que imitan procesos naturales, también pueden ser útiles y permitirnos seleccionar hacia una característica multigénica como es el caso de la captura de metales. Al igual que se hace en agricultura o en ganadería, si somos capaces de seleccionar a través de dos procesos sucesivos los individuos resistentes y de estos lo que más Sm han capturado, estaremos seleccionando las células idóneas de las poblaciones con mejores características para esa captura.

Para ello creamos un cultivo de células resistentes al Sm, mezclando las 13 cepas SmR de *C. reinhardtii* obtenidas, como se hubieran obtenido en la naturaleza, con una mayor variedad genotípica que si los hubiéramos mantenido por separado y denominamos a este cultivo CSm0. Baselga-Cervera *et al.* (2018), desarrollaron un procedimiento de selección con el que optimizaron la captura de uranio de una cepa resistente aislada de muestras naturales. Asumieron que, una mayor captura de U se traduciría en el aumento de la velocidad de caída de las células, bien sea por un incremento de la densidad o un aumento del área de las células y por tanto del número de sitios de unión en la superficie (Baselga-Cervera *et al.*, 2018). Tras dejar crecer nuestra población de *C. reinhardtii* CSm0 en un medio con Sm, seleccionamos las células que más Sm habían capturado con el procedimiento detallado en el apartado de Material y Métodos 5.2 y que encontramos resumido en la Figura 7. Tras el cuarto ciclo de selección hemos obtenido una población de microalgas, CSm4 que capturaban más Sm que la población de partida CSm0 como se

muestra en la Figura 13. Aunque existe una mayor diferencia entre lo que captura en los pellets que no fueron lavados con EDTA, CSm4 también conserva más Sm internalizado que la cepa inicial CSm0 tras realizar estos lavados.

Si observamos las tasas de crecimiento de todas las cepas obtenidas, que se muestran en la Figura 11, nos ha llamado la atención que, con el primer ciclo de selección, observamos una disminución de la tasa de crecimiento de CSm1 tanto en medio BG₁₁ como en medio con Sm, sin embargo, al obtener la cepa CSm4 las dos tasas de crecimiento en ambos medios se igualaron.

Al reproducir el experimento de selección por caída hemos comprobado si efectivamente estábamos seleccionando las células por su tamaño o por su densidad midiendo el tamaño de las células recogidas. Si nos fijamos en la fórmula de Stokes [Ecuación 7], las células con una mayor velocidad de caída ψ , y por tanto las que antes han caído, pueden aumentar esa velocidad si cambian dos factores, la densidad celular o el radio de la célula, ya que el resto de factores van a depender del medio y podríamos suponer que son los mismos para todas las células que se encuentran en la bureta. Según esta ecuación el tamaño es un factor que afecta en mayor medida a la velocidad de caída que la densidad celular (ρ_p), ya que mientras ρ_p es proporcional a ψ , también lo es al cuadrado del radio de la célula.

$$\psi = \frac{2gr^2(\rho_p - \rho_{BG})}{9\eta\phi} \quad [\text{Ecuación 7}]$$

Si no existiera ninguna diferencia en la captura de Sm entre las distintas células y por lo tanto si la ρ_p no cambia, las células recogidas después de cada ciclo de selección tendrían un radio mayor, puesto que sería el único factor que podría variar en favor. Esto podría ser ventajoso para la captura de Sm, puesto que obtendríamos cepas más grandes. Sin embargo, observando las medidas morfométricas de CSm0 y CSm4 comprobamos que la cepa obtenida tras los 4 ciclos de captura posee unos diámetros d y D significativamente más pequeños que los de la cepa inicial SmR0. Estamos seleccionando células de menor tamaño según los valores del área, el perímetro y de los ejes mayor y menor; pero no encontramos diferencias significativas entre los coeficientes de forma, ni de diámetro, ni el circular, por lo que serían células con la misma forma.

Si asumimos que el resto de los factores que influyen según la ley de Stokes (Waite et al., 1997) son iguales y que el radio disminuye, el otro factor que puede estar aumentando la velocidad de caída ψ es la densidad celular. Con los experimentos de captura, observamos

que efectivamente CSm4 captura más Sm, esto explicaría la selección de células más pequeñas, ya que la densidad de las células habría aumentado por un aumento en la captura de Sm.

Con la selección realizada tras los cuatro ciclos de caída, Aunque estas diferencias no son muy grandes, sí observamos la tendencia de la cepa CSm4, la de menor tamaño, a poseer una forma más redonda. El hecho de que las células más pequeñas adquieran un tamaño más esférico, según Durante *et al.* (2019) podría ser una estrategia evolutiva para frenar el hundimiento (Durante et al., 2019).

Aunque estos resultados, contradigan lo observado con anterioridad de que la cepa más grande, SmR17, era la que más Sm capturaba, no es del todo extraño que células más pequeñas capturen más Sm. Esto puede ser explicado debido a la importancia de la pared y membrana en la captura de sustancias y a que en el caso de *C. reinhardtii*, al poseer una forma esferoidal, la proporción entre el área de la superficie de la célula y el volumen de la célula (SA) va a aumentar si el radio de la célula disminuye (Durante et al., 2019).

$$SA = \frac{a_1}{v_1} = \frac{4\pi r^2}{\frac{4}{3}\pi r^3} = \frac{3}{r}$$

Esta relación isométrica de las células esféricas les da una ventaja a la hora de capturar nutrientes y se ha observado por ejemplo en el caso de la luz, ya que la absorción de esta disminuye según el tamaño de célula aumenta (Kirk, 1994). De hecho, se piensa que en el caso de la captura de nutrientes o de la luz es una propiedad que les da una ventaja evolutiva a las células esféricas de menor tamaño ya que son capaces de concentrar los nutrientes necesarios en un menor tiempo por difusión pasiva, y ese tiempo será mayor según aumenta el tamaño celular (Karp-Boss, Boss, & Jumars, 1996). La confirmación de que la cepa CSm4 captura más Sm que la CSm0, pone de manifiesto la importancia que puede tener esta relación isométrica entre la superficie celular y el volumen total de la célula para la captura de Sm. Esta reducción del tamaño de las células recuerda a los procesos de reducción del tamaño de partícula para aumentar la superficie de contacto con la sustancia que se quiere capturar y remarca la importancia de la pared celular y la membrana celular en la captura de metales (Spain et al., 2021). Después de la selección por caída realizada por Baselga-Cervera *et al.* (2018) y de este trabajo, podemos afirmar que en microalgas con una forma esferoidal, como es *C. reinhardtii*, se puede mejorar la captura de uranio, samario y probablemente de otros metales seleccionando los individuos

que más metal son capaces de capturar. Otra posible explicación puede ser una mayor presencia de invaginaciones y rugosidades en la capa externa de la célula, lo que supondría una mayor proporción de lugares a los que el Sm pueda unirse. Estas variaciones en la pared, se han observado ya en microalgas expuestas a metales, como las observadas en *Nannochloropsis sp.* en presencia de Hg^{2+} (Sun, Cheng, Yang, & Zhou, 2021). En futuros proyectos podríamos dilucidar si este mayor número de invaginaciones se da también en nuestras microalgas con microscopia de barrido, para observar la superficie de ChlA y de CSm4.

El desarrollo y perfeccionamiento de nuevas tecnologías de imagen está permitiendo que aprovechemos aspectos de la fisiología celular para la selección de microorganismos. En las imágenes de la microscopía electrónica, además de observar directamente la ultraestructura de la cepa CSm4, pudimos comprobar la presencia del Sm en el interior de la célula (Figura 14). Aunque con la espectroscopia de rayos X de dispersión no hemos podido comprobar en detalle en qué zona del interior de las células se acumula el Sm, Rezanka *et al.* (2016) observaron que *Desmodesmus quadricauda* acumula de forma diferente los distintos lantánidos, el Nd y el Ce se acumulan preferentemente en los cloroplastos, mientras que el La y el Gd se distribuyen por el citoplasma (Řezanka *et al.*, 2016). Debido a estas variaciones entre lantánidos y a las que puedan existir al tratarse de una especie diferente, serían necesarios estudios específicos con *Chlamydomonas sp.* y con el Sm para determinar en qué zonas concretas de las células se acumula este elemento preferentemente.

Un modelo complejo con microorganismos extremófilos

El aumento de trabajos relacionados con la utilización de microalgas para la biorremediación se debe a que actualmente nos encontramos ante la necesidad de un cambio en las estrategias de consumo y de aprovechamiento de los recursos.

La explotación de recursos actual no es sostenible y el debate salta a los medios cada vez que aparece una nueva crisis. De hecho, ya existen propuestas de organismos internacionales, asumidas a nivel mundial, como los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), para garantizar modalidades de consumo y producción sostenible en forma de economía circular. Los residuos metálicos y electrónicos pueden suponer una oportunidad para recuperar metales críticos. A nivel mundial, solo se recoge y recicla debidamente el 17,4 % de los residuos electrónicos (Forti, Baldé, Kuehr, & Bel, 2020). En el paradigma

de una economía circular, los residuos electrónicos deberían considerarse como una fuente de materias primas secundarias de los que obtener elementos como las tierras raras de una forma más sostenible.

El primer reto que nos encontramos en el tratamiento del residuo metálico suministrado por Lyrsa S.L. es su estado sólido. Buscando entre otros procesos que desarrollan los microorganismos, la biolixiviación, no es un concepto nuevo y encontramos numerosos trabajos con distintas aproximaciones que proponen tratar los residuos sólidos con este método. Se han propuesto procesos de biolixiviación de metales y tierras raras de residuos electrónicos en las revisiones realizadas por Gu *et al.* (2016) y por Ilyas y Lee (2014) (Gu, Wu, Xu, Mu, & Zuo, 2016; Ilyas & Lee, 2014). El principal objetivo de la biolixiviación es la recuperación de metales preciosos como el Au, Ag o el Pd a partir de menas residuales o de escombreras, pero también la recuperación de metales críticos como Cu, Al, Ni, Zn, Li o las tierras raras. En nuestro caso, para garantizar el crecimiento de los cultivos microalgales de ChlSG y EuVP necesitábamos un medio líquido. A partir del residuo sólido y mediante un proceso de biolixiviación conseguimos pasar una fracción importante de metales a fase líquida. Existe numerosa bibliografía sobre la captura biológica de metales a partir de lixiviados y de soluciones de metales, y que ha sido revisada por Carvajal-Flórez y Santiago-Alonso Cardona-Gallo, 2019; Dobson y Burgess, 2007; He y Chen, 2014; Ismail *et al.*, 2014 o Johnson y Hallberg, 2005, por nombrar algunos de ellos (Abbas, Ismail, Mostafa, & Sulaymon, 2014; Carvajal-Flórez & Cardona-Gallo, 2019; He & Chen, 2014; D. B. Johnson & Hallberg, 2005). Sin embargo, ninguno propone la unión de estos dos procesos biológicos, biolixiviación y biocaptura, para recuperar metales a partir de residuos metálicos.

Otro problema, es la compleja composición del material de partida si este proviene de residuos electrónicos. En el material analizado encontramos la siguiente composición de metales: zinc (7,3 %), aluminio (5,9 %), titanio (5,2 %), magnesio (4,6 %), y encontramos también importantes concentraciones de bario (3,35 %), manganeso (3,3 %), plomo (1,6 %) y cobre (1 %) (Se puede observar el resto de la composición en la Tabla 7). El otro 75 % de la composición del material, está compuesto por plásticos y otros materiales orgánicos. En otros casos, como en Cui and Forssber (2007) o en Ilyas *et al.* (2007) se analizó la composición de residuos de placas de circuitos impresos y las cantidades de metales variaban entre: 10–27 % Cu, 8–38 % Fe, 2–19 % Al, 0,3–2 % Ni (Cui & Forssberg, 2007; Ilyas, Anwar, Niazi, & Afzal Ghauri, 2007). En los últimos años se

vislumbra una disminución de la presencia de metales preciosos y un aumento de las tierras raras. Esta composición es importante, porque la eficacia de la lixiviación llevada a cabo por las bacterias va a depender del material de partida (Brandl, Bosshard, & Wegmann, 2001; Qu & Lian, 2013; Tran et al., 2011) y de las condiciones en las que se lleve a cabo la lixiviación. La densidad del medio preparado va a afectar directamente a la disolución de los metales, ya que un medio muy denso no favorece el crecimiento celular (Madrigal-Arias et al., 2015; Mishra, Kim, Ralph, Ahn, & Rhee, 2008), para evitar esto, preparamos un medio con una densidad intermedia de residuos de 1 % (w/v) considerados como un valor óptimo para extraer metales y tierras raras (Marra, Cesaro, Rene, Belgiorno, & Lens, 2018).

El otro factor importante, van a ser los microorganismos utilizados (Brandl et al., 2001; Ilyas, Lee, & Chi, 2013; Vestola et al., 2010). Se han obtenido mejores resultados en estudios con consorcios adaptados y bajas densidades de residuos. Ilyas *et al.* (2007) compara cultivos naturales, cultivos adaptados y cultivos adaptados de bacterias termofílicas, y basuras electrónicas lavadas o sin lavar en $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 18 días y el consorcio adaptado fue el más eficiente (89 % Cu, 81 % Ni, 79 % Al, y 83 % Zn) (Ilyas et al., 2007). Wu *et al.* (2018) realizó este proceso con un consorcio “salvaje” obteniendo un 100 % de eficacia de lixiviación a las 2 h con una densidad de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Con nuestro consorcio obtuvimos mejores cinéticas y mejor eficacia para el Al, Cu o el Zn que Ilyas *et al.* (2007), y una eficacia parecida, pero peor cinética que Wu *et al.* (2018) (Ilyas et al., 2007; Wu, Liu, Zhang, Zhu, & Tan, 2018).

El consorcio estudiado movilizó diversos metales, entre ellos algunos de los considerados críticos, como el U, o metales preciosos como el Au (Tabla 7). También observamos la movilización de varias tierras raras hacia la fase líquida: Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, and Yb (Tabla 8). No se observaron estos elementos en la solución obtenida del control, por lo que su aparición en el lixiviado parece estar relacionado con la actividad del consorcio. La movilización selectiva de los distintos metales está mediada por los procesos de oxidación/reducción y por la atracción de los protones de los ácidos que se están formando. Por lo tanto, metales con potenciales de electrodo más bajos (Al o el Zn) se oxidan y por lo tanto se disuelven, antes que otros metales que requieren más tiempo (como el Cu). Esta tendencia que observamos en nuestros resultados, también se observan en trabajos anteriores de otros autores (Marra et al., 2018; Utimura, Rosario, Botelho, Tenório, & Espinosa, 2017).

En cuanto a la recuperación de tierras raras de residuos electrónicos en la revisión de Dev. *et al.* (2020) sólo un par de estudios proponen procesos de biolixiviación a partir de estos materiales (Dev *et al.*, 2020). Beolchini *et al.* (2012) recuperaron metales, incluyendo ytrio (Y) de polvos de fluorescentes, utilizando un consorcio de bacterias Fe/S oxidantes, con un 70 % de rendimiento (Beolchini, Fonti, Dell'Anno, Rocchetti, & Vegliò, 2012). Marra *et al.* (2018) han realizado un proceso de dos pasos, primero extrayendo de residuos electrónicos pulverulentos tierras raras y movilizándolo casi el 99 % de Ce, Eu y Nd y el 80 % de Y y La, tras 8 días de exposición a bacterias acidofílicas; y en un segundo paso con bacterias cianogénicas, no se observó ninguna extracción de tierras raras, lo que sugirió que para la movilización de estos elementos no están implicados los procesos de complexolisis (Marra *et al.*, 2018). Gracias a la identificación del consorcio bacteriano, encontramos como bacterias mayoritarias especies acidofílicas, lo que explica la movilización de Ce, La, Y y Nd que alcanzaron valores de entre 5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ya en el día 7.

Hemos utilizado dos especies muy distintas de microalgas para la captura. Ambas especies ChlSG y EugVP son dos microalgas extremófilas capaces de sobrevivir a pH ácido y sobrevivieron en el lixiviado enriquecido con BG₁₁. Este enriquecimiento del medio explica el aumento en la presencia de Fe y Mo que observamos al inicio del experimento de captura. En los resultados observamos la biocaptura con ambas especies de 24 de los 33 elementos analizados, presentes en el control químico. Ambas especies retuvieron del orden de μg de Al, Fe, Zn, Pb, Cu y Mn. En cuanto a las tierras raras, ChlSG presentó en general mayores valores de captura (137 ng de Gd o 34 ng de Pr) excepto para el La que EugVP capturó más. No es extraño encontrar diferencias en la captura de las dos cepas por las diferencias intrínsecas de las dos especies:

- ChlSG son microalgas verdes, biflageladas, unicelulares con una forma ovalada de unos 10 μm de diámetro, y que poseen pared celular.
- EugVP son protozoos microscópicos con una forma alargada vermiforme de entre 40 y 60 μm de longitud y 8-12 μm de anchura, que poseen dos flagelos con distinto tamaño y cubiertos por una membrana celular desprovista de celulosa.

Además, durante el experimento también observamos diferencias en el crecimiento, EugVP parece mantenerse en crecimiento exponencial tras el día 12 ($\sim 2,8 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹), mientras que ChlSG parece haber llegado a la fase estacionaria alcanzando $\sim 4,8 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹ y disminuyendo la tasa de crecimiento respecto al día 6.

En la captura de metales por *chlorophytas*, parecen producirse dos fenómenos: bioadsorción y bioacumulación. El proceso de bioacumulación consiste en la internalización del metal dentro de la célula, mientras que el de bioadsorción consiste en la unión de los metales a la superficie de la célula y en el caso de *C. reinhardtii*, a la pared celular. La pared celular o la membrana citoplasmática, van a participar en los dos procesos por ser la primera barrera que está en contacto con el medio (Spain et al., 2021). La pared celular está compuesta por proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales poseen diferentes grupos con carga negativa, que pueden atraer y formar uniones con los cationes de los metales disueltos en el medio (Spain et al., 2021). Pero además van a encontrarse la parte externa de proteínas transmembrana específicas o canales de internalización de metales, que permitirían la entrada de compuestos, y por ejemplo de Sm.

Los mecanismos de captura de metales de las dos especies pueden estar siendo diferentes. Aunque EugVP captura más cantidad por célula, ChlG captura más por biovolumen y teniendo en cuenta la mayor tasa de crecimiento de ChlSG podríamos decir que presenta una mejor eficacia de captura. Como hemos comentado con anterioridad, la pared celular de *Chlamydomonas sp.* tiene una gran afinidad por los cationes metálicos, gracias a los grupos negativos de sus componentes (Collard & Matagne, 1990). La cantidad de grupos carboxilos de las pectinas y glicoproteínas juegan un papel dominante en las uniones con los metales que no se encuentran hidratados (Van & Gillet, 1982). Es una especie que ha sido utilizada en varios trabajos para este tipo de capturas de metales contenidos en disoluciones de distinta composición (Bayramoğlu *et al.*, 2006; Flouty and Estephane, 2012; Wan Maznah, Al-Fawwaz and Surif, 2012; Baselga-Cervera *et al.*, 2018). Se ha comprobado la importancia de la pared en *C. reinhardtii* para la captura tanto de partículas de CeO₂ como del catión Ce³⁺ (Kosak née Röhder *et al.*, 2018).

Por otro lado, la membrana que rodea a *Euglena sp.* está compuesta de una capa proteínica bajo la que se encuentran microtúbulos con una gran concentración de grupos polares cargados, aminoácidos y residuos de azúcares (Nakano, Urade, Urade, & Kitaoka, 1987). Las capturas realizadas por este género en trabajos anteriores han referido cantidades muy bajas o despreciables de bioadsorción de Cd (Santiago-Martínez *et al.*, 2015) y hay trabajos como el de Sánchez *et al.* (2017) que sugieren que este mecanismo de captura es improductivo. Sin embargo, en estudios comparando las dos especies, el mecanismo de bioacumulación intracelular parece ser mayor en *Euglenas* que en *Chlamydomonas* tanto

para Cd (Moreno-Sánchez, Rodríguez-Enríquez, Jasso-Chávez, Saavedra, & García-García, 2017), como para el Zn (Sánchez-Thomas, Moreno-Sánchez, & García-García, 2016). Si una especie es capaz de capturar mediante dos mecanismos (bioacumulación y bioadsorción) y la otra solo por bioacumulación, esto podría estar también influyendo en los resultados obtenidos en este trabajo.

Entre los distintos metales podemos observar distintos patrones cinéticos (Figura 17), desde elementos que se mantienen constantes, como el caso del Ba para las dos especies o como ocurre con el Sm en el caso de EugVP. También existen metales cuya biocaptura aumenta a lo largo del tiempo como la Ag, el Co, el Cu, el Mn, el Mo o el Zn con ambas especies. Pero también se observan fenómenos de desorción como en el caso de U en ChlSG o el Fe y el Pb en ambas especies. Estas variaciones entre las dos especies las podemos explicar además de por los distintos fenómenos de captura que se estén dando, como hemos comentado antes, porque ChlSG en la última medida había alcanzado una fase estacionaria mientras que EugVP seguía en su fase exponencial de crecimiento (Figura 17). También debemos tener en cuenta otros factores, como las distintas concentraciones iniciales o la competición por los sitios de unión entre los distintos metales (Aharchaou et al., 2020). Por ejemplo, en estudios realizados con *C. reinhardtii* las REE parecen compartir los mismos sitios de unión y las mismas rutas de biocaptura (Yang, Tan, Zhu, & Wilkinson, 2014; Yang & Wilkinson, 2018) lo que hace que entren en competición entre ellos (Yang et al., 2014) y con otros elementos como el Ca (Yang & Wilkinson, 2018). Esto puede ser un inconveniente para resolver uno de los problemas actuales que encontramos en la captura de REE y es la obtención selectiva de estos elementos (Costa, Silva, & Vieira, 2020).

Las microalgas son una buena herramienta para la captura de metales, que nos permitiría junto con otros procesos biológicos como la biolixiviación, reaprovechar metales ya utilizados y dar salida como un nuevo recurso a la basura tecnológica ya acumulada. Aunque la utilización de algas no vivas está más extendida ya que capturan mayores concentraciones de metales pesados (Lin, Li, Luan, & Dai, 2020) una vez superada la dificultad de la toxicidad, el estudio de la captura de estos elementos por microalgas vivas nos puede permitir comprender los mecanismos con los que estos microorganismos llevan a cabo estas funciones y las implicaciones que tienen. Además, los estudios de mejora de microalgas pueden ayudarnos a seleccionar cepas con características que permitan

optimizar esa captura. Nuevos abordajes pueden permitirnos descubrir nuevas características morfométricas o moleculares para esa selección de microorganismos.

IX. CONCLUSIONES:

“I never see what has been done; I only see what remains to be done.”

Marie Curie

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.”

Miguel de Unamuno

Gracias a los resultados obtenidos podemos concluir que:

- El análisis de fluctuación es un buen método para seleccionar organismos resistentes a altas concentraciones de Sm en condiciones de pH ácido.
- Sin embargo, una elevada tolerancia al Sm y al pH ácido no incrementa necesariamente la capacidad de *C. reinhardtii* de capturar de este elemento.
- La selección por caída de las células resistentes de *Chlamydomonas reinhardtii*, puede considerarse un proceso eficiente para mejorar la captura de Sm aunque el tamaño de las células sea menor.
- La recuperación de metales de residuos con alto contenido en metales podría darse con un proceso secuencial mediado por microorganismos: lixiviado con un consorcio de bacterias quimiolitotróficas y la captura del medio líquido con microalgas extremófilas.
 - o Durante la primera fase, obtuvimos un rendimiento de casi el 100 % para el Cu, Co, Al y Zn.
 - o La captura de metales con la cepa ChlSG fue del orden de µg para el Zn, Al, Cu y el Mn y de ng en el caso de las tierras raras.
- Parámetros fisiológicos y morfométricos pueden ser prometedoras herramientas para identificar fenotipos interesantes para aplicaciones biotecnológicas.
- El aprovechamiento de las respuestas que las microalgas dan ante distintos medios y la selección de las microalgas con el fenotipo o genotipo adecuado, puede traducirse en buenas aplicaciones tecnológicas como el desarrollo de biosensores para el monitoreo de contaminantes.

IX. CONCLUSIONS:

Due to the results that we had obtained, we can conclude that:

- The fluctuation analysis is a good method to obtain and select resistant organisms to high Sm concentrations in acid pH.
- A high tolerance to Sm and acid pH does not necessarily increase the ability of *C. reinhardtii* to capture this element.
- *Chlamydomonas reinhardtii* resistant cells selected by fall down, can be considered an efficient method to improve Sm capture, although the size of the cells is smaller than the first population.
- The recovery of metals from e-scrubs with high metal content can be done by a sequential process mediated by microorganisms: bioleaching with a quimiolitotrofic bacterial consortium and then with the capture from the leachate obtained by extremophile microalgae.
 - The bacterial consortium yield was almost 100% for Cu, Co, Al and Zn.
 - We recover µg of metals like Zn, Al, Cu and Mn, and ng of rare earth elements with the strain ChlSG.
- Physiological and morphometric parameters can be used as tools to identify interesting phenotypic strains for biotechnological applications.
- Microalgae selection with the suitable phenotypical or genetic characteristics and its behaviour in different media, can be used to develop good technological applications like the biosensors for the detection of new pollutants.

X. BIBLIOGRAFÍA:

- Abbas, S. H., Ismail, I. M., Mostafa, T. M., & Sulaymon, A. H. (2014). Bisorption of heavy metals: A review Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology*, 3(4), 74–102.
- Aharchaou, I., Bahloul, F., & Fortin, C. (2020). Competition Among Trivalent Elements (Al, Eu, Fe, Gd, Nd, Tm, and Y) for Uptake in Algae and Applicability of the Biotic Ligand Model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00786-z>
- Alonso, E., Sherman, A. M., Wallington, T. J., Everson, M. P., Field, F. R., Roth, R., & Kirchain, R. E. (2012). Evaluating rare earth element availability: A case with revolutionary demand from clean technologies. *Environmental Science and Technology*, 46(6), 3406–3414. <https://doi.org/10.1021/es203518d>
- Alvarez, H. M. (2015). Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. *Química Viva*, 14, 18–25.
- Andrade Couce, M., Mateos Beato, A., & Guitian Ojea, F. (1985). Fertilizing power of sewage sludges: effect on the total content and availability of Fe, Mn, Cu, Co and Ni. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 44(7/8), 1123–1139. Retrieved from <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302044436>
- Arihilam, N. H., & Arihilam, E. C. (2019). Impact and control of anthropogenic pollution on the ecosystem – A review. *Journal of Bioscience and Biotechnology Discovery*, 4(3), 54–59. <https://doi.org/10.31248/JBBD2019.098>
- Arya, S., & Kumar, S. (2020). E-waste in India at a Glance: Current Trends, Regulations, Challenges and Management Strategies. *Journal of Cleaner Production*, 122707. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122707>
- Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N., & Moreno-Sánchez, R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology* 2003 180:1, 180(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S00203-003-0547-2>
- Ayala, F., & Kiger, J. (1980). *Modern genetics*. (Benjamin/Cummings Publishing Company, Ed.). Menlo Park, CA. Retrieved from <https://ixtheo.de/Record/024520705>
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., & McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2006.02.006>

- Balaram, V. (2019). Rare earth elements: A review of applications, occurrence, exploration, analysis, recycling, and environmental impact. *Geoscience Frontiers*, 10(4), 1285–1303. <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2018.12.005>
- Balzano, S., Sardo, A., Blasio, M., Chahine, T. B., Dell'Anno, F., Sansone, C., & Brunet, C. (2020). Microalgal metallothioneins and phytochelatins and their potential use in bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 517.
- Bannon, C. C., & Campbell, D. A. (2017). Sinking towards destiny: High throughput measurement of phytoplankton sinking rates through time-resolved fluorescence plate spectroscopy. *PLoS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185166>
- Baos, R., García-Villada, L., Agrelo, M., López-Rodas, V., Hiraldo, F., & Costas, E. (2002). Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: An experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcóllar mine spill. *European Journal of Phycology*, 37(4), 593–600. <https://doi.org/10.1017/S096702620200392X>
- Baselga-Cervera, B., Costas, E., Bustillo-Avendaño, E., & García-Balboa, C. (2016). Adaptation prevents the extinction of *Chlamydomonas reinhardtii* under toxic beryllium. *PeerJ*, 2016(3). <https://doi.org/10.7717/peerj.1823>
- Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., Díaz-Alejo, H. M., Costas, E., & López-Rodas, V. (2019). Rapid Colonization of Uranium Mining-Impacted Waters, the Biodiversity of Successful Lineages of Phytoplankton Extremophiles. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01431-6>
- Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., López-Rodas, V., Fernández Díaz, M., & Costas, E. (2019). Evidence of microalgal isotopic fractionation through enrichment of depleted uranium. *Scientific Reports*, 9(1), 1973. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38740-2>
- Baselga-Cervera, B., Romero-López, J., García-Balboa, C., Costas, E., & López-Rodas, V. (2018). Improvement of the Uranium Sequestration Ability of a *Chlamydomonas* sp. (ChlSP Strain) Isolated From Extreme Uranium Mine Tailings Through Selection for Potential Bioremediation Application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00523>
- Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., & Arica, M. Y. (2006). Biosorption of

- mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *International Journal of Mineral Processing*, 81(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2006.06.002>
- Belfiore, N. M., & Anderson, S. L. (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489(2–3), 97–122. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(01\)00065-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(01)00065-5)
- Beolchini, F., Fonti, V., Dell’Anno, A., Rocchetti, L., & Vegliò, F. (2012). Assessment of biotechnological strategies for the valorization of metal bearing wastes. *Waste Management*, 32(5), 949–956. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.10.014>
- Berg, J., Brandt, K. K., Al-Soud, W. A., Holm, P. E., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Nybroe, O. (2012). Selection for Cu-tolerant bacterial communities with altered composition, but unaltered richness, via long-term cu exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7438–7446. <https://doi.org/10.1128/AEM.01071-12>
- Besaury, L., Bodilis, J., Delgas, F., Andrade, S., De la Iglesia, R., Ouddane, B., & Quillet, L. (2013). Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1–2), 16–25. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2012.12.007>
- Blaby, I. K., Blaby-Haas, C. E., Tourasse, N., Hom, E. F. Y., Lopez, D., Aksoy, M., ... Prochnik, S. (2014, October 1). The *Chlamydomonas* genome project: A decade on. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.05.008>
- Bobba, S., Carrara, S., Huisman, J., Mathieux, F., & Pavel, C. (2020). Critical Raw Materials for Strategic Technologies and Sectors in the EU - a Foresight Study. *European Commission*, 100. <https://doi.org/10.2873/58081>
- Bouskill, N. J., Lim, H. C., Borglin, S., Salve, R., Wood, T. E., Silver, W. L., & Brodie, E. L. (2013). Pre-exposure to drought increases the resistance of tropical forest soil bacterial communities to extended drought. *ISME Journal*, 7(2), 384–394. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2012.113>
- Brandl, H., Bosshard, R., & Wegmann, M. (2001). Computer-munching microbes: Metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00188-2)
- Brown, P. H., Rathjen, A. H., Graham, R. D., & Tribe, D. E. (1990, January 1). Chapter

- 92 Rare earth elements in biological systems. *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-1273\(05\)80135-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1273(05)80135-7)
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198–207. <https://doi.org/10.1006/EESA.1999.1860>
- Cao, J., Lu, B., Chen, Y., Zhang, X., Zhai, G., Zhou, G., ... Schnoor, J. L. Extended producer responsibility system in China improves e-waste recycling: Government policies, enterprise, and public awareness, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* § (2016). Elsevier Ltd. Retrieved from <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-d154d4d6-0343-31a9-b777-3b6281f211bb>
- Carvajal-Flórez, E., & Cardona-Gallo, S.-A. (2019). Technologies applicable to the removal of heavy metals from landfill leachate. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(16), 15725–15753. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-04888-7>
- Cavalier-Smith, T., Brasier, M., & Embley, T. M. (2006). Introduction: how and when did microbes change the world? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), 845. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2006.1847>
- Charalampides, G., Vatalis, K. I., Apostoplos, B., & Ploutarch-Nikolas, B. (2015). Rare Earth Elements: Industrial Applications and Economic Dependency of Europe. *Procedia Economics and Finance*, 24, 126–135. [https://doi.org/10.1016/s2212-5671\(15\)00630-9](https://doi.org/10.1016/s2212-5671(15)00630-9)
- Chen, Y.-S., Lai, S.-B., & Wen, C.-T. (2006). The Influence of Green Innovation Performance on Corporate Advantage in Taiwan. *Springer*, 67(4), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s10551-006-9025-5>
- Cheng, S. Y., Show, P. L., Lau, B. F., Chang, J. S., & Ling, T. C. (2019, November 1). New Prospects for Modified Algae in Heavy Metal Adsorption. *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.04.007>
- Chua, H. (1998). Bio-accumulation of environmental residues of rare earth elements in aquatic flora *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in Guangdong Province of China. *Science of the Total Environment*, 214(1–3), 79–85. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00055-2)

- Čížková, M., Mezricky, D., Rucki, M., Tóth, T. M., Náhlík, V., Lanta, V., ... Vítová, M. (2019). Bio-mining of Lanthanides from Red Mud by Green Microalgae. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/molecules24071356>
- CM, K., AK, F., & SK, S. (2021). Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function. *Genome Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-021-02344-9>
- Collard, J. M., & Matagne, R. F. (1990). Isolation and genetic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* strains resistant to cadmium. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2051–2055.
- Commoner, B. (1998). What is Yet to be Done. *New Solutions: A Journal of Environmental and Occupational Health Policy*, 8(1), 75–87. <https://doi.org/10.1177/104829119800800111>
- Correa, I., Drews, P., Botelho, S., De Souza, M. S., & Tavano, V. M. (2017). Deep learning for microalgae classification. *Proceedings - 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications, ICMLA 2017, 2017-December*, 20–25. <https://doi.org/10.1109/ICMLA.2017.0-183>
- Costa, T. B. da, Silva, M. G. C. da, & Vieira, M. G. A. (2020). Recovery of rare-earth metals from aqueous solutions by bio/adsorption using non-conventional materials: a review with recent studies and promising approaches in column applications. *Journal of Rare Earths*, 38(4), 339–355. <https://doi.org/10.1016/J.JRE.2019.06.001>
- Costas, E., Carrillo, E., Ferrero, L. M., Agrelo, M., Garcia-Villada, L., Juste, J., & López-Rodas, V. (2001). Mutation of algae from sensitivity to resistance against environmental selective agents: The ecological genetics of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) under lethal doses of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea herbicide. *Phycologia*, 40(5), 391–398. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-5-391.1>
- Costas, E., Fernández, J., Piqueras, P., & Valera, M. (1988). A precise ultrastructural quantification in *Prorocentrum micans* Ehrenberg (Dinophyceae) by stereology. *Investigación Pesquera (Spain)*, 52 (1), 37–45.
- Costas, E, González-Gil, S., Aguilera, A., & López-Rodas, V. (1992). A Morphometrical Analysis of Ultrastructural Changes during the Cell Cycle of *Prorocentrum triestinum* Using Stereology in: *Botanica Marina* Volume 35 Issue 5 (1992). *Botanica Marina*, 35, 429–436.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/botm.1992.35.5.429>
- Costas, Eduardo, Flores-Moya, A., & López-Rodas, V. (2008). Rapid adaptation of phytoplankters to geothermal waters is achieved by single mutations: were extreme environments “Noah’s Arks” for photosynthesizers during the Neoproterozoic “snowball Earth”? <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02620.x>
- Costas, Eduardo, Flores-Moya, A., Perdignes, N., Maneiro, E., Blanco, J. L., García, M. E., & López-Rodas, V. (2007). How eukaryotic algae can adapt to the Spain’s Rio Tinto: A neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem. *New Phytologist*, 175(2), 334–339. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02095.x>
- Costas, Eduardo, Gonzalez, R., López-Rodas, V., & Huertas, I. E. (2013). Mutation of microalgae from antifouling sensitivity to antifouling resistance allows phytoplankton dispersal through ships’ biofouling. *Biological Invasions*, 15(8), 1739–1750. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0405-8>
- Crémazy, A. C., Campbell, P. G. C., & Fortin, C. (2013). The Biotic Ligand Model Can Successfully Predict the Uptake of a Trivalent Ion by a Unicellular Alga Below pH 6.50 but not Above: Possible Role of Hydroxo-Species. *Environ. Sci. Technol*, 47, 34. <https://doi.org/10.1021/es3038388>
- Cucchiella, F., D’Adamo, I., Lenny Koh, S. C., & Rosa, P. (2015). Recycling of WEEEs: An economic assessment of present and future e-waste streams. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.010>
- Cui, J., & Forssberg, E. (2007). Characterization of shredded television scrap and implications for materials recovery. *Waste Management*, 27(3), 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.02.003>
- Dev, S., Sachan, A., Dehghani, F., Ghosh, T., Briggs, B. R., & Aggarwal, S. (2020, October). Mechanisms of biological recovery of rare-earth elements from industrial and electronic wastes: A review. *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124596>
- Dickinson, A. W., Power, A., Hansen, M. G., Brandt, K. K., Piliposian, G., Appleby, P., ... Vos, M. (2019). Heavy metal pollution and co-selection for antibiotic resistance: A microbial palaeontology approach. *Environment International*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105117>
- Doshi, H., Ray, A., Kothari, I. L., & Gami, B. (2006). Spectroscopic and Scanning

- Electron Microscopy Studies of Bioaccumulation of Pollutants by Algae. *Current Microbiology* 2006 53:2, 53(2), 148–157. <https://doi.org/10.1007/S00284-005-0401-7>
- Douay, F., Pelfrêne, A., Planque, J., Fourrier, H., Richard, A., Roussel, H., & Girondelot, B. (2013). Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: Metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(5), 3665–3680. <https://doi.org/10.1007/S10661-012-2818-3/FIGURES/3>
- Durante, G., Basset, A., Stanca, E., & Roselli, L. (2019). Allometric scaling and morphological variation in sinking rate of phytoplankton. *Journal of Phycology*. <https://doi.org/10.1111/jpy.12916>
- Dushyantha, N., Batapola, N., Ilankoon, I. M. S. K., Rohitha, S., Premasiri, R., Abeysinghe, B., ... Dissanayake, K. (2020, July 1). The story of rare earth elements (REEs): Occurrences, global distribution, genesis, geology, mineralogy and global production. *Ore Geology Reviews*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2020.103521>
- Emsley, J. (2011). Nature's building blocks: an AZ guide to the elements.
- Evseeva, T., Geras'kin, S., Majstrenko, T., Brown, J., & Belykh, E. (2010). Comparative estimation of ^{232}Th and stable Ce (III) toxicity and detoxification pathways in freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 81(10), 1320–1327. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.028>
- Fári, M. G., & Kralovánszky, U. P. (2006). The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science*, 12(1). <https://doi.org/10.31421/IJHS/12/1/615>
- Favot, M., & Massarutto, A. (2019). Rare-earth elements in the circular economy: The case of yttrium. *Journal of Environmental Management*, 240, 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.002>
- Flouty, R., & Estephane, G. (2012). Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. *Journal of Environmental Management*, 111, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.042>
- Forti, V., Baldé, C. P., Kuehr, R., & Bel, G. (2020). Observatorio mundial de los residuos electrónicos 2020: Cantidades, flujos y potencial de la economía circular.

- Universidad de Las Naciones Unidas (UNU)/Instituto de Las Naciones Unidas Para Formación Profesional e Investigaciones (UNITAR) – Coorganizadores Del Programa SCYCLE, Unión Internacional de Telecomunicaciones (UIT) y Asociación Internacional de Residuos S.* <https://doi.org/978-92-808-9127-0>
- François, F., Lombard, C., Guigner, J. M., Soreau, P., Brian-Jaisson, F., Martino, G., ... Rebuffat, S. (2012). Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1097–1106. <https://doi.org/10.1128/AEM.06522-11>
- Gammons, C. H., Wood, S. A., Jonas, J. P., & Madison, J. P. (2003). Geochemistry of the rare-earth elements and uranium in the acidic Berkeley Pit lake, Butte, Montana. *Chemical Geology*, 198(3–4), 269–288. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(03)00034-2)
- García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., García-Sánchez, A., Igual, J. M., López-Rodas, V., & Costas, E. (2013). Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 116–123. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2013.10.003>
- García-Balboa, Camino, Martínez-Alesón García, P., López-Rodas, V., Costas, | Eduardo, & Baselga-Cervera, B. (2022). Microbial biominers: Sequential bioleaching and biouptake of metals from electronic scraps. *MicrobiologyOpen*, 11(1), e1265. <https://doi.org/10.1002/MBO3.1265>
- García-Meza, J. V., Barrangue, C., & Admiraal, W. (2005). Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(3), 573–581. <https://doi.org/10.1897/04-064R.1>
- García-Villada, L., López-Rodas, V., Bañares-España, E., Flores-Moya, A., Agrelo, M., Martín-Otero, L., & Costas, E. (2002). Evolution of microalgae in highly stressing environments: An experimental model analyzing the rapid adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* (Chlorophyceae) from sensitivity to resistance against 2,4,6-trinitrotoluene by rare preselective muta. *Journal of Phycology*, 38(6), 1074–1081. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01128.x>
- Gemmell, B. J., Oh, G., Buskey, E. J., & Villareal, T. A. (2016). Dynamic sinking behaviour in marine phytoplankton: rapid changes in buoyancy may aid in nutrient uptake. *Proceedings. Biological Sciences*, 283(1840).

- <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1126>
- Genty, B., Briantais, J. M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 990(1), 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Giese, E. (2018). Rare Earth Elements: therapeutic and diagnostic applications in modern medicine. *Clinical and Medical Reports*, 2(1). <https://doi.org/10.15761/cmr.1000139>
- Giese, E. C., Caio, ., & Jordão, S. (2019). Biosorption of Lanthanum and Samarium by chemically modified free *Bacillus subtilis* cells. *Applied Water Science*, 9, 3. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-1052-3>
- Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10–11), 1389–1414. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8)
- Goecke, F., Jerez, C. G., Zachleder, V., Figueroa, F. L., Bisová, K., Rezanka, T., & Vítová, M. (2015). Use of lanthanides to alleviate the effects of metal ion-deficiency in *Desmodesmus quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 2. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00002>
- Gong, X., Hong, M., Wang, Y., Zhou, M., Cai, J., Liu, C., ... Hong, F. (2011). Cerium relieves the inhibition of photosynthesis of maize caused by manganese deficiency. *Biological Trace Element Research*, 141(1–3), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8716-z>
- Gonzalez, V., Vignati, D. A. L., Leyval, C., & Giamberini, L. (2014). Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: Are they a uniform group beyond chemistry? *Environment International*, 71, 148–157. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.06.019>
- Graedel, T. E., Harper, E. M., Nassar, N. T., Nuss, P., Reck, B. K., & Turner, B. L. (2015). Criticality of metals and metalloids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(14), 4257–4262. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1500415112/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Grand View Research. (2018). *E-waste Management Market Size & Share | Industry Report, 2018-2025*. <https://doi.org/GVR-2-68038-397-3>

- Groendahl, S., Kahlert, M., & Fink, P. (2017). The best of both worlds: A combined approach for analyzing microalgal diversity via metabarcoding and morphology-based methods. *PLOS ONE*, 12(2), e0172808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172808>
- Gu, Y., Wu, Y., Xu, M., Mu, X., & Zuo, T. (2016). Waste electrical and electronic equipment (WEEE) recycling for a sustainable resource supply in the electronics industry in China. *Journal of Cleaner Production*, 127, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.041>
- Gupta, S. K., Ansari, F. A., Shriwastav, A., Sahoo, N. K., Rawat, I., & Bux, F. (2016). Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. *Journal of Cleaner Production*, 115, 255–264. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2015.12.040>
- Hamdy, A. A. (2000). Biosorption of heavy metals by marine algae. *Current Microbiology*, 41(4), 232–238. <https://doi.org/10.1007/S002840010126>
- Hammond, C.R. (2000) The Elements. *Handbook of Chemistry and Physics* https://www.academia.edu/download/30791528/The_Elements.pdf
- Hardoy, J. E., & Satterthwaite, D. (1991). Environmental problems of third world cities: A global issue ignored? *Public Administration and Development*, 11(4), 341–361. <https://doi.org/10.1002/PAD.4230110405>
- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Biology*, 52, 363–406. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.52.1.363>
- Haxel, G. B., Hendrick, J. B., & Orris, G. J. (2002). Rare earth elements: critical resources for high technology. *Science for a Changing World*, 87(2). Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=sd5zZG3EqAsC&oi=fnd&pg=PP3&dq=Haxel+et+al.+2002&ots=rCftZISigX&sig=Amsza1tR-2C95LpzuwIHOgN5xSc>
- He, J., & Chen, J. P. (2014). A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource Technology*, 160, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.068>
- Heilmann, M., Jurkowski, W., Buchholz, R., Becker, A. M., & Brueck, T. (2015). Biosorption of Neodymium by Selected Photoautotrophic and Heterotrophic Species. *J Chem Eng Process Technol*, 6, 241. <https://doi.org/10.4172/2157->

7048.1000241

- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Isabel, S. (2013). Microalgae taxonomy and breeding. In *Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics* (B.P. Singh, pp. 44–54). Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/286617872_Microalgae_taxonomy_and_breeding
- Hong, S., Candelone, J. P., Patterson, C. C., & Boutron, C. F. (1996). History of ancient copper smelting pollution during Roman and medieval times recorded in Greenland ice. *Science*, 272(5259), 246–249. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5259.246>
- Hoostal, M. J., Bidart-Bouzat, M. G., & Bouzat, J. L. (2008). Local adaptation of microbial communities to heavy metal stress in polluted sediments of Lake Erie. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(1), 156–168. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2008.00522.X>
- Huang, R., Huo, G., Song, S., Li, Y., Xia, L., & Gaillard, J. F. (2019). Immobilization of mercury using high-phosphate culture-modified microalgae. *Environmental Pollution*, 254, 112966. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.112966>
- Ibuot, A., Dean, A. P., McIntosh, O., & Pittman, J. (2017). Metal bioremediation by CrMTP4 over-expressing *Chlamydomonas reinhardtii* in comparison to natural wastewater-tolerant microalgae strains. *Algal Research*, 24 (A), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.002>
- Ilyas, S., Anwar, M. A., Niazi, S. B., & Afzal Ghauri, M. (2007). Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*, 88(1–4), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2007.04.007>
- Ilyas, S., & Lee, J. (2014). Biometallurgical Recovery of Metals from Waste Electrical and Electronic Equipment: a Review. *ChemBioEng Reviews*, 1(4), 148–169. <https://doi.org/10.1002/cben.201400001>
- Ilyas, S., Lee, J. C., & Chi, R. A. (2013). Bioleaching of metals from electronic scrap and its potential for commercial exploitation. *Hydrometallurgy*, 131–132, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.11.010>
- ImageJ. (n.d.). USA: Wayne Rasband National Institutes of Health. Retrieved from <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Javanbakht, V., Alavi, S. A., & Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal

- using microorganisms as biosorbent. *Water Science and Technology*, 69(9), 1775–1787. <https://doi.org/10.2166/WST.2013.718>
- Johnson, D. B., & Hallberg, K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: A review. *Science of the Total Environment*, 338(1-2 SPEC. ISS.), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.002>
- Johnson, M. A. (2009). Missing the Dark Health Effects of Light Pollution Environews. *Environmental Health Perspectives*, 117.
- Karp-Boss, L., Boss, E., & Jumars, P. A. (1996). Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanography and Marine Biology*, 34, 71–107.
- Kim, I., Yang, H. M., Park, C. W., Yoon, I. H., Seo, B. K., Kim, E. K., & Ryu, B. G. (2019). Removal of radioactive cesium from an aqueous solution via bioaccumulation by microalgae and magnetic separation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46586-x>
- Kim, J. I., Linton, E. W., & Shin, W. (2015). Taxon-rich multigene phylogeny of the photosynthetic Euglenoids (Euglenophyceae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 0(AUG), 98. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2015.00098>
- Kirk, J. T. O. (1994). Characteristics of the light field in highly turbid waters: A Monte Carlo study. *Limnology and Oceanography*, 39(3), 702–706. <https://doi.org/10.4319/LO.1994.39.3.0702>
- Klaver, G., Verheul, M., Bakker, I., Petelet-Giraud, E., & Négrel, P. (2014). Anthropogenic Rare Earth Element in rivers: Gadolinium and Lanthanum. Partitioning between the dissolved and particulate phases in the Rhine River and spatial propagation through the Rhine-Meuse Delta (the Netherlands). *Applied Geochemistry*, 47, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.05.020>
- Klemming, J. M. (2002). Capítulo 2: Historia de las teorías evolutivas. In *Evolución: La base de la biología* (pp. 27–43).
- Kosak née Röhder, L. A., Brandt, T., Sigg, L., & Behra, R. (2018). Uptake and effects of cerium(III) and cerium oxide nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 197, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.004>
- Kulaksiz, S., & Bau, M. (2013). Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers. *Earth and Planetary Science Letters*, 362, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2012.11.033>

- Kulshreshtha, A., Agrawal, R., Barar, M., & Saxena, S. (2014). A Review on Bioremediation of Heavy Metals in Contaminated Water. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(7), 44–50. <https://doi.org/10.9790/2402-08714450>
- Laghlimi, M., Baghdad, B., Moussadak, R., El Hadi, H., & Bouaziz, S. (2015). Characterization of soil Heavy Metal Contamination in the Abandoned mine of Zaida (High Moulouya, Morocco). *International Research Journal of Earth Sciences*, 3(3), 1–3. Retrieved from www.isca.me
- Lange, C. N., Figueiredo, A. M. G., Enzweiler, J., & Castro, L. (2016). Trace elements status in the terrain of an impounded vehicle scrapyards. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2016 311:2, 311(2), 1323–1332. <https://doi.org/10.1007/S10967-016-5078-9>
- Lembi, C. A., & Waaland, J. R. (1988). *Algae and human affairs*. Phycological Society of America. Cambridge University Press.
- Li, X. F., Yin, H. Bin, & Su, J. Q. (2012). An Attempt to Quantify Cu-Resistant Microorganisms in a Paddy Soil from Jiaying, China. *Pedosphere*, 22(2), 201–205. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60006-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60006-X)
- Li, X., Zhang, C., Wang, L., & Zhang, S. (1998). Geochemistry of rare earth elements in the mainstream of the Yangtze River, China. *Applied Geochemistry*, 13(4), 451–462. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(97\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(97)00079-6)
- Li, Y., Song, S., Xia, L., Yin, H., García Meza, J. V., & Ju, W. (2019). Enhanced Pb(II) removal by algal-based biosorbent cultivated in high-phosphorus cultures. *Chemical Engineering Journal*, 361, 167–179. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2018.12.070>
- Lin, Z., Li, J., Luan, Y., & Dai, W. (2020). Application of algae for heavy metal adsorption: A 20-year meta-analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110089. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110089>
- Lobban, C., & Harrison, P. (1994). *Seaweed ecology and physiology*. (C. U. Press, Ed.). Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=oDhSjvjJg0EC&oi=fnd&pg=PP16&dq=Lobban+y+Harrison,+1984&ots=aiR0DgwJqD&sig=8IFrYBWKTWELrg1xSTRSu6QnGos>
- López-Rodas, V., Maneiro, E., & Costas, E. (2006). Adaptation of cyanobacteria and microalgae to anthropogenic pollution. *Limnetica*, 25(The ecology of the Iberian

- inland waters: Homage to Ramon Margalef), 403–410.
- López-Rodas, Victoria, Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L. M., Larrauri, A., Martín-Otero, L., & Costas, E. (2001). Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *European Journal of Phycology*, 36(2). <https://doi.org/10.1017/S0967026201003109>
- Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28(6).
- Lyautey, E., Bonnineau, C., Billard, P., Loizeau, J.-L., Naffrechoux, E., Tlili, A., ... Pesce, S. (2021). Diversity, functions and antibiotic resistance of sediment microbial communities from Lake Geneva are driven by the spatial distribution of anthropogenic contamination. *Frontiers in Microbiology*, 0, 3169. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.738629>
- Macfie, S. M., & Welbourn, P. M. (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s002440010122>
- Macmillan, G. A., Clayden, M. G., Chételat, J., Richardson, M. C., Ponton, D. E., Perron, T., & Amyot, M. (2019). Environmental Drivers of Rare Earth Element Bioaccumulation in Freshwater Zooplankton. *Environmental Science and Technology*, 53(3), 1650–1660. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05547>
- Madrigal-Arias, J. E., Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Mendoza-López, M. R., García-Barradas, O., Cruz-Sánchez, J. S., ... Jiménez-Fernández, M. (2015). Bioleaching of Gold, Copper and Nickel from waste cellular phone PCBs and computer goldfinger motherboards by two *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 707–713. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140256>
- Malhotra, N., Hsu, H. S., Liang, S. T., Roldan, M. J. M., Lee, J. S., Ger, T. R., & Hsiao, C. Der. (2020). An Updated Review of Toxicity Effect of the Rare Earth Elements (REEs) on Aquatic Organisms. *Animals 2020*, Vol. 10, Page 1663, 10(9), 1663. <https://doi.org/10.3390/ANI10091663>
- Malik, A. (2004, April). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
- Mancheri, N. A., Sprecher, B., Bailey, G., Ge, J., & Tukker, A. (2019). Effect of Chinese policies on rare earth supply chain resilience. *Resources, Conservation and*

- Recycling*, 142, 101–112. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2018.11.017>
- Mann, H., Fyfe, W. S., & Kerrich, R. (1988). The chemical content of algae and waters: Bioconcentration. *Toxicity Assessment*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1002/tox.2540030103>
- Marin, B., Palm, A., Klingberg, M., & Melkonian, M. (2003). Phylogeny and Taxonomic Revision of Plastid-Containing Euglenophytes based on SSU rDNA Sequence Comparisons and Synapomorphic Signatures in the SSU rRNA Secondary Structure. *Protist*, 154(1), 99–145. <https://doi.org/10.1078/143446103764928521>
- Marra, A., Cesaro, A., Rene, E. R., Belgiorno, V., & Lens, P. N. L. (2018). Bioleaching of metals from WEEE shredding dust. *Journal of Environmental Management*, 210, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.066>
- Martínez-Alesón García, P., García-Balboa, C., Romero-López, J., López-Rodas, V., Costas, E., & Baselga-Cervera, B. (2021). Fluctuation analysis to select for Samarium bio-uptaking microalgae clones the repurposing of a classical evolution experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 215, 112134. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112134>
- Martínez, M., Leyton, Y., Cisternas, L., & Riquelme, C. (2018). Metal Removal from Acid Waters by an Endemic Microalga from the Atacama Desert for Water Recovery. *Minerals*, 8(9), 378. <https://doi.org/10.3390/min8090378>
- Marvá, F., López-Rodas, V., Rouco, M., Navarro, M., Toro, F. J., Costas, E., & Flores-Moya, A. (2010). Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations. *Aquatic Toxicology*, 96(2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.009>
- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., & Goffin, D. (2015). Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10). Retrieved from /pmc/articles/PMC4632732/
- Michod, R. E. (1999). *Darwinian dynamics : evolutionary transitions in fitness and individuality*. (P. U. Press, Ed.). New Jersey: Princeton University Press. Retrieved from <https://press.princeton.edu/books/paperback/9780691050119/darwinian-dynamics>
- Migaszewski, Z. M., & Gałuszka, A. (2015, March 4). The characteristics, occurrence, and geochemical behavior of rare earth elements in the environment: A review.

- Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Taylor and Francis Inc.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2013.866622>
- Mishra, D., Kim, D. J., Ralph, D. E., Ahn, J. G., & Rhee, Y. H. (2008). Bioleaching of metals from spent lithium ion secondary batteries using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Waste Management*, 28(2), 333–338.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.010>
- Monroe, J. G., Srikant, T., Carbonell-Bejerano, P., Becker, C., Lensink, M., Exposito-Alonso, M., ... Weigel, D. (2022). Mutation bias reflects natural selection in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2022, 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04269-6>
- Morel, E., Cui, L., Zerges, W., & Wilkinson, K. J. (2021). Mixtures of rare earth elements show antagonistic interactions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution*, 287, 117594. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.117594>
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Jasso-Chávez, R., Saavedra, E., & García-García, J. D. (2017). Biochemistry and physiology of heavy metal resistance and accumulation in *Euglena*. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 979, pp. 91–121). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1_6
- Nakano, Y., Urade, Y., Urade, R., & Kitaoka, S. (1987). Isolation, Purification, and Characterization of the Pellicle of *Euglena gracilis*. *The Journal of Biochemistry*, 102(5), 1053–1063.
<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A122143>
- Neary, C. R., & Highley, D. E. (1984). The Economic Importance of the Rare Earth Elements. *Rare Earth Element Geochemistry*, 2, 423–466.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42148-7.50017-4>
- Ness, R. W., Morgan, A. D., Colegrave, N., & Keightley, P. D. (2012). Estimate of the spontaneous mutation rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 192(4), 1447–1454. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.145078>
- Nicholson, F. A., Smith, S. R., Alloway, B. J., Carlton-Smith, C., & Chambers, B. J. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of The Total Environment*, 311(1–3), 205–219.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00139-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00139-6)
- Okoro, V., Azimov, U., Munoz, J., Hernandez, H. H., & Phan, A. N. (2019). Microalgae

- cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109364. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2019.109364>
- Pagano, G., Aliberti, F., Guida, M., Oral, R., Siciliano, A., Trifuoggi, M., & Tommasi, F. (2015, October 1). Rare earth elements in human and animal health: State of art and research priorities. *Environmental Research*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.039>
- Panak, P. J., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Geipel, G., Bernhard, G., & Nitsche, H. (2000). Complex formation of U(VI) with Bacillus-isolates from a uranium mining waste pile. *Radiochimica Acta*, 88(2), 71–76. <https://doi.org/10.1524/ract.2000.88.2.071>
- Pang, X., Li, D., & Peng, A. (2002). Application of rare-earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environmental Science and Pollution Research*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF02987462>
- Peltier, E., Vincent, J., Finn, C., & Graham, D. W. (2010). Zinc-induced antibiotic resistance in activated sludge bioreactors. *Water Research*, 44(13), 3829–3836. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.04.041>
- Priyadarshini, E., Priyadarshini, S. S., & Pradhan, N. (2019). Heavy metal resistance in algae and its application for metal nanoparticle synthesis, 103(8), 3297–3316. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09685-3>
- Qu, Y., & Lian, B. (2013). Bioleaching of rare earth and radioactive elements from red mud using *Penicillium tricolor* RM-10. *Bioresource Technology*, 136, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.070>
- Renau-Piqueras, J., Gómez-Perretta, C., Guerri, C., & Sanchis, R. (1985). Qualitative and quantitative ultrastructural alterations in hepatocytes of rats prenatally exposed to ethanol with special reference to mitochondria, golgi apparatus and peroxisomes. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, 405(2), 237–251. <https://doi.org/10.1007/BF00704375>
- Řezanka, T., Kaineder, K., Mezricky, D., Řezanka, M., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2016). The effect of lanthanides on photosynthesis, growth, and chlorophyll profile of the green alga *Desmodesmus quadricauda*. *Photosynthesis Research*, 130(1–3), 335–346. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0263-9>
- Rico, M., Altamirano, M., López-Rodas, V., & Costas, E. (2006). Analysis of polygenic traits of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) strains by Restricted Maximum

- Likelihood (REML) procedures: 1. Size and shape of colonies and cells. *Phycologia*, 45(3), 237–242. <https://doi.org/10.2216/03-44.1>
- Röhder, L. A., Brandt, T., Sigg, L., & Behra, R. (2014). Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium(III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 152, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.027>
- Rowell, J.-A., Fillion, M.-A. A., Smith, S., & Wilkinson, K. J. (2018). Determination of the speciation and bioavailability of samarium to *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of natural organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(6), 1623–1631. <https://doi.org/10.1002/etc.4106>
- Salomé, P. A., & Merchant, S. S. (2019, August 1). A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a Reference Organism. *Plant Cell*. American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00952>
- Samanta, A., Bera, P., Khatun, M., Sinha, C., Pal, P., Lalee, A., & Mandal, A. (2012). An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(1), 178–189. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/258885867_An_investigation_on_heavy_metal_tolerance_and_antibiotic_resistance_properties_of_bacterial_strain_Bacillus_sp_isolated_from_municipal_waste
- Sanchez-Fortún, S., López-.rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D’Ors, A., Rouco, M., ... Costas, E. (2009). Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9), 1901–1905. <https://doi.org/10.1897/08-489.1>
- Sánchez-Thomas, R., Moreno-Sánchez, R., & García-García, J. D. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.06.009>
- Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Zepeda-Rodriguez, A., ... Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 288, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.027>
- Sartor, O. (2004). Overview of samarium sm 153 lexidronam in the treatment of painful

- metastatic bone disease. *Reviews in Urology*, 6 Suppl 10(10), S3–S12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16985930>
- Schreiber, U., Schliwa, U., & Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10(1–2), 51–62. <https://doi.org/10.1007/BF00024185>
- Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3(DEC). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00399>
- Sheng, P. X., Ting, Y. P., & Chen, J. P. (2007). Biosorption of heavy metal ions (Pb, Cu, and Cd) from aqueous solutions by the Marine Alga *Sargassum* sp. in single and multiple metal systems. In *Industrial and Engineering Chemistry Research* (Vol. 46, pp. 2438–2444). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ie0615786>
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Pal, D., Verma, S., & Sayre, R. T. (2002). Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *The Plant Cell*, 14, 2837–2847. <https://doi.org/10.1105/tpc.004853>
- Sneller, F., Kalf, A., Weltje, L., & Van Wezel, A. . (2000). *Maximum Permissible Concentrations and Negligible Concentrations for Rare Earth Elements (REEs) VL - JO - RIVM report 601501011 ER -*. Bilthoven, The Netherlands.
- Sober, E. (1993). *The nature of selection: evolutionary theory in philosophical focus*. (T. U. of C. Press, Ed.). Cambridge.
- Spain, O., Plöhn, M., & Funk, C. (2021). The cell wall of green microalgae and its role in heavy metal removal. *Physiologia Plantarum*, 173(2), 526–535. <https://doi.org/10.1111/ppl.13405>
- Sun, J., Cheng, J., Yang, Z., & Zhou, J. (2021). Effect of Hg²⁺ on the microphysical and chemical properties of oil-producing *Nannochloropsis* sp. . *Algal Research*, 60, 2211–9264. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102525>
- Tai, P., Zhao, Q., Su, D., Li, P., & Stagnitti, F. (2010). Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere*, 80(9), 1031–1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.030>
- Tan, Q. G., Yang, G., & Wilkinson, K. J. (2017a). Biotic ligand model explains the effects of competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii* . *Chemosphere*, 168, 426–434.

- <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.051>
- Tan, Q., Li, J., & Zeng, X. (2015). Rare Earth Elements Recovery from Waste Fluorescent Lamps: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(7), 749–776. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.900240>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. *EXS*, 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Torres, E. (2020). Biosorption: A Review of the Latest Advances. *Processes* 2020, Vol. 8, Page 1584, 8(12), 1584. <https://doi.org/10.3390/PR8121584>
- Tran, C. D., Lee, J.-C., Pandey, B. D., Jeong, J., Yoo, K., & Huynh, T. H. (2011). Bacterial cyanide generation in the presence of metal ions (Na⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺) and gold bioleaching from waste PCBs. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 44(10), 692–700. <https://doi.org/10.1252/jcej.10we232>
- Trifuoggi, M., Donadio, C., Ferrara, L., Stanislao, C., Toscanesi, M., & Arienzo, M. (2018). Levels of pollution of rare earth elements in the surface sediments from the Gulf of Pozzuoli (Campania, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.09.034>
- Tyler, G. (2004). Rare earth elements in soil and plant systems - A review. *Plant and Soil*, 267(1–2), 191–206. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4888-2>
- Utimura, S. K., Rosario, C. G. A., Botelho, A. B., Tenório, J. A. S., & Espinosa, D. C. R. Bioleaching process for metal recovery from waste materials, Minerals, Metals and Materials Series § (2017). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52192-3_28
- Uwizeye, C., Decelle, J., Jouneau, P. H., Flori, S., Gallet, B., Keck, J. B., ... Finazzi, G. (2021). Morphological bases of phytoplankton energy management and physiological responses unveiled by 3D subcellular imaging. *Nature Communications*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21314-0>
- Valcheva-Traykova, M., Saso, L., & Kostova, I. (2014). Involvement of lanthanides in the free radicals homeostasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14, 2508–2519.
- Valette-Silver, N. J. (1993). The use of sediment cores to reconstruct historical trends in contamination of estuarine and coastal sediments. *Estuaries* 1993 16:3, 16(3), 577–588. <https://doi.org/10.2307/1352796>

- Van, P., & Gillet, C. (1982). Activity Coefficients and Selectivity Values of Cu ++ , Zn ++ and Ca ++ ions adsorbed in the *Nitella flexilis* L. cell wall during triangular ion exchanges. *Journal of Experimental Botany*, 33(136), 847–853.
- Vestola, E. A., Kuusenaho, M. K., Närhi, H. M., Tuovinen, O. H., Puhakka, J. A., Plumb, J. J., & Kaksonen, A. H. (2010). Acid bioleaching of solid waste materials from copper, steel and recycling industries. *Hydrometallurgy*, 103(1–4), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.017>
- Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lütz, C., Sima, E., & Lütz-Meindl, U. (2014). Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Microcystis* by divalent ions. *Journal of Plant Physiology*, 171(2), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.002>
- Wäger, P. A., Schluep, M., Müller, E., & Gloor, R. (2012). RoHS regulated substances in mixed plastics from waste electrical and electronic equipment. *Environmental Science and Technology*, 46(2), 628–635. <https://doi.org/10.1021/es202518n>
- Waite, A., Fisher, A., Thompson, P. A., & Harrison, P. J. (1997). Sinking rate versus cell volume relationships illuminate sinking rate control mechanisms in marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, 157, 97–108.
- Wan Maznah, W. O., Al-Fawwaz, A. T., & Surif, M. (2012). Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 24(8), 1386–1393. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60931-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60931-5)
- Wang, Y., Zhang, M., & Wang, X. (2000). Population growth responses of *Tetrahymena shanghaiensis* in exposure to rare earth elements. *Biological Trace Element Research* 2000 75:1, 75(1), 265–275. <https://doi.org/10.1385/BTER:75:1-3:265>
- Weng, Z. H., Jowitt, S. M., Mudd, G. M., & Haque, N. (2014). Assessing rare earth element mineral deposit types and links to environmental impacts. *Transactions of the Institutions of Mining and Metallurgy, Section B: Applied Earth Science*, 122(2), 83–96. <https://doi.org/10.1179/1743275813Y.00000000036>
- Wilde, E., & Benemann, JR. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*, 11(4), 781–812. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90003-6)
- Wibowo, S., & Deng, H. (2015). Multi-criteria group decision making for evaluating the

- performance of e-waste recycling programs under uncertainty. *Waste Management*, 40, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.02.035>
- Wu, W., Liu, X., Zhang, X., Zhu, M., & Tan, W. (2018). Bioleaching of copper from waste printed circuit boards by bacteria-free cultural supernatant of iron–sulfur-oxidizing bacteria. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0196-6>
- Xu, M., Harmon, J., Yuan, D., Yan, S., Lei, C., Hiramatsu, K., ... Goda, K. (2021). Morphological indicator for directed evolution of *Euglena gracilis* with a high heavy metal removal efficiency. *Environmental Science & Technology*, 55(12), 7880–7889. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.0C05278>
- Xue, M., Yang, Y., Ruan, J., & Xu, Z. (2012). Assessment of noise and heavy metals (Cr, Cu, Cd, Pb) in the ambience of the production line for recycling waste printed circuit boards. *Environmental Science and Technology*, 46(1), 494–499. <https://doi.org/10.1021/es202513b>
- Yang, G., Hadioui, M., Wang, Q., & Wilkinson, K. J. (2019). Role of pH on indium bioaccumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution*, 250, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.116>
- Yang, G., Tan, Q.-G. G., Zhu, L., & Wilkinson, K. J. (2014). The role of complexation and competition in the biouptake of europium by a unicellular alga. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(11), 2609–2615. <https://doi.org/10.1002/etc.2722>
- Yang, G., & Wilkinson, K. J. (2018). Biouptake of a rare earth metal (Nd) by *Chlamydomonas reinhardtii* – Bioavailability of small organic complexes and role of hardness ions. *Environmental Pollution*, 243(Pt A), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.066>
- Yap, J. K., Sankaran, R., Chew, K. W., Halimatul Munawaroh, H. S., Ho, S.-H. H., Rajesh Banu, J., & Show, P. L. (2021). Advancement of green technologies: A comprehensive review on the potential application of microalgae biomass. *Chemosphere*, 281, 130886. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130886>
- Zhang, S., & Shan, X. quan. (2001). Speciation of rare earth elements in soil and accumulation by wheat with rare earth fertilizer application. *Environmental Pollution*, 112(3), 395–405. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00143-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00143-3)
- Zhao, C. M., & Wilkinson, K. J. (2015). Biotic ligand model does not predict the bioavailability of rare earth elements in the presence of organic ligands.

- Environmental Science and Technology*, 49(4), 2207–2214.
<https://doi.org/10.1021/es505443s>
- Zhao, Y., Cocerva, T., Cox, S., Tardif, S., Su, J. Q., Zhu, Y. G., & Brandt, K. K. (2019). Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Science of The Total Environment*, 656, 512–520.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.372>
- Zhou, B., Li, Z., & Chen, C. (2017, November 1). Global potential of rare earth resources and rare earth demand from clean technologies. *Minerals*, 7(11).
<https://doi.org/10.3390/min7110203>
- Zhu, Z., Wang, Z., Li, J., Li, Y., Zhang, Z., & Zhang, P. (2012). Distribution of rare earth elements in sewage-irrigated soil profiles in Tianjin, China. *Journal of Rare Earths*, 30(6), 609–613. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(12\)60099-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(12)60099-4)
- Zhuang, M., Zhao, J., Li, S., Liu, D., Wang, K., Xiao, P., ... Chu, Z. (2017). Concentrations and health risk assessment of rare earth elements in vegetables from mining area in Shandong, China. *Chemosphere*, 168, 578–582.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.023>

XI. ANEXOS:

Anexo 1.

Tabla modificada a partir de la publicada en (Martínez-Alesón García et al., 2021) que muestra las tasas de mutación obtenidas en trabajos anteriores que realizaron el análisis de fluctuación con chlorofitas. En la tabla se recogen las especies y los tóxicos utilizados en cada trabajo. En negrita se destacan los realizados con la especie *Chlamydomonas reinhardtii*.

Mutation Rate (μ)	Species	Toxic	Reference
$3.6 \cdot 10^{-6}$	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)	(Victoria López-Rodas et al., 2001)
$8.2 \cdot 10^{-6}$	<i>Scenedesmus</i> sp.	Trinitrotoluene (TNT)	(Victoria López-Rodas et al., 2001)
$2.1 \cdot 10^{-6}$	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU)	(E. Costas et al., 2001)
$2.12 \cdot 10^{-5}$	<i>Scenedesmus intermedius</i>	Aznalcollar mine spill	(Baos et al., 2002a)
$1.4 \cdot 10^{-5}$	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Trinitrotoluene (TNT)	(García-Villada et al., 2002)
$3.5 \cdot 10^{-6}$	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Formaldehyde	(V. López-Rodas, Maneiro, & Costas, 2006)
$1.38 \cdot 10^{-6}$	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Tinto river (acid waters)	(Eduardo Costas et al., 2007)
$1.1 \cdot 10^{-5}$ - $8.5 \cdot 10^{-6}$	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Different Geothermal waters	(Eduardo Costas, Flores-Moya, & López-Rodas, 2008)
$1.77 \cdot 10^{-6}$	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Chromium (VI)	(Sanchez-Fortún et al., 2009)
$8.54 \cdot 10^{-7}$	<i>Tetraselmis suecica</i>	TBT (tributyltin)	(Eduardo Costas, Gonzalez, López-Rodas, & Huertas, 2013)
$3.8 \cdot 10^{-7}$	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Saelices mining water	(C. García-Balboa et al., 2013)
$1.7 \cdot 10^{-6}$	<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	Saelices mining water	(C. García-Balboa et al., 2013)
$9.61 \cdot 10^{-6}$	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Beryllium Sulphate	(Baselga-Cervera et al., 2016)

$8.65 \cdot 10^{-7}$	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Samarium (Sm₂O₃)	The present work (Martínez-Alesón García et al., 2021)
--	---	---	---

Anexo 2.

Trabajos de investigación en los que han utilizado *C. reinhardtii* para el estudio de la captura de diferentes tierras y las condiciones en las que se ha dado esa captura, el estado de la biomasa utilizada, el rango de concentraciones de las tierras raras estudiadas y el tiempo de exposición de la biomasa a las tierras raras empleadas.

Biomasa Inicial (Células / Superficie)	Tierras raras	Concentración Inicial de Metal	Concentraciones capturadas o flujo de internalización	Tiempo de exposición max.	Referencia
$8 \cdot 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ / $0.15 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$	Nd (Ca, Mg, Eu, Sm, Ác. cítrico, Ác. Málico)	$1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	$J_{\max} = 1,70 \pm 0,06 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$ $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	1-60 min	(Yang & Wilkinson, 2018)
$8 \cdot 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ / $0.15 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$	In	$1 \cdot 10^{-9} \text{ M} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$J_{\max} = 1,70 \pm 0,06 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$ $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	1-60 min	(Yang et al., 2019)
$8 \cdot 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ / $0.15 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$	Eu (Sm)	$1 \cdot 10^{-9} \text{ M} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$J_{\max} = 1,70 \pm 0,3 \cdot 10^{-14} \text{ mol} \cdot$ $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	60 min	(Yang et al., 2014)
$2 \cdot 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$	Ce	$1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	Máx: $6,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}_{\text{célula}}^{-1}$	2h	(Kosak née Röhder et al., 2018)
$2 \cdot 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$	Sc (Al)	$2 \cdot 10^{-10} - 2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$2490 \pm 200 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$	60 min	(Crémazy et al., 2013)
$\approx 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ $0.15 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$	Sm (La, Ce y Eu /Ca y Mg)	$3 \cdot 10^{-7} \text{ M} - 10^{-6} \text{ M}$	$J_{\max} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-14} \text{ mol} \cdot$ $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	60 min	(Q. G. Tan et al., 2017a)
$8 \cdot 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ / $0.15 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$	La, Nd, Sm, Eu, Tm, Y (Ác. Cítrico)	$10^{-9} - 10^{-4} \text{ M.}$	(Tm) $J_{\max} = 1,1 \pm 0,08 \cdot 10^{-14}$ $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	60 min	(C. M. Zhao & Wilkinson, 2015)
$\approx 8 \cdot 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ / $0.15 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$	Sm	$10^{-9} - 10^{-5} \text{ M}$	$J_{\max} = 1,08 \pm 0,07 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$ $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	60 min	(Rowell, Fillion, Smith, & Wilkinson, 2018)
$6,5 \cdot 10 \cdot 10^4$ $\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$	Ce, Tm, Y	$0.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$3 - 7 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$	120 min	(Morel et al., 2021)

$2 \cdot 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$	Ce	$0-200 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	-	120 min	(Röhder, Brandt, Sigg, & Behra, 2014)
$5 \cdot 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$	Gd (Al, Eu, Fe, Nd, Tm, Y)	$98,7 \pm 2,3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$	(Gd) $0,1 \cdot 10^{-9} \text{ M} - 10 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	60 min	(Aharchaou et al., 2020)
Biomasa seca (10 - 40mg)	Nd	$10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$0,2 - 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de biomasa	180 min	(Heilmann, Jurkowski, Buchholz, Becker, & Brueck, 2015)

Anexo 3.

Artículo resultado del trabajo realizado para el capítulo 1 de esta memoria.

Martínez-Alesón García P., García-Balboa C., Romero-López J., López-Rodas V., Costas E. y Baselga-Cervera B. Fluctuation analysis to select for Samarium bio-uptaking microalgae clones: the repurposing of a classical evolution experiment. Vol. 215, 1 June 2021, 112134 Ecotoxicology and Environmental Safety <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112134>.



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv



Fluctuation analysis to select for Samarium bio-uptaking microalgae clones the repurposing of a classical evolution experiment[☆]

Paloma Martínez-Alesón García^{a,1}, Camino García-Balboa^{a,2}, Julia Romero-López^a, Victoria López-Rodas^a, Eduardo Costas^{a,4}, Beatriz Baselga-Cervera^{a,b,c,*,3}

^a Animal Science (Genetics), School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid 28040, Spain

^b Ecology, Evolution and Behavior Department, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, United States

^c Minnesota Center for Philosophy of Science, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, United States

ARTICLE INFO

Edited by Dr. R. Pereira

Keywords:

Samarium
Rare earth elements
Chlamydomonas reinhardtii
Bio-uptake
Adaptation
Toxicity

ABSTRACT

Rare Earth Elements (REE) increasing demand prompts the research of biotechnological approaches to exploit secondary resources. We made use of the adapted Fluctuation analyses experiment to obtain *Chlamydomonas reinhardtii* ChlA strains resistant to Samarium (Sm) as the reference REE. The starting hypothesis was that adaptation to metal-containing media leads to an enhanced metal uptake. ChlA was able to adapt to $1.33 \cdot 10^{-4}$ Sm M and pH ~3 by pre-existing genetic variability, allowing the evolutionary rescue of 13 of the 99 populations studied. The rescuing resistant genotypes presented a mutation rate of $8.65 \cdot 10^{-7}$ resistant cells per division. The resulting resistant population contradicted the expected fitness cost associated with the adaptation to Sm, selection resulted in larger and faster-growing resistant cells. Among the three isolated strains studied for Sm uptake, only one presented uplifted performance compared to the control population ($46.64 \mu\text{g Sm g}^{-1}$ of wet biomass and $3.26 \cdot 10^{-7}$ ng Sm per cell, mainly bioaccumulated within the cells). The selection of microalgae strains with improved tolerance to REEs by this methodology could be a promising solution for REES sequestration. However, increased tolerance can be independent or have negative effects on uptake performance and cellular features studied are not directly correlated with the metal uptake.

Summary sentence: Repurposing a classic laboratory evolution experiment to select for microalgae Samarium adapted strains for metals recovery and biotechnology approaches.

Data availability statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its raw files).

1. Introduction

Rare Earth Elements (REEs) are a set of highly demanded metals due to the current global trend of consumption of these elements. As REEs importance gains momentum because of its multiple uses (e.g. industrial catalysts, fertilizers in agriculture, medical products, fluorescence bulbs,

smartphones, clean energy, batteries, to mention a few (Migaszewski and Gałuszka, 2015) developing new efficient alternatives to extract and exploit those elements are required to meet the demand trends (Alonso et al., 2012). Research has therefore recently shifted towards technologies with a smaller environmental impact for the recovery of REEs. Biological methods are already widely used in activities including but

Abbreviations: REE, Rare Earth Elements; EEE, Electric and Electronic Equipment; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; ICP-MS, Inductively coupled plasma mass spectrometry; DB, Dry Biomass; WB, Wet Biomass; BLM, Biotic ligand model.

[☆] The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

* Corresponding author at: Ecology, Evolution and Behavior Department, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, United States.

E-mail addresses: pm.martinezaleson@ucm.es (P. Martínez-Alesón García), camino@ucm.es (C. García-Balboa), julia.romero@ucm.es (J. Romero-López), vlrodas@ucm.es (V. López-Rodas), ecostas@ucm.es (E. Costas), bbaselga@umn.edu (B. Baselga-Cervera).

¹ ORCID: 0000-0002-2642-4683

² ORCID: 0000-0002-3132-5305

³ ORCID: 0000-0003-3423-4780

⁴ ORCID: 0000-0002-9098-7886

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112134>

Received 15 August 2020; Received in revised form 26 January 2021; Accepted 7 March 2021

Available online 13 March 2021

0147-6513/Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

not limited to bioleaching, bio-uptake, bio-reduction, bio-recovery, bioaccumulation, bio-precipitation, or biosorption (Ambaye et al., 2020; Čížková et al., 2019; Dunbar, 2017), to recover and extract REEs and other scarce elements. These technologies offer an alternative to physicochemical approaches (Ambaye et al., 2020; Fathollahzadeh et al., 2019).

A considerable amount of research has been conducted in the development of efficient methods for REEs recovery with different types of biomass or by microorganisms (Ambaye et al., 2020). Regarding microalgae, only a few studies have been published in REEs recovery. Birungi and Chirwa (2014) used six different microalgae species to study the La biosorption and desorption; Kucuker et al. (2017) studied the pH and temperature parameters to uptake Nd from real Nd-magnets with *Chlorella vulgaris* biomass. Kosak née Röhder et al. (2018) highlight the role of the *Chlamydomonas reinhardtii* wall in the sorption of Ce rather than an efficient transport route for its internalization. Tan et al. (2017) successfully modeled the competition between Sm^{3+} and different binding ligands (Mg^{2+} and Ca^{2+} and other three REE cations: La^{3+} , Ce^{3+} , and Eu^{3+}) with the biotic ligand model (BLM), suggesting also its extrapolation to other REE trivalent cations. Other studies assessing the BLM using *C. reinhardtii* had been made in the bio-uptake context of different REE like Eu (Yang et al., 2014), Nd (Yang and Wilkinson, 2018), or In (Yang et al., 2019). Čížková et al. (2019) exposed three different green microalgae species to red mud containing REE and they even observed a growing improvement suggesting them as a good method for biomining or bio-leaching lanthanides. However, a critical aspect of bio-recovery methods is the selectivity and efficiency of the process, which is directly related to the species and strains used. Biotechnology methods have demonstrated that adaptation to metal-containing media leads to an enhanced metal uptake by microalgae (Malik, 2004; Sandau et al., 1996; Suresh Kumar et al., 2015). This may have subsequent benefits, a driven selection could lead towards new strains able to thrive in artificial media with high metal concentrations and low pH, in the acidic conditions required to dissolve metals and in which normally REEs biosorption decreases (Boyanov et al., 2003; Karavaiko et al., 1996; Sastre de Vicente et al., 2004). Therefore, we propose the repurpose of a classic experimental evolution bioassay to select and identify more efficient strains for REEs recovery, the fluctuation analysis first published by Luria and Delbrück (1943).

In concrete, we are going to study Samarium (Sm) that served us as a prior model in the research of the lanthanides within the REE. REE toxicity against microalgae has been demonstrated with no significant differences within REE elements (Tai et al., 2010). Samarium (Sm) is one of the most commonly used REEs (Chua, 1998). It is present in fertilizers, in microwave filters, it is used as permanent magnets or in control rods in the nuclear industry (Giese et al., 2019; Pang et al., 2002; Tyler, 2004), isotope ^{153}Sm is employed to treat pain in bone tumors in nuclear medicine (Giese, 2018), industrially it is used in dehydration and dehydrogenation of ethanol and the catalysis of polychlorinated biphenyls plastics (Emsley, 2011). Sm is considered a mildly toxic element when ingested and exposure to Sm can cause skin and eye irritation (Pagano et al., 2015). The maximum permissible concentration limit of Sm in drinking water is 8.2 ng mL^{-1} (Sneller et al., 2000) and human consumption through vegetable intakes are being studied (Zhuang et al., 2017). Environmentally, Sm is not considered a hazard to plants or animals. Sm has no significant biological role, but it has been noted to increase metabolism in certain organisms (Pang et al., 2002) and is regarded as an anthropogenic emerging REE contaminant (Kulaksiz and Bau, 2013). Its presence has been also determined in different organisms such as microalgae (Mann et al., 1988) or other aquatic flora like water hyacinth (Chua, 1998).

Here, we address the effect of Sm in *C. reinhardtii* growth and photosynthetic activity. Then, we obtained through selection different strains of *C. reinhardtii* resistant to high Sm concentrations. *C. reinhardtii* is a well-established eukaryotic model for phylogenetic, toxicological, and evolutionary studies (Salomé and Merchant, 2019). Knowledge

already acquired indicates *C. reinhardtii* as a candidate with commercial purposes in metal-capture processes (Suresh Kumar et al., 2015). The additional benefits of photosynthetic organisms, low-cost harvesting, CO_2 sequestration, assimilation of other pollutants, combined with the selectivity in lanthanides deposition displayed by other Chlorophyta and Euglena species made it suitable for this study. Our objective was to obtain resistant strains adapted to Sm and acid conditions employing experimental evolution. The simultaneous verification of different traits and Sm accumulation could be used to establish an inventory of phenotypic features related to improve Sm bio-uptake. This work describes the potential of experimental evolution methodologies for biotechnological approaches.

2. Material and methods

2.1. Organisms and growth conditions

The experiments were carried out using the *C. reinhardtii* Dangeard (ChlA strain) wild type strain isolated from Doña National Park (Andalucía, Spain), obtained from the algae culture collection of the Universidad Complutense de Madrid, Spain. In the laboratory conditions, ChlA strain was transferred axenically every 20 days to maintain the mid-log exponential growth and cultured with 20 mL of bi-distilled water enriched with BG₁₁ standard broth (Sigma-Aldrich®, Chemie, Taufkirchen, Germany) in 50 mL cell culture flasks (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, NJ). The cell cultures are grown under continuous light conditions at $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm, with a controlled temperature of $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. All experiments were conducted in the same conditions unless otherwise indicated.

A commercial solution of samarium (Carl Roth GmbH + Co. Laboratories, Roti®Star, Karlsruhe, Germany) was used, where Sm_2O_3 was the starting material with a purity level of 99.99%. The 100 mL solution contained 1 g L^{-1} of samarium and 2% (v/v) HNO_3 . Under these culture conditions, Sm^{3+} cation presents the highest bioavailability in dissolution among Sm ions (Tan et al., 2017). All Sm-containing media were prepared to add the volume required of the commercial solution to bi-distilled water enriched with BG₁₁ culture broth. The pH of the solutions was measured with a pHmeter Sension+ph3 and adjusted with a solution NaOH (1 M) in case it was necessary.

2.2. Toxicity tests: dose-effect inhibition of cell growth and photosynthetic quantum yield

The toxic effects of Sm were evaluated employing two methods: cellular growth and photosynthetic yield inhibition. ChlA strain was exposed to serial solutions of Sm ($2 \cdot 10^{-7}$; $6.65 \cdot 10^{-7}$; $2 \cdot 10^{-6}$; $6.65 \cdot 10^{-6}$; $2 \cdot 10^{-5}$; $6.65 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) at pH~3 to ensure Sm availability in the dissolution. *C. reinhardtii* was not acclimated to acid pH prior to the experiments. This microalgae species was chosen due to its pH tolerance. Although a reduction of its growth can be observed at pH~3 (Crémazy et al., 2013; Lustigman et al., 1995), the growth inhibition does not occur until pH~2 (Messerli et al., 2005). Control groups did not include HNO_3 and starting pH was 7.1–8., address both the effect of the Sm and pH 3 in the growth rate and photosynthetic yield.

Sm cellular growth inhibition was estimated as follows: replicates of $1.2 \cdot 10^4$ cells per mL of ChlA strain at mid-log, exponential-growth phase was exposed to the different Sm concentrations, three replicate cultures were established for each dose of study, and three replicates unexposed were used as control populations. Cell densities were counted with a Beckman Coulter Z2 cell counter (Beckman Coulter® Inc. Particle Characterization Group, Florida) after 4 and 7 days of incubation respectively.

The effective quantum yield of the photosystem II ($Y(II)$) of the cultures was measured by a ToxY-PAM fluorometer (Dual-Channel Photosynthesis yield analyzer, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). This saturation pulse method (Genty et al., 1989; Schreiber et al., 1986)

permits us to identify if there is any substance in the liquid medium affecting the photosynthetic electron flow, considered as a crucial factor for algal health. Duplicates for each concentration were placed in falcon tubes of ten mL with an initial culture of 10^5 cells mL^{-1} . The measures were taken at 0 h, 2 h, 24 h, and 48 h of exposure. To calculate the percentage of inhibition, we took as reference an equal culture with the same culture conditions, but with no Sm addition, as follows:

$$Inh(\%) = [(Y(II)_{control} - Y(II)_{sample}) / Y(II)_{control}] \times 100\% \quad (1)$$

where $Y(II)_{sample}$ corresponds to the effective PSII quantum yield at each time of Sm exposure and $Y(II)_{control}$ represents the effective PSII quantum yield of the control.

2.3. Fluctuation analysis experiment

We performed a modified fluctuation analysis as previously described by López-Rodas et al. (2001). Fluctuation analysis experiment adapted to liquid cultures and possible outcomes are shown in Fig. 1 (see Supplemental Experimental Procedures for detailed information).

The fluctuation test also permits to estimate the frequency of a spontaneous mutation to appear in a population. This value is known as the mutation rate (μ) and is calculated with the proportion of tubes were no alive cells were seen, by using the following equation:

$$P_0 = e - \mu(N_t - N_0) \quad (2)$$

N_0 and N_t (10^2 and 10^5) are the initial and the final population size contained in the tubes before the toxic (Sm) exposure took place. Luria and Delbrück P_0 estimator is the proportion of tubes with no resistant cells. Aliquots were monitored throughout the experiment for alive cells with fluorescence microscopy.

2.4. Sm-resistant strains characterization

Resistant strains obtained from the set 2 of the Fluctuation analyses experiment were characterized by Malthusian fitness under not selective

conditions (Crow and Kimura, 1970). The coefficient of selection s was calculated to the equation of Ayala and Kiger (1980). Morphological and stereological features were measured in between 50 and 75 cells from each strain. For each strain, we obtained four morphometric traits: the area, perimeter, major axis (D), and minor axis (d). These values were used to calculate as an estimator of asymmetry the coefficient of the form of the diameters (C.F.d.) and as an estimator of roundness the coefficient of form for circular profiles (C.F.c.) (equations and extended methods can be found in Suppl. materials).

2.5. Sm biouptake determination

Three of the strains obtained, SmR9, SmR17, and SmR59, were selected to study their Sm biouptake capacity (see results for rationale). We exposed the three selected strains and ChlA (control) never exposed before to Sm, to a solution of BG₁₁ with Sm concentration of $3 \cdot 10^{-7}$ M. A concentration of $\approx 10^{-7}$ M Sm was chosen for being similar to the one found by other authors in waters near mining activities all around the world (Gammons et al., 2003; Li et al., 1998; Mann et al., 1988). The pH was maintained at 4.5 (at 20 °C) to assure the viability of the control strain and the bioavailability of Sm.

The experiment was carried out for 27 days, when cellular pellets and supernatants were harvested. From the two pellets obtained per strain; one was directly stored to be analysed and the other pellet was washed and resuspended three times with 5 mL of a BG₁₁ solution enriched with 0.05% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for 15 min. All chemical analysis was performed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) by the CAI of geological techniques of the Complutense University of Madrid (detailed description of the experimental procedures and chemical analyses can be found in supplemental materials).

2.6. Statistical analyses

Statistical analysis and graphs were performed with the software

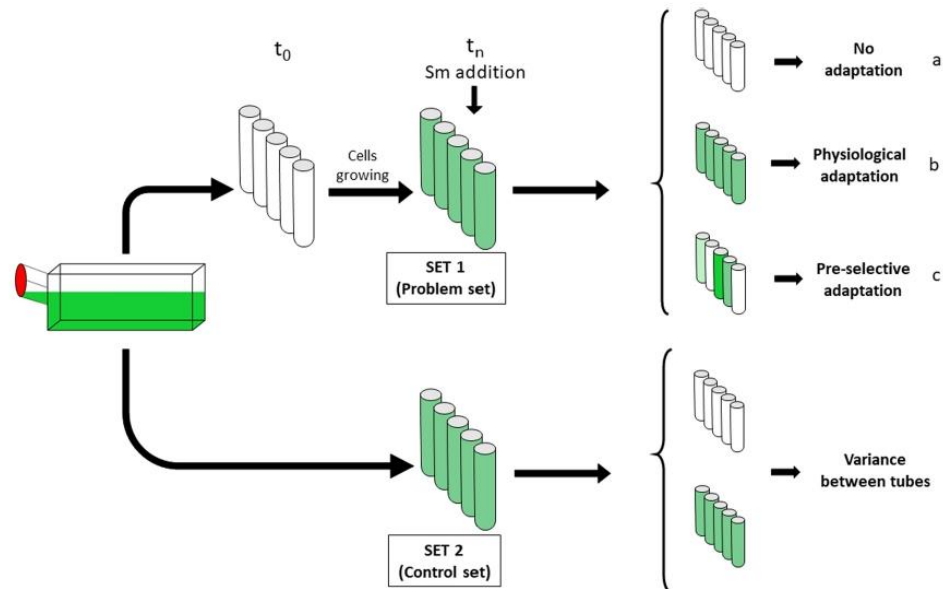


Fig. 1. Schematic representation of the Fluctuation analysis experiment. From the same parental culture, set 1 and set 2 were established at different times: set 1 at t_0 and set 2 at t_n when the Sm was added. Three different results in set 1 are possible although only three are observable: a. No adaptation: no alive cells will be found in any tube. b. Physiological adaptation, all the replicate populations present living cells, or c. Pre-selective adaptation: replicate populations present tubes without living cells and tubes with different cellular densities. Set 2 acts as a control, and all the tubes should present grown cells in a similar density.

GraphPad Prism 8.4.2 for Windows (GraphPad Prims, n.d.) and R-statistical software (R Core Team, 2019). To study differences between the 13 resistant strains and the controls in fitness we performed a parametric analysis, one-way ANOVA, and Tukey HSD post-hoc. Morphometric data were compared with a Kruskal-Wallis test with a post hoc Wilcox test. For the biouptake experiment, we look for correlations between each parameter measured for the four strains used. We performed a non-parametric Spearman test, to study if there are tendencies of any predictor value to assure a better capture. A p-value less than 0.05 was used as a cutoff for determining significance.

3. Results

3.1. Toxic effect of Sm on *C. reinhardtii*

Sm at pH 3 was mildly toxic at low doses to *C. reinhardtii*, but at high doses, we can observe growth and photosynthesis inhibition. At the lowest Sm doses, $2 \cdot 10^{-7}$ M and $6.65 \cdot 10^{-7}$ M, growth was mildly inhibited on day 4, but the population totally recovered on day 7 and even presented 10% of increased growth compared to the control population. We observed a 50% growth inhibition at $2 \cdot 10^{-6}$ Sm M maintained after 7 days of exposure. After 7 days of exposure, we observed growth inhibition of ~80–90% at concentrations of $6.65 \cdot 10^{-6}$ M, $2.1 \cdot 10^{-5}$ M, and $6.65 \cdot 10^{-5}$ M compared with the control replicates. Moreover, there was a decrease in the cell density at $6.65 \cdot 10^{-5}$ M from day 4 to day 7, suggesting that not just growth is impaired but that the cells might be dying.

The extent of Y(II) inhibition compared to a control population measured by Eq. (1) indicated a dose-dependent relationship of Sm toxicity effect in PS II. No inhibition of the Y(II) was observed at the doses $\leq 2 \cdot 10^{-6}$. At the concentration of Sm $6.65 \cdot 10^{-5}$ M, there was a mean inhibition of $30.45\% \pm 7.67$ at T_0 , reaching a mean inhibition of $99.76\% \pm 0.01$ during the first 2 h (see Supplemental Table 1 for a detailed description of the toxicity analyses results).

3.2. Fluctuation test

We doubled the highest Sm amount chosen for the toxicity assays to assure a population dye-off, selecting a final concentration of $1.33 \cdot 10^{-4}$ M for the fluctuation analysis experiment. The resume of the fluctuation analyses results obtained is shown in Table 1 grouped according to cells' densities. At the beginning of the fluctuation experiment, massive die-offs were observed in both sets. But, over the 120 days of incubation, 13 out of 99 tubes of set 1 and all the tubes of set 2 presented living cells due to the proliferation of Sm resistant variants. We calculated the

Table 1
Fluctuation analysis experiment results. We grouped the replicated population of each set per number of cells mL^{-1} . We found a greater variance in the cell density counted between the tubes of set 1 than in tubes of set 2. Significant differences between Set1 and Set2 were observed and preselected mutations were found. Mutation rate (μ) was calculated with the proportion of tubes where no growing cells were identified, and it is expressed as mutations per cell per generation.

<i>C. reinhardtii</i>	Set1	Set2
N° of replicate cultures	99	50
0	86	0
$15 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^5$	2	49
$1 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$	6	1
$> 5 \cdot 10^6$	5	0
Mean	$4.87 \cdot 10^5$	$2.32 \cdot 10^4$
Variance	$1.56 \cdot 10^6$	$2.32 \cdot 10^4$
CV (Variance/mean)	3.20	1.39
One Tail Z-Test	10.14****	
Fluctuation	YES	NO
Mutation Rate (μ)	$8.65 \cdot 10^{-7}$	

**** Signif. codes: 0.0001.

covariance of each set, resulting in significantly higher covariance in set 1 (One Tail Z-test= 10.14, $p < 0.0001$). The strong variation in the cell densities among set 1 tubes, in comparison to the variance presented in the set 2 control trial, suggests that the resistant variants arose employing pre-selective adaptation. We estimated *a posteriori* the mutation rate for the strain and Sm concentration studied following Eq. (2) as $8.65 \cdot 10^{-7}$ resistant cells per division.

One Sm resistant strain from each active population of the Fluctuation analyses set 2 was re-isolated by serial dilutions and named as SmRX being X the number of the tube in which they were cultured: SmR1, SmR5, SmR9, SmR13, SmR17, SmR27, SmR51, SmR52, SmR55, SmR57, SmR59, SmR63, and SmR77.

3.3. Sm resistant strains characterization

The results for the individual traits per strain are summarized in Fig. 2. Regarding the fitness values obtained under not selective conditions, we observed that all of the resistant strains isolated grow faster than the control strain (Fig. 2B–2D). We found significant *p* values between the control versus all the strains except SmR1, SmR17, and SmR59 (one-way ANOVA (F(13,28) = 4.003, $p < 0.05$; Tukey HSD) (Suppl. Table 2). Strain SmR9 presented the highest fitness with less error among the isolated strains, which on the other hand, presented the lowest cell density among the set 1 tubes at the end of the fluctuation analysis. We obtained negative *s* values in a medium without Sm, suggesting that these variants are not selected against at all.

As said in material and methods, four measures of the cells per strain were obtained from the photographs: area, perimeter, major axis (*D*) and minor axis (*d*); and two form coefficients were calculated; C.F.d. for measuring the asymmetry and C.F.c. to measure the roundness (Fig. 2A). For the C.F.d., seven strains, SmR5, SmR9, SmR55, SmR57, SmR59, SmR63, and SmR77, were significantly different from the control strain (K-W chi-squared=60.05, $\text{df}=13$, $p < 0.5$). For C.F.c. coefficient all the strains were significantly different compared with the control strains, the control presenting the highest C.F.c. (K-W chi-squared=116.87, $\text{df}=13$, $p < 0.5$) (see Suppl. Table 2 for traits mean and SD values).

Among the 13 strains, SmR9 (Fig. 2A), SmR17, and SmR59 were selected for the biouptake studies. Both SmR9 and SmR17 (Fig. 2B and 2C) presented traits performance above 50% for all the traits, SmR9 presenting the highest minor axis (*d*) and among the highest fitness and SmR17 presents the higher area. SmR59 strain was selected as a representative strain of the intermediate phenotype, presenting mid values for most of the traits, except for C.F.d. that was high indicating asymmetry.

3.4. Sm uptake

The Sm nominal and measured concentrations in abiotic conditions at the beginning of the experiment presented no significant differences (Sm measured values were of $45.5 \pm 12 \text{ ng Sm mL}^{-1}$ ($\sim 3.03 \cdot 10^{-7}$ M)). The four strains, the control, and the three evolved strains were able to uptake Sm, and at the end of the experiment most of the Sm, between 70% and 85%, was removed from the dissolution (Table 2). Concerning Sm's effect on cellular growth, the control population presented less cellular density compared to the resistant strains. Among the four strains, SmR17 presented the highest uptake performance among the strains studied, with a mean of $46.64 \mu\text{g Sm g}^{-1}$ of wet biomass (WB) and $3.26 \cdot 10^{-7} \text{ ng Sm per cell}$. Surprisingly, the control strain presented the second-best performance (Table 2). We also found that most of the Sm were not released by the EDTA extraction, reaching up to 86% of the total Sm remaining in the cellular pellet after EDTA treatment of SmR17, indicating that most of the Sm might be sequestered inside the cells.

Regarding Fig. 3 we can observe the *r* factor obtained from the Spearman test. We didn't find a strong relation between Sm uptake and fitness as we expected. An *r* factor of -0.19 is found comparing these two variables, which means that a slower growth slightly benefits the

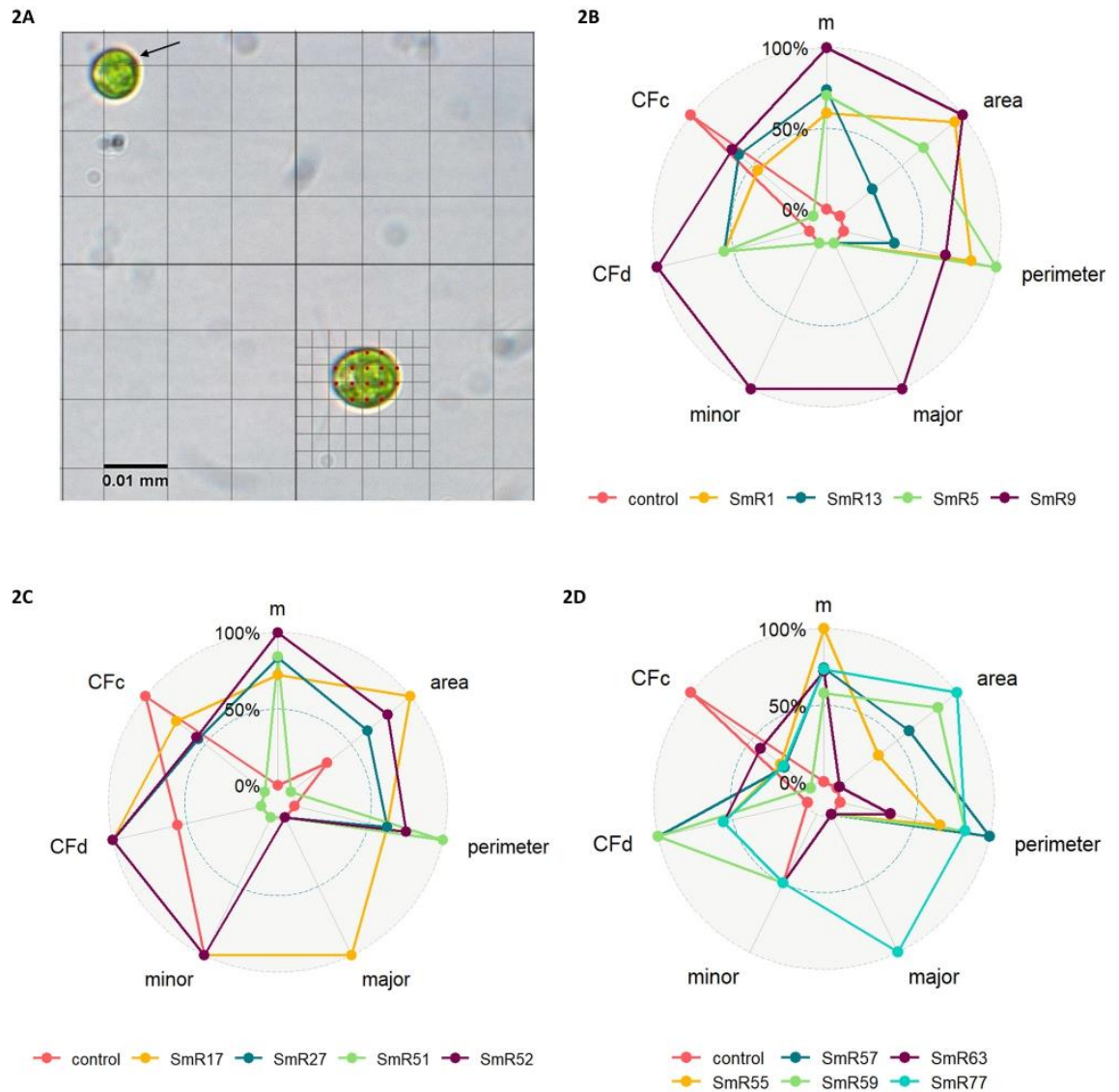


Fig. 2. Sm resistant strains fitness and morphological scores. (2A) Micrograph (40x) of Sm resistant *C. reinhardtii* Sm resistant (SmR9 strain) representing the point-counting procedure based on planimetry techniques for morphometric analyses (the arrow points to the photoreceptor-organelle eyespot). In (2B–2D) we show the polar plots of the different resistant Sm strains against the sensible control. Polar plots go radially from 0 (lower scored trait value), in the center, to 100% (higher scored trait value), among the strains included in each of the plots. We refer to the threshold value of 50% to indicate that the strains present high and low performance per trait.

Table 2

Sm biouptake experiment results. Sm quantification is expressed as the analytical value and the analysis error. Values of ng Sm per g⁻¹ WB and total cells are expressed as mean and SD.

Strain	Total ng Sm Pellet	Total ng Sm Pellet (EDTA)	ng Sm ml ⁻¹ Supernatant	μg Sm g ⁻¹ WB	ng Sm-per cell	N° of total cells
Control	11 ± 1	8.4 ± 08	6.9 ± 2.26	28.89 ± 2.63	2.68·10 ⁻⁷	41.12 ± 0.57 (·10 ⁶)
SmR9	7.7 ± 0.8	5 ± 0.5	11 ± 1	14.82 ± 1.54	1.54·10 ⁻⁷	50.1 ± 0.42 (·10 ⁶)
SmR17	15 ± 1	13 ± 1	13.5 ± 0.5	42.64 ± 2.84	3.26·10 ⁻⁷	45.96 ± 0.23 (·10 ⁶)
SmR59	8.8 ± 0.5	7.5 ± 0.8	12.5 ± 2.1	15.61 ± 1.59	1.63·10 ⁻⁷	54.09 ± 0.41 (·10 ⁶)

uptake. A similar, but positive tendency is found between *s* and Sm uptake, we observe a direct relation of 0.19. It is interesting the inverse correlation obtained between the number of cells at the end of the biouptake experiment and Sm uptake, -0.55 . Not a higher number of

cells will suppose a higher inside taking of Sm which suggests that biological internalization is restricted or that cultures should not reach the stationary stage. With the morphometric values of the major and minor axis, ng of Sm uptake is related in a positive way with the first one

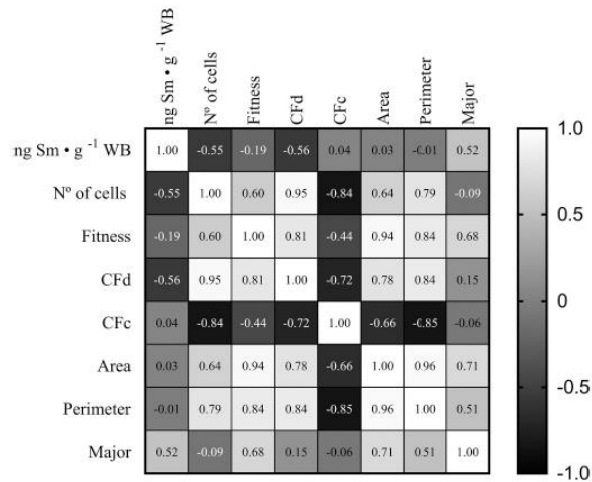


Fig. 3. Physiological, morphological and, Sm biouptake parameters r correlation (Spearman test) for the Sm resistant strains SmR9, SmR17, SmR59, and, the wildtype strain.

(0.52) and in a negative way with the second one (-0.52). This seems to be consistent with the fact that no strong relationship has been found with the roundness coefficient, C.F.c. (0.04). Neither the Area (0.03) nor the Perimeter (-0.01), show an interesting relation with the ng of Sm uptaken. Lastly, the greatest value of r related to the Sm uptake is obtained with the C.F.d. in inverse relation, -0.56, suggesting that this allometric coefficient between the axis could be interesting for future predictions (see Suppl. Table 3 for all the traits correlation r values).

4. Discussion

Sm and other REEs, at low concentrations, are known to be plants growing promoters (Tyler, 2004) and they are widely used to improve fertilization in China (Pang et al., 2002; Zhang and Shan, 2001). A few studies have addressed the positive effects of REEs on microalgae growth (Evseeva et al., 2010; Goecke et al., 2015; Gong et al., 2011). We observed a growth increase in ChlA strain exposed to doses equal or below $6.65 \cdot 10^{-7}$ M in the toxicological studies. Parallel patterns were observed in the photosynthetic inhibition study, at the lower doses studied the photosynthetic yield was higher in the exposed populations compared to the control. The mechanisms to these positive effects have been related to nutrient limitation alleviation (for example Ca^{2+} , Mg^{2+} or Mn^{2+} deficiencies), but it is not clear whether other mechanisms are implicated (such as scavenging of oxygen-free radicals (Valcheva-Traykova et al., 2014), or as a stress compensation (Volland et al., 2014)). To date there is no commercial use of Sm and other lanthanides for microalgae biomass production, growth promotion could be a favorable feature for developing an optimal biocapture system of these elements, especially if REE concentrations do not reach toxic levels in the water object of bioremediation.

These beneficial effects are concentration-dependent, growth and photosynthetic yield inhibition occurred at higher concentrations. We observed a significantly reduced growth rate in ChlA strain, resulting in a ~50% reduction of growth, at $2 \cdot 10^{-6}$ M Sm after 72 h. Similar toxic effects had been observed in other microalgae exposed to Sm and single lanthanides (Tai et al., 2010). The photosynthetic yield was completely inhibited after 48 h in the $6.65 \cdot 10^{-5}$ M Sm exposition, but yield decrease could be due to the extracellular pH. REEs are classified as low toxicity. However, they are gaining attention due to their residual footprints in natural environments (Adeel et al., 2019). There are already studies pointing to anomalies measured in Europe in natural resources, due to

anthropogenic contributions, like with Gd in the Garonne River (Lerat-Hardy et al., 2019) or Gd, La, and Sm in the Rhine River (Kulaksiz and Bau, 2013). Information about REEs toxicity in microalgae stills limited and incomplete (reviewed by Goecke et al. (2015)), but there is substantial evidence that REEs influence the normal physiological functions of the cells affecting membrane permeability and enzymes (Brown et al., 1990; Palasz and Czekaj, 2000). Microalgae are primary producers, due to their trophic and environmental importance, further investigation of REEs toxicity needs to be addressed to establish guidelines and guide environmental policies.

One of our main objectives was achieved by obtaining different Sm resistant strains to high Sm concentrations. Only 13 out of 99 replicate tubes were able to adapt to $1.33 \cdot 10^{-4}$ M Sm concentration and pH 3. We obtained a μ of $8.65 \cdot 10^{-7}$ mutants per cell division resulting among the lowest mutation rates obtained utilizing fluctuation analyses in microalgae chlorophytes (Suppl. Table 4). In previous studies using the same strain of *C. reinhardtii*, exposed to beryllium sulfate and Uranium mining tailings showed the closer values, $9.61 \cdot 10^{-6}$ (Baselga-Cervera et al., 2016) and $3.8 \cdot 10^{-7}$ (García-Balboa et al., 2013), respectively. This rate is in the order of magnitude observed in studies addressing other metals and other stressful environments, suggesting that the adaptation to Sm acid waters would be possible by the evolutionary rescue of the population. Here, we have studied the resulting strains from set 1 separately to address if different Sm adaptation pathways were taking place and, if we could identify among the adapted strain phenotypic traits related to biotechnological purposes, concretely Sm biouptake. Surprisingly, most of the resistant strains isolated from set 1 presented increased fitness compared to the control population under no selective conditions (Table 2). These results contradict the expected fitness cost associated with the adaptation to Sm. This result could be influenced by traces of Sm presented in the resistant strains that increase cell growth. All the resistant isolates were bigger in area and volume than the ancestral strain, except SmR51. The coefficients of the form indicated that the resistant cells presented a less circular form. Sm pressure selected for resistant cells with higher fitness rates, larger size, and more asymmetry. Adaptation to metal contamination entails multiple tolerance mechanisms to alleviate the toxic effects. Defence mechanisms in microalgae change physiological, structural and enzymatic activities at both extracellular and intracellular level (Priyadarshini et al., 2019). The molecular basis of metal resistance response are controlled by multiple genes in eukaryotes (Gutiérrez et al., 2003; Siripornadulsil et al., 2002) and there is little genomic information available on genes related to metal-resistance in microbial eukaryotes (Balzano et al., 2020). Phenotyping microalgae resistant strains, identifying traits that could be related to metals-uptake, might open avenues to identify phenotypic related resistant features that facilitate mining and finding novel metallothioneins or enzymes for a variety of biotechnological applications.

Sm-uptake performance experiment indicated that SmR17 strain sequestered the largest amount of Sm up to $46.64 \mu\text{g Sm g}^{-1}$ of (WB) and $3.26 \cdot 10^{-7}$ ng Sm per cell. Even more, our data shows that the control strain, never exposed before to samarium, sequestered larger amounts per cell than the other two resistant strains, SmR59 and SmR9. Contrary to expectation, SmR9, the resistant strain with the greatest Malthusian fitness, was also the one that less Sm retained despite presenting the highest density at the end of the biouptake experiment. Correlation analyses showed that the size of the major axis and the selection coefficient has a positive correlation with the total ng of samarium bio-absorbed. A negative r factor of 0.6 in the correlation between the ng of samarium up-took and the final number of cells in the culture could be explained by the phase of the culture, at the end of the experiment cultures were in a late stationary phase. Although specific experiments with Samarium (or other REE) are needed, based on a previous work where statistically significant differences of the biomass uptake for uranium was only observed during the mid-log exponential growth of the culture (Baselga-Cervera et al., 2018). After the exponential growth phase, microalgae cells start binding to other cells, reducing the cell wall

surface available for metal binding (Gupta and Rastogi, 2008), or metal will be released into the dissolution related to cell death. These results indicate that the bottlenecks and selective pressures imposed in set 1 were selected for larger and faster-growing resistant cells, but not increased Sm uptake.

The Sm sequestration potential of the resistant strains was addressed at 3–10–7 Sm M and pH 4.5, pH at which Sm^{3+} is proposed to be the highest cation in dissolution among other Sm ions. Previous studies of Sm sequestration by phytoplankton described that the BLM can be assumed to be Sm^{3+} at pH below 6, but other species like hydroxo complexes gain importance at higher pH (Rowell et al., 2018). The complexation of Sm with natural organic matter resulted in enhanced Sm biouptake in the case of *C. reinhardtii*, contrary to classic BLM predictions (Zhao and Wilkinson, 2015), and a significant decrease in the Sm internalization flux (Rowell et al., 2018). Therefore, taking into account that pH and organic matter are among the principal factors affecting the REE speciation, Sm uptake studies at different conditions need to be conducted to predict their bioavailability in aquatic environments. As the analytical approach demonstrated, Sm is mainly bioaccumulated within the cells. EDTA washed weakly surface-adsorbed metal bound to functional groups in the cell surface. The higher percentage of Sm (up to 85%) was not released using the EDTA extraction, indicating the Sm internalization. Previous bioavailability Sm studies showed that free metal was a better predictor of Sm internalization. Several studies have shown that lanthanides accumulate in chloroplasts (Shen et al., 2002, 2003; Guo et al., 2000; Kang et al., 2000), and selective deposition of individual REEs in the cytoplasm or chloroplast have been described in green algae (Goetze et al., 2015). REEs properties similarity shared with calcium, ionic radii, electrostatic interaction, or oxygen ligands affinity, might enable Sm to be adsorbed and replaces calcium functions (Corrêa et al., 2017; dos Remedios, 1981; Dressler et al., 2014). There is evidence reported by Tan et al. (2017) of lanthanides competition with Mg^{2+} and Ca^{2+} , although for Mg^{2+} only with high concentrations were observed. It also has coherence with the fact that trivalent lanthanides could bind to the calmodulin protein (specific to Ca^{2+} binding), creating less rigid binding sites with different configurations than with Ca^{2+} binding (Edgington et al., 2018). Although more research is needed, because calcium is essential for good cell development, these theories could also explain REE toxicity at high doses. Moreover, Zhao and Wilkinson (2015) observed enhanced biouptake of several REEs in the presence of ligands, hypothesising that ternary complexes will be formed and contributed to the biouptake.

Increased tolerance to REEs can be induced by exposing the population to metal concentrations or metal-rich dissolutions (Ipatova et al., 2015; Marvá et al., 2014). Another possibility is the bioprospection of microorganisms in contaminated environments, inhabitant strains present increased tolerance to selective pressure they are exposed to (Garbayo et al., 2012; Miazek et al., 2015; Yoshida et al., 2006). Microalgae populations with improved tolerance to REEs can be a promising solution for bioremediation of polluted water and sequestration of REEs. However, increased tolerance can be independent or have negative effects on uptake performance. For further improvement in these technologies and their implementation as an industrial process, in situ tests, as well as bioavailability relations in aquatic environments between Sm and microalgae species are needed.

5. Conclusions

Fluctuation analysis classical experiment can be a good method for obtaining different resistant strains to high concentrations of Sm in acid pH solutions, but uplift tolerance did not necessarily increase the Sm uptake ability. Only one of the three resistant clones isolated increased Sm biouptake compared to the wildtype strain. These strategies can be used alone or in combination, such as gradual increasing selection, to increase Sm and pH tolerance. Physiological and morphometry features could be a promising tool to identify phenotypic related resistant

features of interest for biotechnological applications, however, it is necessary to carry out more studies.

CRedit authorship contribution statement

Paloma Martínez-Alesón García: Investigation, Formal analysis, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, **Camino García-Balboa:** Definition, Methodology, Resources, Investigation, Writing - Review & Editing, **Julia Romero-López:** Writing - Review & Editing, **Victoria López-Rodas:** Definition, Supervision, Funding acquisition, **Eduardo Costas:** Definition, Supervision, Funding acquisition, **Beatriz Baselga-Cervera:** Definition, Conceptualization, Formal analysis, Visualization, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

CAI of geological techniques of the Complutense University of Madrid (C/ José Antonio Nováis 2. 28040-Madrid, Spain). This work was supported by the Fundación Alonso Martín Escudero, Spain, ID: 396[to B.B.C.], and Art. 83 of the the Complutense University of Madrid, Spain.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112134.

References

- Adeel, M., Lee, J.Y., Zain, M., Rizwan, M., Nawab, A., Ahmad, M.A., Shafiq, M., Yi, H., Jilani, G., Javed, R., Horton, R., Rui, Y., Tsang, D.C.W., Xing, B., 2019. Cryptic footprints of rare earth elements on natural resources and living organisms. *Environ. Int.* 127, 785–800. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.022>.
- Alonso, E., Sherman, A.M., Wallington, T.J., Everson, M.P., Field, F.R., Roth, R., Kirchain, R.E., 2012. Evaluating rare earth element availability: a case with revolutionary demand from clean technologies. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3406–3414. <https://doi.org/10.1021/es203518d>.
- Ambaye, T.G., Vaccari, M., Castro, F.D., Prasad, S., Rtimi, S., 2020. Emerging technologies for the recovery of rare earth elements (REEs) from the end-of-life electronic wastes: a review on progress, challenges, and perspectives. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 36052–36074. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09630-2>.
- Ayala, F., Kiger, J., 1980. Modern genetics. Menlo Park, CA.
- Balzano, S., Sardo, A., Blasio, M., Chahine, T.B., Dell'Anno, F., Sansone, C., Brunet, C., 2020. Microalgal metallothioneins and phytochelatin and their potential use in bioremediation. *Front. Microbiol.* 11 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00517>.
- Baselga-Cervera, B., Costas, E., Bustillo-Avendano, E., García-Balboa, C., 2016. Adaptation prevents the extinction of *Chlamydomonas reinhardtii* under toxic beryllium. *PeerJ* 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.1823>.
- Baselga-Cervera, B., Romero-López, J., García-Balboa, C., Costas, E., López-Rodas, V., 2018. Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas* sp. (ChISP Strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. *Front. Microbiol.* 9, 523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00523>.
- Birungi, Z.S., Chirwa, E.M.N., 2014. The kinetics of uptake and recovery of lanthanum using freshwater algae as biosorbents: comparative analysis. *Bioresour. Technol.* 160, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.033>.
- Boyakov, M., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Bunker, B., Boyakov, M.I., Bunker, B.A., Fein, J. B., Fowle, D.A., 2003. Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: a pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 3299–3311. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)01343-1](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01343-1).
- Brown, P.H., Rathjen, A.H., Graham, R.D., Tribe, D.E., 1990. Chapter 92 Rare earth elements in biological systems. *Handb. Phys. Chem. Rare Earths*, pp. 423–452. [https://doi.org/10.1016/S0168-1273\(05\)80135-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1273(05)80135-7).
- Chua, H., 1998. Bio-accumulation of environmental residues of rare earth elements in aquatic flora *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in Guangdong Province of China. *Sci. Total Environ.* 214, 79–85. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00055-2).

- Čížková, M., Mezrický, D., Rucki, M., Tóth, T.M., Náhlík, V., Lanta, V., Bišová, K., Zachleder, V., Vítová, M., 2019. Bio-mining of lanthanides from red mud by green microalgae. *Molecules* 24, 1356. <https://doi.org/10.3390/molecules24071356>.
- Correia, F. do N., Luna, A.S., da Costa, A.C.A., 2017. Kinetics and equilibrium of lanthanum biosorption by free and immobilized microalgal cells. *Adsorpt. Sci. Technol.* 35, 137–152. <https://doi.org/10.1177/0263617416672667>.
- Crémazy, A., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2013. The biotic ligand model can successfully predict the uptake of a trivalent ion by a unicellular alga below pH 6.50 but not above: possible role of hydroxo-species. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2408–2415. <https://doi.org/10.1021/es3038388>.
- Crow, J.F., Kimura, M., 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Universidad de California.
- dos Remedios, C.G., 1981. Lanthanide ion probes of calcium-binding sites on cellular membranes. *Cell Calcium* 2, 29–51. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(81\)90044-0](https://doi.org/10.1016/0143-4160(81)90044-0).
- Dressler, L., Golbik, R., Ulbrich-Hofmann, R., 2014. Lanthanides as substitutes for calcium ions in the activation of plant α -Type phospholipase D. *Biol. Chem.* 395, 791–799. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0112>.
- Dunbar, W.S., 2017. Biotechnology and the mine of tomorrow. *Trends Biotechnol.* 35, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.07.004>.
- Edington, S.C., Gonzalez, A., Middendorf, T.R., Halling, D.B., Aldrich, R.W., Baiz, C.R., 2018. Coordination to lanthanide ions distorts binding site conformation in calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E3126–E3134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722042115>.
- Emsley, J., 2011. Nature's building blocks: an AZ guide to the elements.
- Evseeva, T., Geras'kin, S., Majstrenko, T., Brown, J., Belykh, E., 2010. Comparative estimation of 232Th and stable Ce (III) toxicity and detoxification pathways in freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 81, 1320–1327. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.028>.
- Fathollahzadeh, H., Eksteen, J.J., Kaksonen, A.H., Watkin, E.L.J., 2019. Role of microorganisms in bioleaching of rare earth elements from primary and secondary resources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 1043–1057. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9526-z>.
- Gammons, C.H., Wood, S.A., Jonas, J.P., Madison, J.P., 2003. Geochemistry of the rare earth elements and uranium in the acidic Berkeley Pit lake, Butte, Montana. *Chem. Geol.* 198, 269–288. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(03)00034-2).
- Garbayo, I., Torronteras, R., Forján, E., Cuaresma, M., Casal, C., Magedas, B., Ruiz-Domínguez, M.C., Márquez, C., Vaquero, I., Fuentes-Cordero, J.L., Fuentes, R., González-del-Valle, M., Vilchez, C., 2012. Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain). *J. Phycol.* 48, 607–614. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01160.x>.
- García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., García-Sánchez, A., Igual, J.M., López-Rodas, V., Costas, E., 2013. Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: an explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquat. Toxicol.* 144–145, 116–123. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2013.10.003>.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 990, 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9).
- Giese, E., 2018. Rare Earth Elements: therapeutic and diagnostic applications in modern medicine. *Clin. Med. Rep.* 2. <https://doi.org/10.15761/cmr.1000139>.
- Giese, E.C., Caio, Jordão, S., 2019. Biosorption of lanthanum and samarium by chemically modified free *Bacillus subtilis* cells. *Appl. Water Sci.* 9, 182. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-1052-3>.
- Goecke, F., Jerez, C.G., Zachleder, V., Figueroa, F.L., Bičková, K., Āzanka, T., Vá-tová, J.M., 2015. Use of lanthanides to alleviate the effects of metal ion-deficiency in *Desmodesmus quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Front. Microbiol.* 6, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00002>.
- Gong, X., Hong, M., Wang, Y., Zhou, M., Cai, J., Liu, C., Gong, S., Hong, F., 2011. Cerium relieves the inhibition of photosynthesis of maize caused by manganese deficiency. *Biol. Trace Elem. Res.* 141, 305–316. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8716-z>.
- GraphPad Prims, n.d.
- Guo, P., Wang, J., Li, X., Zhu, J., Reinert, T., Heitmann, J., Spemann, D., Vogt, J., Flügge, R.H., Butz, T., 2000. Study of metal bioaccumulation by nuclear microprobe analysis of algae fossils and living algae cells. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 161, 801–807. [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(99\)00933-7](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(99)00933-7).
- Gupta, V.K., Rastogi, A., 2008. Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by nonliving algal biomass *Oedogonium* sp. from aqueous phase. *J. Hazard. Mater.* 153, 759–766. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.021>.
- Gutiérrez, J.C., Martín-González, A., Díaz, S., Ortega, R., 2003. Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution. *Eur. J. Protistol.* 39, 461–467. <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00021>.
- Ipatova, V.I., Spirikina, N.E., Dmitrieva, A.G., 2015. Resistance of microalgae to colloidal silver nanoparticles. *Russ. J. Plant Physiol.* 62, 253–261. <https://doi.org/10.1134/S1021443715010082>.
- Kang, L., Shen, Z., Jin, C., 2000. Neodymium cations Nd³⁺ were transported to the interior of *Euglena gracilis* 277. *Chin. Sci. Bull.* 45, 585–592. <https://doi.org/10.1007/BF02886032>.
- Karavalko, G.I., Kareva, A.S., Avakian, Z.A., Zakharova, V.I., Korenevsky, A.A., 1996. Biosorption of scandium and yttrium from solutions. *Biotechnol. Lett.* 18, 1291–1296. <https://doi.org/10.1007/BF00129957>.
- Kosak née Rohder, L.A., Brandt, T., Sigg, L., Behra, R., 2018. Uptake and effects of cerium (III) and cerium oxide nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat. Toxicol.* 197, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.004>.
- Kucuk, M.A., Wiecek, N., Kuchta, K., Cotty, N.K., 2017. Biosorption of neodymium on *Chlorella vulgaris* in aqueous solution obtained from hard disk drive magnets. *PLoS One* 12, e0175255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175255>.
- Kulaksiz, S., Bau, M., 2013. Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers. *Earth Planet. Sci. Lett.* 362, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2012.11.033>.
- Lerat-Hardy, A., Coynel, A., Dutrich, L., Pereto, C., Bossy, C., Gil-Diaz, T., Capdeville, M. J., Blanc, G., Schäfer, J., 2019. Rare Earth Element fluxes over 15 years into a major European Estuary (Garonne-Gironde, SW France): Hospital effluents as a source of increasing gadolinium anomalies. *Sci. Total Environ.* 409–420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.343>.
- Li, X., Zhang, C., Wang, L., Zhang, S., 1998. Geochemistry of rare earth elements in the mainstream of the Yangtze River, China. *Appl. Geochem.* 13, 451–462. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(97\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(97)00079-6).
- López-Rodas, V., Agrelo, M., Carrillo, E., Ferrero, L.M., Larrauri, A., Martín-Otero, L., Costas, E., 2001. Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations. *Eur. J. Phycol.* 36, 179–190. <https://doi.org/10.1017/S0967026201003109>.
- Luria, S., Delbrück, M., 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28, 491.
- Lustigman, B., Lee, L.H., Weiss-Magasic, C., 1995. Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 65–72. <https://doi.org/10.1007/BF00212390>.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>.
- Mann, H., Fyfe, W.S., Kerrich, R., 1988. The chemical content of algae and waters: bioconcentration. *Toxic. Assess.* 3, 1–16. <https://doi.org/10.1002/tox.2540030103>.
- Marv, F., García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., Costas, E., 2014. Rapid adaptation of some phytoplankton species to osmium as a result of spontaneous mutations. *Ecotoxicology* 23, 213–220. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1164-8>.
- Messeri, M.A., Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E., Jung, S.K., Smith, P.J.S., Sogin, M.L., 2005. Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *J. Exp. Biol.* 208, 2569–2579. <https://doi.org/10.1242/jeb.01660>.
- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D., 2015. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23929–23969. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>.
- Migaszewski, Z.M., Galuszka, A., 2015. The characteristics, occurrence, and geochemical behavior of rare earth elements in the environment: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 429–471. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.866622>.
- Pagano, G., Aliberti, F., Guida, M., Oral, R., Siciliano, A., Trifuoggi, M., Tommasi, F., 2015. Rare earth elements in human and animal health: state of art and research priorities. *Environ. Res.* 142, 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.039>.
- Palasz, A., Czekaj, P., 2000. Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochim. Pol.* <https://doi.org/10.18388/abp.2000.3963>.
- Pang, X., Li, D., Peng, A., 2002. Application of rare-earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 143–148. <https://doi.org/10.1007/BF02987462>.
- Priyadarshini, E., Priyadarshini, S.S., Pradhan, N., 2019. Heavy metal resistance in algae and its application for metal nanoparticle synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3297–3316. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09685-3>.
- R Core Team, 2019.
- Rowell, J.A., Fillion, M.A., Smith, S., Wilkinson, K.J., 2018. Determination of the speciation and bioavailability of samarium to *Chlamydomonas reinhardtii* in the presence of natural organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1623–1631. <https://doi.org/10.1002/etc.4106>.
- Salomé, P.A., Merchant, S.S., 2019. A series of fortunate events: introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *Plant Cell* 31, 1682–1707. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00952>.
- Sandau, E., Sandau, P., Pulz, O., 1996. Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnol.* 16, 227–235. <https://doi.org/10.1002/abio.370160402>.
- Sastre de Vicente, M.E., Herrero, R., Lodeiro, P., Cordero, B., 2004. Biosorption of cadmium by *Fucus spiralis*. *Environ. Chem.* 1, 180. <https://doi.org/10.1071/EN04039>.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10, 51–62. <https://doi.org/10.1007/BF00024185>.
- Shen, C., Xu, J., Fish, J.Y.-F., 2003. U., 2003. Effect of the rare earth element of Eu on the growth and chlorophyll content of *Chlorella vulgaris*.
- Shen, H., Ren, Q.G., Mi, Y., Shi, X.F., Yao, H.Y., Jin, C.Z., Huang, Y.Y., He, W., Zhang, J., Liu, B., 2002. Investigation of metal ion accumulation in *Euglena gracilis* by fluorescence methods. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 189, 506–510. [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(01\)01132-6](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(01)01132-6).
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14, 2837–2847. <https://doi.org/10.1105/tpc.004853>.
- Sneller, F., Kalf, A., Weltje, L., Van Wezel, A., 2000. Maximum Permissible Concentrations and Negligible Concentrations for Rare Earth Elements (REEs) VL - JO - RIVM report 601501011 ER - Bilthoven, The Netherlands.

- Suresh Kumar, K., 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>.
- Tai, P., Zhao, Q., Su, D., Li, P., Stagnitti, F., 2010. Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere* 80, 1031–1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.030>.
- Tan, Q.G., Yang, G., Wilkinson, K.J., 2017. Biotic ligand model explains the effects of competition but not complexation for Sm biouptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 168, 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.051>.
- Tyler, G., 2004. Rare earth elements in soil and plant systems - a review. *Plant Soil* 267, 191–206. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4888-2>.
- Valcheva-Traykova, M., Saso, L., Kostova, I., 2014. Involvement of lanthanides in the free radicals homeostasis. *Curr. Top. Med. Chem.* 14, 2508–2519. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141203123620>.
- Volland, S., Bayer, E., Baumgartner, V., Andosch, A., Lütz, C., Sima, E., Lütz-Meindl, U., 2014. Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Microcystis* by divalent ions. *J. Plant Physiol.* 171, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.002>.
- Yang, G., Wilkinson, K.J., 2018. Bioavailability of a rare earth metal (Nd) by *Chlamydomonas reinhardtii* - Bioavailability of small organic complexes and role of hardness ions. *Environ. Pollut.* 243, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.066>.
- Yang, G., Tan, Q.G., Zhu, L., Wilkinson, K.J., 2014. The role of complexation and competition in the biouptake of europium by a unicellular alga. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2609–2615. <https://doi.org/10.1002/etc.2722>.
- Yang, G., Hadioui, M., Wang, Q., Wilkinson, K.J., 2019. Role of pH on indium bioaccumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Pollut.* 250, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.116>.
- Yoshida, N., Ikeda, R., Okuno, T., 2006. Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation. *Bioresour. Technol.* 97, 1843–1849. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.08.021>.
- Zhang, S., Shan, X. quan, 2001. Speciation of rare earth elements in soil and accumulation by wheat with rare earth fertilizer application. *Environ. Pollut.* 112, 395–405. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00143-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00143-3).
- Zhao, C.M., Wilkinson, K.J., 2015. Biotic ligand model does not predict the bioavailability of rare earth elements in the presence of organic ligands. *Environ. Sci. Technol.* 49, 2207–2214. <https://doi.org/10.1021/es505443s>.
- Zhuang, M., Zhao, J., Li, S., Liu, D., Wang, K., Xiao, P., Yu, L., Jiang, Y., Song, J., Zhou, J., Wang, L., Chu, Z., Zhuang, M., Zhao, J., Li, S., Liu, D., Wang, K., Xiao, P., Yu, L., Jiang, Y., Song, J., Zhou, J., Wang, L., Chu, Z., Zhuang, M., Zhao, J., Li, S., Liu, D., Wang, K., Xiao, P., Yu, L., Jiang, Y., Song, J., Zhou, J., Wang, L., Chu, Z., 2017. Concentrations and health risk assessment of rare earth elements in vegetables from mining area in Shandong, China. *Chemosphere* 168, 578–582. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.023>.

Anexo 4.

1.1.Datos Brutos de los contajes de las cepas seleccionadas por caída en medio sin Sm y con Sm. Se incluyen los datos de los contajes iniciales a los distintos días incluyendo los de los inóculos iniciales.

Día 0

Cepa	Replicados				Promedio	cel·mL	Inóculo (mL)	BG11 (mL)
CONTROL	33562	32929	31955	31827	32568,25	6513650	0,154	9,846
SMR0	10584	9071	8770	8808	9308,25	1861650	0,537	9,463
SMR1	7510	7347	6788	6939	7146	1429200	0,700	9,300
SMR2	3779	4312	3661	3724	3869	773800	1,292	8,708
SMR3	9070	8908	8603	8816	8849,25	1769850	0,565	9,435
SMR4	10221	9712	9612	9845	9847,5	1969500	0,508	9,492

BG11

Día 5

Cepas	Replicados			Promedio	cel·mL	
C1	1981	1943	1840	1789	1888,25	377650
C2	3017	2863	2866	2806	2888	577600
C3	2584	2541	2520	2420	2516,25	503250
R0.1	2906	2667	2294	2247	2528,5	505700
R0.2	2152	2021	2016	2069	2064,5	412900
R0.3	1959	1735	1716	1666	1769	353800
R1.1	2446	2344	2394	2308	2373	474600
R1.2	2336	2462	2146	2133	2269,25	453850
R1.3	2165	2142	2191	2201	2174,75	434950
R2.1	4141	4557	4242	4454	4348,5	869700
R2.2	4064	3976	3848	3779	3916,75	783350
R2.3	4315	4062	3923	3861	4040,25	808050
R3.1	3581	3215	3229	3337	3340,5	668100
R3.2	3452	3330	3302	3427	3377,75	675550
R3.3	2964	3119	2781	2855	2929,75	585950
R4.1	3353	2699	3036	2960	3012	602400
R4.2	3723	3449	3397	3401	3492,5	698500
R4.3	3884	3713	3652	3731	3745	749000

Día 10

	Replicados			Promedio	cel·mL	
C1	3706	3717	3546	3547	3629	725800
C2	5276	5129	5021	4956	5096	1019100
C3	5010	5009	4953	4874	4962	992300
R0.1	4354	4195	4309	4233	4273	854550
R0.2	4539	4590	4456	4363	4487	897400

R0.3	5086	4653	4551	4521	4703	940550
R1.1	5434	5364	5186	5232	5304	1060800
R1.2	4318	4317	4141	4105	4220	844050
R1.3	5148	5107	4984	5006	5061	1012250
R2.1	7206	7497	7210	7277	7298	1459500
R2.2	7142	6666	6516	6763	6772	1354350
R2.3	7743	7083	7033	6634	7123	1424650
R3.1	6169	6263	6251	6030	6178	1235650
R3.2	6376	6737	6249	6248	6403	1280500
R3.3	6857	7164	6762	7913	7174	1434800
R4.1	6905	6861	6777	6733	6819	1363800
R4.2	6298	5963	5812	5927	6000	1200000
R4.3	6571	6654	6857	6866	6737	1347400

Día 14

		Replicados			Promedio	cel·mL
C1	4705	4348	4256	4301	4403	880500
C2	6723	6681	6484	6168	6514	1302800
C3	6376	5941	5898	5844	6015	1202950
R0.1	6155	6174	5580	5491	5850	1170000
R0.2	6745	6463	6670	6610	6622	1324400
R0.3	6770	6846	6666	6421	6676	1335150
R1.1	5606	5795	5740	5576	5679	1135850
R1.2	6122	6005	5908	5856	5973	1194550
R1.3	7112	7038	7026	7028	7051	1410200
R2.1	8795	8303	8130	8051	8320	1663950
R2.2	8698	8583	8591	8289	8540	1708050
R2.3	8834	8883	8462	8380	8640	1727950
R3.1	7094	6935	6585	6724	6835	1366900
R3.2	8588	7809	7556	7590	7886	1577150
R3.3	8500	8036	7753	7863	8038	1607600
R4.1	7480	7461	7331	7305	7394	1478850
R4.2	8088	7461	7273	7391	7553	1510650
R4.3	8044	8029	7711	7810	7899	1579700

Día 19

		Replicados			Promedio	cel·mL
C1	6336	6098	5965	5759	6039,5	1207900
C2	8463	8212	7845	7924	8111	1622200
C3	9362	9066	9198	8415	9010,25	1802050
R0.1	7430	7430	7190	7162	7303	1460600
R0.2	7240	7506	7276	7002	7256	1451200
R0.3	10137	9839	9357	9577	9727,5	1945500
R1.1	7191	6897	6570	6346	6751	1350200
R1.2	7573	7160	7492	6804	7257,25	1451450
R1.3	9681	10004	10046	9305	9759	1951800
R2.1	10099	10095	9828	9527	9887,25	1977450

R2.2	9663	9127	8922	9114	9206,5	1841300
R2.3	10942	10760	10992	10884	10894,5	2178900
R3.1	8128	8253	8002	7664	8011,75	1602350
R3.2	9230	8423	7926	7862	8360,25	1672050
R3.3	11497	10328	9948	10084	10464,25	2092850
R4.1	10289	9422	8702	8550	9240,75	1848150
R4.2	10004	8870	8685	8549	9027	1805400
R4.3	10531	10418	10303	9824	10269	2053800

Sm

Día 5

		Replicados		Promedio	cel·mL	
C1	3010	3021	2920	2836	2946,75	589350
C2	2673	2547	2513	2437	2542,5	508500
C3	3681	3381	3255	3164	3370,25	674050
R0.1	1412	1436	1549	1451	1462	292400
R0.2	1721	1691	1606	1617	1658,75	331750
R0.3	1176	1332	1475	1354	1334,25	266850
R1.1	3860	2374	2409	2473	2779	555800
R1.2	1878	1755	1695	1811	1784,75	356950
R1.3	1477	1505	1530	1800	1578	315600
R2.1	3286	3094	3074	3001	3113,75	622750
R2.2	4064	4074	4186	4042	4091,5	818300
R2.3	4088	3791	4701	4290	4217,5	843500
R3.1	3996	4266	4143	3630	4008,75	801750
R3.2	4886	5440	5086	4871	5070,75	1014150
R3.3	2887	1874	1985	1921	2166,75	433350
R4.1	3469	3086	2982	2974	3127,75	625550
R4.2	3121	3372	3409	3088	3247,5	649500
R4.3	2344	2574	2701	2616	2558,75	511750

Día 10

		Replicados		Promedio	cel·mL	
C1	4435	4436	4309	4315	4373,75	874750
C2	4733	4756	4604	4553	4661,5	932300
C3	5799	5469	5210	5314	5448	1089600
R0.1	3550	3473	3245	3292	3390	678000
R0.2	3059	3006	2993	3034	3023	604600
R0.3	3943	3753	3374	3443	3628,25	725650
R1.1	4832	4670	4606	4580	4672	934400
R1.2	4299	4481	4415	4194	4347,25	869450
R1.3	3028	2999	3258	3428	3178,25	635650
R2.1	4688	4900	6158	6111	5464,25	1092850
R2.2	6623	6885	7669	6943	7030	1406000
R2.3	5911	5815	5794	5570	5772,5	1154500
R3.1	4460	5007	4746	4704	4729,25	945850

R3.2	5566	6010	5984	6014	5893,5	1178700
R3.3	4250	4263	4519	4175	4301,75	860350
R4.1	5263	5524	5933	5775	5623,75	1124750
R4.2	5594	5629	5544	5598	5591,25	1118250
R4.3	6506	4880	4936	4699	5255,25	1051050

Día 14

		Replicados			Promedio	cel·mL
C1	6496	5882	5883	5708	5992,25	1198450
C2	5578	5483	5384	5285	5432,5	1086500
C3	6037	5851	5605	5587	5770	1154000
R0.1	5341	5112	5117	5061	5157,75	1031550
R0.2	5153	4826	4662	4645	4821,5	964300
R0.3	5254	5236	4766	4892	5037	1007400
R1.1	4464	4311	4331	4292	4349,5	869900
R1.2	4661	4810	4627	4599	4674,25	934850
R1.3	3968	3924	3777	3664	3833,25	766650
R2.1	5734	6049	5790	5750	5830,75	1166150
R2.2	7730	7992	7668	7771	7790,25	1558050
R2.3	7732	7607	7206	7078	7405,75	1481150
R3.1	5256	4964	4992	4965	5044,25	1008850
R3.2	6219	6213	6259	6245	6234	1246800
R3.3	4954	4914	4916	4771	4888,75	977750
R4.1	6641	6957	7349	6525	6868	1373600
R4.2	6797	6967	6847	6812	6855,75	1371150
R4.3	6292	5977	6086	6041	6099	1219800

Día 19

		Replicados			Promedio	cel·mL
C1	7098	6861	6636	6429	6756	1351200
C2	7128	6930	6814	7288	7040	1408000
C3	8311	7992	7921	7575	7949,75	1589950
R0.1	7172	7079	6796	6463	6877,5	1375500
R0.2	8899	8815	8403	8524	8660,25	1732050
R0.3	8478	7993	7802	7832	8026,25	1605250
R1.1	5216	5256	5189	4924	5146,25	1029250
R1.2	5941	6123	5999	5611	5918,5	1183700
R1.3	5909	5626	5445	5146	5531,5	1106300
R2.1	5976	6316	6075	6006	6093,25	1218650
R2.2	8474	8309	8392	8375	8387,5	1677500
R2.3	8303	8646	8608	8037	8398,5	1679700
R3.1	5649	5748	5642	5519	5639,5	1127900
R3.2	7101	6894	6775	6785	6888,75	1377750
R3.3	6051	6263	6131	6262	6176,75	1235350
R4.1	7446	7214	7080	7549	7322,25	1464450
R4.2	9604	9802	9530	9554	9622,5	1924500
R4.3	7932	8074	8918	7977	8225,25	1645050

1.2. Datos brutos resumidos de las medidas morfométricas de las cepas seleccionadas por caída.

	Control	CSm0	CSm4
Media Área	0,00005133	0,00004836	0,00003706
SD	0,00001347	0,00001911	0,00001144
Media Perímetro	0,03212	0,04282	0,03439
SD	0,00533	0,01348	0,007007
Media D	0,008784	0,008350	0,007602
SD	0,0011	0,001483	0,0009644
Media d	0,007353	0,007146	0,006138
SD	0,001211	0,001647	0,001111
Media CFd	0,8364	0,8529	0,8070
SD	0,08702	0,1163	0,1009
Media CFc	0,6403	0,3675	0,4072
SD	0,1554	0,1528	0,1055

Anexo 5.

García-Balboa, C., Martínez-Alesón García, P., López-Rodas, V., Costas, E., & Baselga-Cervera, B. (2022). Microbial biominers: Sequential bioleaching and biouptake of metals from electronic scraps. *MicrobiologyOpen*, e1265. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1265>

Received: 15 December 2021 | Accepted: 18 January 2022

DOI: 10.1002/mbo3.1265

ORIGINAL ARTICLE

MicrobiologyOpen  WILEY

Microbial biominers: Sequential bioleaching and biouptake of metals from electronic scraps

Camino García-Balboa¹  | Paloma Martínez-Alesón García¹  |
Victoria López-Rodas¹ | Eduardo Costas¹ | Beatriz Baselga-Cervera^{2,3} 

¹Animal Science (Genetics), School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

²Ecology, Evolution and Behavior Department, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, USA

³Minnesota Center for Philosophy of Science, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA

Correspondence

Camino García-Balboa, Animal Science (Genetics), School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid 28040, Spain.
Email: camino@ucm.es

Funding information

Fundación Alfonso Martín Escudero, Grant/Award Number: 2048

Abstract

Electronic scraps (e-scraps) represent an attractive raw material to mine demanded metals, as well as rare earth elements (REEs). A sequential microbial-mediated process developed in two steps was examined to recover multiple elements. First, we made use of an acidophilic bacteria consortium, mainly composed of *Acidiphilium multivorum* and *Leptospidillum ferriphilum*, isolated from acid mine drainages. The consortium was inoculated in a dissolution of e-scraps powder and cultured for 15 days. Forty-five elements were analyzed in the liquid phase over time, including silver, gold, and 15 REEs. The bioleaching efficiencies of the consortium were >99% for Cu, Co, Al, and Zn, 53% for Cd, and around 10% for Cr and Li on Day 7. The second step consisted of a microalgae-mediated uptake from e-scraps leachate. The strains used were two acidophilic extremotolerant microalgae, *Euglena* sp. (EugVP) and *Chlamydomonas* sp. (ChISG) strains, isolated from the same extreme environment. Up to 7.3, 4.1, 1.3, and 0.7 µg by wet biomass (WB) of Zn, Al, Cu, and Mn, respectively, were uptaken by ChISG biomass in 12 days, presenting higher efficiency than EugVP. Concerning REEs, ChISG biouptake 14.9, 20.3, 13.7, 8.3 ng of Gd, Pr, Ce, La per WB. Meanwhile, EugVP captured 1.1, 1.5, 1.4, and 7.5, respectively. This paper shows the potential of a microbial sequential process to revalorize e-scraps and recover metals and REEs, harnessing extremotolerant microorganisms.

KEYWORDS

bioleaching, biouptake, electronic scraps, extremotolerant, metals, microalgae, rare earth elements

1 | INTRODUCTION

The global volume of electronic scraps (e-scraps) was estimated at 44.7 million metric tons in 2016, and the combined annual growth from 2017 to 2025 is calculated as a 4.1% rate (Grand View Research, 2018). The two main applications of e-scraps are disposal (including landfilling and incineration) or recycling, which represents

12.5% of the total. E-scraps incineration and landfilling pose a series of challenges related to space scarcity and ecological aspects. Moreover, e-scraps represent environmental hazardous wastes due to their content of heavy metals such as lead (Pb), cadmium (Cd) or mercury (Hg), and other harmful substances (i.e., polyvinyl chloride and brominated flame retardants (Cao et al., 2016; Kiddee et al., 2013; Wäger et al., 2012; Xue et al., 2012)). This makes them a

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *MicrobiologyOpen* published by John Wiley & Sons Ltd.

MicrobiologyOpen. 2022;e1265.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1265>

www.MicrobiologyOpen.com

1 of 14

possible source of contamination of the atmosphere, sediments, and water streams. On the other hand, they contain high amounts of valuable materials, including copper (Cu), iron (Fe), gold (Au), or rare earth elements (REEs), even in higher values than natural ores (Cao et al., 2016; Cucchiella et al., 2015; Tan et al., 2015; Wibowo & Deng, 2015), making them a source of raw materials.

The change in focus of many countries toward waste-to-resource policies promotes mining from solid waste, instead of exploiting new sources (European Waste Electrical and Electronic Equipment Directive [2012/19/EU]). There are already examples of the harnessing of scraps, such as the regeneration of lithium electrode scraps to obtain new cathodes for lithium-ion batteries (Zhang et al., 2016), or the recovery of copper and other precious metals from circuit boards scraps through a two steps method consisting of a combination of mechanical and electrometallurgical process (Mecucci & Scott, 2002; Veit et al., 2006), to name a few. The biotechnological approach has also been employed with this objective, and in fact, there are several publications about these applications. For example, the recovery of gold and palladium from e-scrap with a sulfate-reducing bacterium (Creamer et al., 2006) and biorecovery of gold from e-scrap material through a mutated cyanogenic bacterium (Natarajan et al., 2015; Natarajan & Ting, 2014). So, there is an increasing effort to develop new technologies for the valorizing of e-scrap. However, there are no studies that string together microbial e-scrap leaching and elements recovery processes. One of the challenges encountered is the extreme pH values (3.6) yielded from the bioleaching process. This drawback may be overcome by employing biomass. But this option is limited by the amount of biomass used and mediated by passive accumulation (Drexler & Yeh, 2014; He & Chen, 2014). Another alternative is to employ extremotolerant microorganisms.

In this study, we investigate the bioleaching and/or accumulation abilities of different groups of microorganisms for the revalorization and metal extraction from e-scrap. We propose a two-phase process, the first stage of bioleaching from solid e-scrap mediated by a bacteria consortium, followed by the second step of capture with microalgae. Specifically, for the first bioleaching phase, we made use of a bacteria consortium mainly composed of *Acidiphilium multivorum* and *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a uranium mining site. For the second step of biocapture, we evaluated microalgae-mediated metals recovery from leachate of e-scrap. More specifically, *Chlamydomonas* sp. and *Euglena* sp. extremotolerant microalgae, natural inhabitants of uranium acid drainage tailings (Baselga-Cervera et al., 2018, 2019, 2020; García-Balboa et al., 2013). The novelty of this work is the potential synergic effect from the combination of bioleaching and bio-uptaking to revalorize and extract valuable metals from e-scrap.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | E-scrap material

E-scrap raw material was supplied by LYRSA-Derichbourg, a Spanish company specializing in the recycling and management of

industrial waste and e-scrap. We employed as e-scrap a residual powder, the fraction resulting from the recycling process after shedding and mechanical separation. E-scrap powder was composed of solids of 1–3 mm of particle size. The characteristic materials composition of the e-scrap is detailed in Appendix Table A1 (corresponds to "E-scrap metallic content").

2.2 | Experimental microorganism isolation and culture conditions

Liquid samples of acid mine drainage were collected for the recovery of chemolithotrophic bacteria at the uranium mining sites of Saelices, and Villavieja in Salamanca (Spain) (García-Balboa et al., 2013). Selection of a Fe-oxidant and S-oxidant chemolithoautotrophic bacteria consortium was performed culturing 10 ml of mine samples (Villavieja) in 90 ml of 9k medium (Silverman & Lundgren, 1959) at pH 3.05. The bacterial consortium was maintained by successive passes in a fresh 9k medium to eliminate possible traces of REE and other metals present in the original sample.

Two extremophile microalgae strains one Chlorophyceae *Chlamydomonas* sp. (ChlSG) strain (Baselga-Cervera et al., 2018, 2019) and one Euglenaceae *Euglena* sp. (EugVP) strain (Baselga-Cervera et al., 2020) were isolated from the uranium mine acid drainage at Saelices and Villavieja, respectively. Both strains were cultured in filtered mine water enriched with BG-11 standard broth (Sigma-Aldrich). Mine waters used to prepare the media were: Saelices water for ChlSG and Villavieja water for EugVP, with final pH of 3.6 ± 0.2 , and 2.5 ± 0.3 , respectively (mine water physicochemical characteristics can be consulted in (García-Balboa et al., 2013). For regular maintenance, cultures were grown in 50–250 ml cell culture flasks (Greiner; Bio-one Inc.), under continuous light conditions and at $80 \mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$ over the waveband 400–700 nm and $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ temperature. Both strains are deposited in the culture collection of the research group Albiotox, Universidad Complutense de Madrid, Spain. *Chlamydomonas* sp. ChlSG strain has been described and characterized by the research group (ChlSG strain [Baselga-Cervera et al., 2018, 2019]).

2.3 | Microbial consortium identification

High-throughput sequencing was conducted at Secugen S.L. Total bacterial genomic DNA was extracted by a mechanical breakdown with zirconia beads. PCR amplification of the 16S rRNA genes was performed with the Barcoding kit (SQK-16S024) of Nanopore, obtaining at least 2000 reads with Oxford Nanopore MinION FLO-MIN106 technology. We obtained the different operational taxonomic units (OTUs) and compared them with the Ribosomal Database Project of Michigan State University. The syntax file obtained was used to calculate the proportion of each OTU and the reads of the 16S were also analyzed with Epi2me of Oxford Nanopore. Low abundance OTUs (singletons, doublets, and triplets) were considered errors/artifacts and removed from the analyses (agreeing with Zhan et al., 2014).

2.4 | Bioleaching tests and leaching ability determination

Bioleaching was carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks with 100 ml final volume of 9k medium pH (2.05) without any additional source of energy (Fe or S) and 1% e-scrap w/v. Two flasks were inoculated with the bacterial consortium described previously and two flasks without bacterial inoculum were used as control. Bioleaching trials were maintained in agitation (250 rpm) and at 30°C for 15 days. Bacterial inoculum consisted of 20 ml of a saturated culture of the selected bacterial consortium. During the biolixiviation experiment, the bacterial consortium thrived using e-scrap as a primary source of energy.

Samples were collected on days 7 and 15 since the inoculum. The whole volume of each Erlenmeyer flask was sampled. Samples were filtered with a sterile filter of 0.45 microns of pore size to separate the liquid and solid phases. The liquid phase, leachate, and pellet were analyzed for 45 elements concentration and preserved for the next bio-uptake experiment. The solid phase was also recovered to analyze the elemental composition and compare it with the starting material.

Leaching ability (L_i) of each element i was obtained as in the following equation (Savvilitidou et al., 2015):

$$L_i = (C_{ie} \times V)/M, \quad (1)$$

where L_i is the leaching ability for element i (mg/g), C_{ie} the concentration of element i in the leachate at time e (mg/L), M the mass of the e-scrap powder sample (g), and V the final volume of the leaching solution (L).

The extraction efficiency (E_i) for each element was thus calculated by referring the leaching ability to the initial concentration in the e-scrap powder, as given in the following equation (Chen et al., 2015):

$$E_i(\%) = (L_i/C_{in}) \times 100, \quad (2)$$

where C_{in} is the concentration of element i in the e-scrap powder.

2.5 | Bio-uptake studies

Metal bio-uptake capacity from e-scrap leachate—recovered liquid phase—was measured in the ChISG and EugVP strains. Cells from both strains were grown for 20 days to the stationary phase before exposure. Twelve Greiner flasks with a final volume of 10 ml were established: four with ChISG, four with EugVP, and four without cells. Each Greiner contained 9 ml of the filtered phase from the 15 day leachate and 1 ml of the microbial culture (grown in BG-11 culture medium) or fresh BG-11 media in the controls. Starting pH values of the study and control dissolutions were 3.55. The initial inoculum consisted of $\sim 3.5 \pm 1.1 \times 10^5$ cells for the ChISG strain, and $\sim 2.1 \pm 0.5 \times 10^3$ cells for the EugVP strain.

The whole volume of one vial of each one of the three groups (ChISG, EugVP, and controls) was sampled at four different times: 0, 6, 144, and 288 h respectively. Each sample was processed in the following manner: first, an aliquot of the vial was used to check the appearance of the cultures and verify the viability of the cells with optical microscopy (inverted phase-contrast fluorescence microscope [Axiovert 35; Zeiss] with a coupled camera [Axio Cam MRc; Zeiss]). Cellular densities were directly counted using a hemocytometer under the microscope (Hoshaw & Rosowski, 1973). Later, the whole volume of each culture was centrifuged (4000 rpm for 15 min), supernatants were discarded, and pellets were preserved for metal analysis.

2.6 | Analytical methods

Multiple metal screening was conducted in the two-phase process—bioleaching and bio-uptake—to extract metals from e-scrap. Metal analysis of solid samples required digestion in aqua regia solution (3 HCl: 1 HNO₃, in volume) at 220°C that was performed in micro-waves of high pressure. Analyses were performed with an Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES; Arcos). Liquid samples were dissolved in HNO₃ before analyses. Metal concentrations of liquid samples were performed using an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS; Bruker Aurora Elite). Cellular pellets were digested in an acidic medium (0.2 ml of HNO₃ 65% Suprapur) for 24 h at 40°C, in Teflon pumps Savillex. Later the analyses were performed with ICP-MS.

2.7 | Scanning electron microscopy (SEM)

For SEM, EugVP cells harvested by centrifugation were fixed in paraformaldehyde (4%)—glutaraldehyde (2.5%) for an hour at 4°C (pH was not adjusted and kept at pH ~3), postfixed samples were washed with H₂O twice. Fixed samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol, dried with a critical point dryer, and gold-coated for SEM examination.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Metal composition of e-scrap

E-scrap was chemically characterized to identify the metals concentrations, presenting a complex composition. E-scrap metallic content consisted mainly of zinc (7.3%), aluminum (5.9%), titanium (5.2%), magnesium (4.6%), and important amounts of barium (3.35%), manganese (3.3%), lead (1.6%), and copper (1%), among others (a complete description of the metals analyzed can be found in Appendix Table A1). The other 75% of the scrap comprised other non-tested metals and non-metal content, probably plastic matter, and other organic components.

The metal composition of e-scrap varies considerably depending on age, manufacturer, and composition, as previously reviewed by Cui and Zhang (2008). There is not a generic composition, and the content of precious metals decreases due to modern manufacturing. In contrast, the content of REE increases because of the intensive use of these elements in electric and electronic components. Different compositions may demand different microbial approaches and render different yields. For example, for printed circuit boards composition range of 10%–27% Cu, 8%–38% Fe, 2%–19% Al, 0.3%–2% Ni (Cui & Forssberg, 2007; Ilyas et al., 2007).

3.2 | Bacterial consortia composition

As expected, the majority of the OTUs presented low abundance and were "rare" (see Supporting Information at <https://doi.org/10.5281/zenodo.5819060>). For the present study, we considered the role of the rare bacteria in the bioleaching process as negligible. The two major species identified in the consortium were *A. multivorum* (66% of the OTUs) an acidophilic chemoorganotrophic bacterium (Wakao et al., 1994), and *L. ferriphilum* (representing 31% of the OTUs) another acidophilic bacteria known to use the ferrous iron as electron donor (Li et al., 2020; Smith & Johnson, 2018).

Leptospirillum spp. is one of the most used bacteria in commercial biomining operations that require aerobic conditions and can grow with low concentrations of soluble iron (Smith & Johnson, 2018). *Acidiphilium* spp. is obligately heterotrophic, α -Proteobacteria, that were originally described as obligate aerobes, although all classified species can reduce ferric iron to ferrous (Johnson & Bridge, 2002). This suggests that both bacteria are oxidizing and reducing iron species, creating a circle that previously has been reported with other consortia-containing bacterial species from the same genus (Smith & Johnson, 2018). Previous studies using microbial consortia isolated from REE ore materials (Reed et al., 2016) and Kombucha (Hopfe et al., 2017, 2018) have addressed the microbial potential for recovery REE from e-scrap powders. Their studies suggest that REE solubilization might be influenced not just by the species that compose the consortium, but also by the organic acid production of the consortia. Similar results have been also observed in fungal species (Mouna & Baral, 2019).

3.3 | Bioleaching efficiency of the bacterial consortium

In this study, the results are presented for a 1% w/v e-scrap concentration, using a bacterial consortium isolated from mine acid drainage and selected for iron-oxidizing and sulfur-oxidizing bacteria. E-scrap presented a small particle size (0–3 mm) which increased the surface area and improved the oxidative capacity of bacteria (Ilyas et al., 2013). It is important to highlight that e-scrap are assimilable and more complex materials than minerals. Although Fe was not directly added, it was already present.

Different leaching efficiency (E_i) (%)—amount of the metal solubilized/initial metal concentration in the e-scrap material—were calculated among the investigated metals after 7 and 15 days of exposure (Table 1). The consortium used, after the seventh day, presented an efficiency of more than 99% Cu, 99% Co, 99% Al, 53%, Cd, and 98% Zn, whereas Cr and Li efficiencies were below 11%. The bacterial consortium studied, leached out significant amounts of demanded metals, as well as significant amounts of other critical metals, such as U, and even precious metals like Au (Table 1).

The main economic driver of bioleaching is the recovery of precious metals, such as Pd, Ag, or Au, and critical metals like Cu, Al, Ni, Zn, Li, or U and REEs. Many researchers have investigated the processes of bioleaching of metals from e-scrap (as previously reviewed by Ilyas & Lee, 2014, and Gu et al., 2016). Leaching efficiency depends on the source (Brandl et al., 2001; Qu & Lian, 2013; Tran et al., 2011), microorganisms (Brandl et al., 2001; Ilyas et al., 2013; Vestola et al., 2010), and leaching conditions. Metal bioleaching from e-scrap is complex due to the relation between the above-mentioned factors that affect the efficiency of the process.

Solid/liquid ratio plays a crucial role in the effectiveness of the process; high pulp densities impact the metal solubilization through arresting cellular growth (Madriz-Arias et al., 2015; Mishra et al., 2008). As in our case, an intermediate pulp density, 1% w/v, was selected to reduce the negative effect of high densities (Shaikh Shafikh et al., 2018; Tipre & Dave, 2004), according to previous studies that considered 1% (w/v) the optimum operation condition to extract metal (Marra et al., 2018). Higher e-scrap concentrations (5%–20% w/v) have been assessed to increase the yield, however, they also observed toxic effects on non-adapted cultures and unwashed e-scrap (Natarajan & Ramanathan, 2015; Shaikh Shafikh et al., 2018). Shorter leaching time and better efficiency have been obtained in studies with adapted consortia and low pulp density. For example, Ilyas et al. (2007) compared wild cultures, adapted cultures, and an adapted consortium of thermophilic bacteria, at washed and unwashed e-scrap at 10 g/l in 18 days. The adapted consortium showed a better leaching performance (more than 89% Cu, 81% Ni, 79% Al, and 83% Zn). Wu et al. (2018) also investigated a free-living bacterial consortium, obtaining 100% of Cu leaching efficiency in 2 h with a 5 g/l pulp. Our free-living consortium presented better leaching kinetics and overall higher efficiency for demanded metals, Al, Cu, or Zn, than Ilyas et al. (2007), and the same efficiency but worse kinetics for Cu when compared with Wu et al. (2018) results.

Selective mobilization of distinct metals is mediated by oxidation/reduction reactions or by proton attraction-forming acids. Therefore, metals with lower standard electrode potential, such as Al and Zn, are oxidized and dissolved preferentially to other metals that require longer times such as Cu. Similar trends were observed in the present work and previously reported by other authors (Marra et al., 2018; Utimura et al., 2017). Metal dissolution is also influenced by its solubility. In the case of precious metals, acidophiles are widely used for gold mining operations, but normally copper is dissolved, and the precious metal remains concentrated in the solid phase, being extracted by subsequent processes (Brandl et al., 2001; Das et al., 2017). In this study, we

TABLE 1 Lixiviation and leaching ability

Element	Leachate (7 days) (ng/ml)	Leachate (15 days) (ng/ml)	Control (ng/ml)	L_i (7 d) (mg/g)
Ag	23 ± 5.75	<1.0	<1.0	0.002
Al	79,548 ± 19,887	46,893 ± 11,723	<1.0	7.954
As	103 ± 25.7	<10	<10	0.01
Au	23 ± 5.75	<1.0	23 ± 5.7	0.002
Ba	78 ± 19.5	36 ± 9	24 ± 6	0.007
Be	1.7 ± 0.425	1.6 ± 0.4	<1.0	>0.001
Bi	13 ± 3.25	<1.0	<1.0	0.002
Cd	145 ± 36.2	85 ± 21.25	1 ± 0.25	0.015
Ce	82 ± 20.5	52 ± 13	<1.0	0.008
Co	1234 ± 308	356 ± 89	3.1 ± 0.775	0.123
Cr	756 ± 189	13 ± 3.25	6 ± 1.5	0.076
Cu	11,030 ± 2757	7337 ± 1834	206 ± 51.5	1.103
Dy	7.1 ± 1.77	5.8 ± 1.45	<0.10	>0.001
Er	2.4 ± 0.6	1.9 ± 0.475	<0.10	>0.001
Eu	3 ± 0.75	2.4 ± 0.60	<0.10	>0.001
Fe	90,000 ± 22,500	365 ± 91.2	<10	9
Gd	14 ± 3.5	6.4 ± 1.60	<0.10	>0.001
Ho	1.1 ± 0.275	0.75 ± 0.185	<0.10	>0.001
La	52 ± 13	34 ± 8.5	<0.10	0.005
Li	120 ± 30	87 ± 21.75	68 ± 17	0.012
Lu	0.46 ± 0.155	0.29 ± 0.07	<0.10	>0.001
Mn	7414 ± 1853	6476 ± 1619	<10	0.741
Mo	137 ± 34.2	<1.0	33 ± 8.25	0.014
Nb	3.9 ± 0.975	<1.0	<1.0	>0.001
Nd	103 ± 25.7	63 ± 15.7	<0.10	0.01
Ni	2472 ± 618	1757 ± 439	28 ± 7	0.247
Pb	5688 ± 1422	330 ± 82.5	<1.0	0.569
Pr	25 ± 6.25	14 ± 3.5	<0.10	0.003
Pt	<1.0	<1.0	<1.0	>0.001
Rb	21 ± 5.25	20 ± 5	18 ± 4.5	0.002
Sb	11 ± 2.75	<1.0	7.5 ± 1.87	0.001
Sm	6.6 ± 1.65	5.4 ± 1.35	<0.10	>0.001
Sn	102 ± 25.5	<10	<10	0.01
Sr	718 ± 179.5	637 ± 159	121 ± 30.2	0.072
Tb	1 ± 0.25	1 ± 0.25	<0.10	>0.001
Th	8.8 ± 2.2	2 ± 0.5	<1.0	>0.001
Ti	769 ± 192	<1.0	<1.0	0.077
Tm	0.38 ± 0.095	0.28 ± 0.07	<0.10	>0.001
U	253 ± 63.25	158 ± 39.5	<1.0	0.025

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Element	Leachate (7 days) (ng/ml)	Leachate (15 days) (ng/ml)	Control (ng/ml)	L _i (7 d) (mg/g)
V	216 ± 54	<1.0	2.4 ± 6	0.022
W	16 ± 4	<1.0	3.3 ± 0.82	0.002
Y	50 ± 12.5	40 ± 10	<0.10	0.005
Yb	2.3 ± 0.575	1.7 ± 0.4	<0.10	>0.001
Zn	71,518 ± 17,879	68,387 ± 17,096	23 ± 5.7	7.152
Zr	157 ± 39.2	<1.0	<1.0	0.016

Note: Values (value ± analytical error) represent the metals lixiviated in the leachates (at 7 and 15 days) and control from e-scrap mediated by a bacterial consortium. Leaching ability was presented as L_i on day 7.

observed the leaching of small amounts of Au on day 7, in contrast with other acidophilic bacteria bioleaching studies (Marra et al., 2018). Gold mobilization from e-scrap and waste electrical and electronic equipment (WEEE) has been mainly performed via complexolysis, a mechanism mediated by heterotrophic cyanogenic microorganisms (Arshadi et al., 2016; Kumar et al., 2018; Pradhan & Kumar, 2012).

Varied amounts of REEs were also transferred from e-scrap to the dissolution phase: Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, and Yb (Table 1). REEs were not found in the control solution, indicating that REE mobilization was mediated by the consortium activity. REE microbial mobilization has mainly focused on the extraction from native minerals (Desouky et al., 2016; Işıldar et al., 2019; Shin et al., 2015). Moreover, the mechanisms of chemical and biochemical interaction among microorganisms with REEs are still not well-understood (Barnett et al., 2016), but it can be assumed that general mechanisms of acidolysis and redoxolysis are involved. Ambaye et al. (2020) revised the current literature of REEs recovered from industrial and electronic waste. Among the revised studies, only a couple studied REEs bioleaching from WEEE and e-scrap. Beolchini et al. (2012) focused on the recovery of metals, including yttrium (Y) with a 70% yield from fluorescent powders, utilizing a mixture of Fe/S oxidizing bacteria. Marra et al. (2018) performed a two-steps bioleaching process from e-waste shedding dust, first extracting REEs such as Ce, Eu and Nd, Y, and La (mobilizing up to 99% for the three first days, and up to 80% for Y and La, after 8 days) by acidophilic bacteria. In a second step with cyanide-producing bacteria, Marra et al. (2018) observed no REEs extraction suggesting that complexolysis is not involved in REEs mobilization. In our study Ce, La, Y, and Nd reached values between 5 and 10 µg/g on day 7.

Future studies with different pulp densities, adaptation to e-scrap, and varying conditions are required to assess the real potential of this consortium. However, the bioleaching profile of the isolated consortium showed the feasibility to solubilize some metals and REEs with high efficiency and below the average time intervals.

3.4 | Leachate solid precipitation

Analysis on day 15 showed a decrease in the concentration of dissolved metals in the leachate composition and an increase in the

metal amount of the solid phase (Tables 1 and A1). These results reflect a chemical reaction of the formation of yellowish-brown precipitates, compatible with jarosites. Jarosites are basic ferric hydroxy sulfate minerals with the chemical formula of MFe₃(SO₄)₂(OH)₆. These minerals are common precipitates in the conditions of these types of reactions (Daoud & Karamanev, 2006). Ferric hydroxy sulfate minerals can form reactive surfaces and diffusion barriers, slowing down the flux from reactants to products (Nemati et al., 1998; Vestola et al., 2010). Thus, jarosite formation could be used as a signal to establish the optimal moment to stop the reaction and recover the enriched solution.

The metallic composition of the solid phase was also analyzed, before the jarosite formation at day 7, and the end of the experiment at day 15 (Table A2). The percentage of metals solubilized was more than 50% Cu, 55% Ni, 34% Al, 44% Li, and 94% Zn. The solid phase after the bioleaching step consisted of the remaining e-scrap, consortium cells, and precipitates. Our interest in analyzing the composition of the solid phase after bioleaching is related to its disposal. The final disposal of the residue, either landfilling or energetic valorization at a cement plant, is related to its composition. Cement plant admission requirements are highly influenced by the metal content of the solid deposits (Joseph et al., 2018). It is evident from these data that the bacterial consortium oxidation activity reduced the concentration of metals of the solid phase of all the main elements analyzed. It is particularly remarkable the significant decline in the case of Al, Ba, Mg, Ti, and Zn after 7 days. An extra benefit is not obtained if cultures are maintained longer because of the reactions of precipitation, as described just above. From day 7 to day 15, due to the precipitation reactions described above, the solid phase is enriched in metals such as Al, Cu, Ni, or Zn, and further depleted in Cd, Mn, P, and Ti.

3.5 | Microalgae metals and REEs removal from leachate media

In this context, we have capitalized on the advantages of two extremotolerant microalgae, ChISG and EugVP strains (Figure 1), that evolved tolerance to acid mine drainages and have been thriving in these extreme anthropogenic environments ever since. Both strains

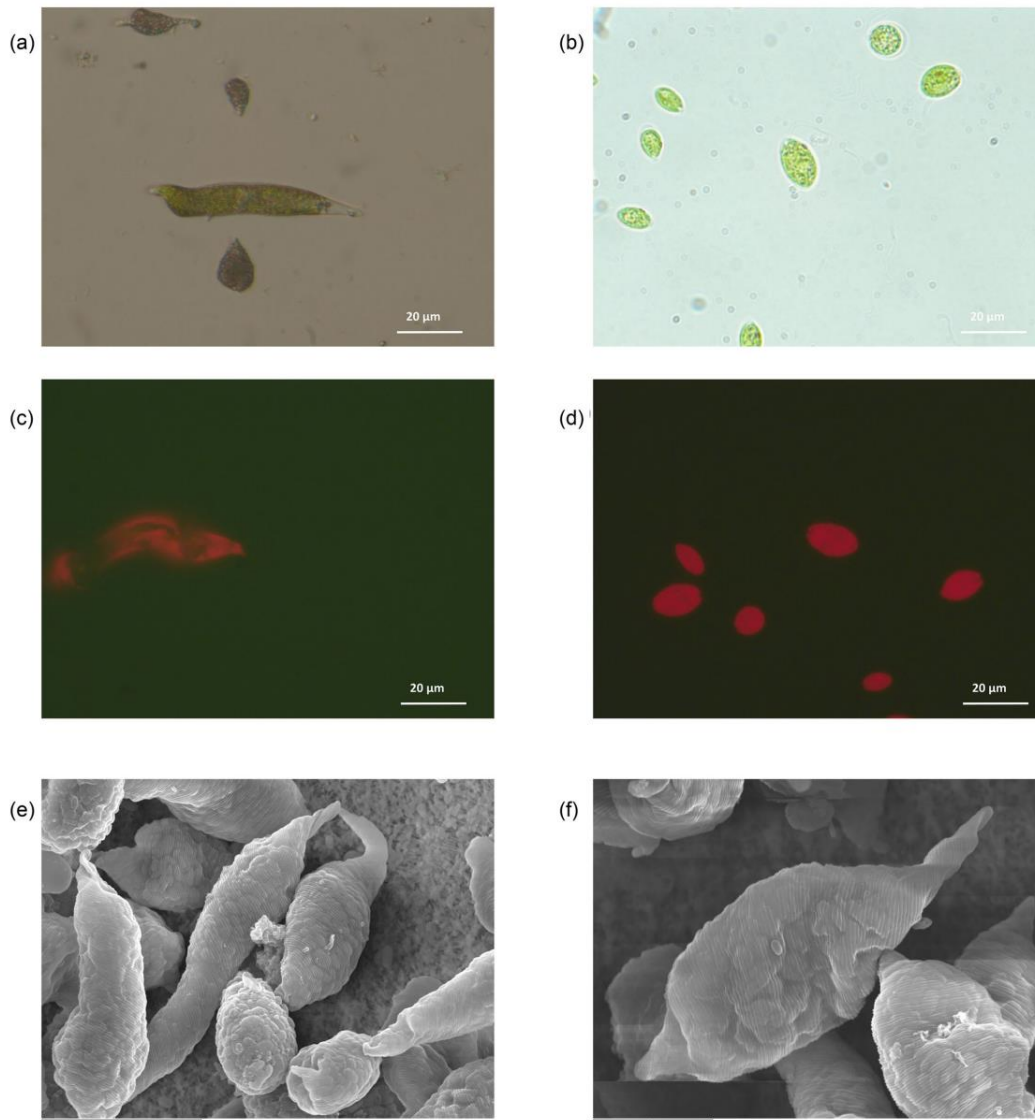


FIGURE 1 Microscope images and autofluorescence micrographs of EugVP (a and c) and ChlSG (b and d), isolated from an acid mine drainage. (e and f) SEM micrographs of EugVP. SEM, scanning electron microscopy

are tolerant of high metals concentrations and acid pH values below 3.5, making them tailored to the leachate conditions. We exposed both strains to a 15 day leachate solution, over 12 days, to address the removal performance over time of these two extremotolerant microalgae. Differences between the leachate at Day 15 and the removal leachate (leachate at Day 15 enriched with BG-11 broth),

like increased Fe or the presence of Mo, can be explained by the microalgae broth addition.

Over the removal experiments, both strains performed well under the new environment. Viability and growth did not appear to be impaired by the composition of the leachate (3.6 pH-value and more than 30 elements dissolved in the solution which concentration

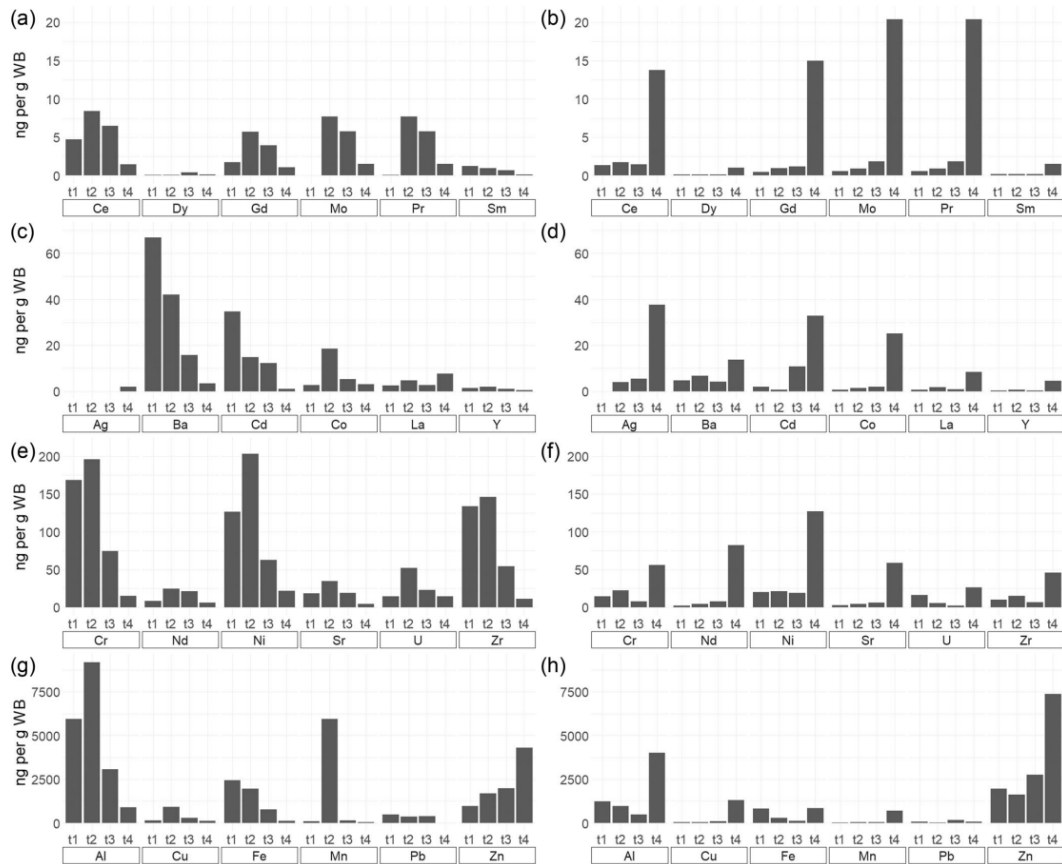


FIGURE 2 Concentration profile (ng) of metals uptake by microalgae pellets. (a), (c), (e), and (g) The amounts of each metal recovered by EugVP over time (t₁, t₂, t₃, and t₄, correspond to 0 h, 8 h, 114 h, and 288 h, respectively). (b), (d), (f), and (h) The amounts recovered by ChISG

ranged from 1 to 1000 ng/ml). Bio-capture occurred in 24 out of 33 analyzed elements present in the control removal dissolution for both strains. From the element scrutiny in the liquors, the removal was very satisfactory for many elements. In general terms, both species retained up to μg of Al, Fe, Zn, Pb, Cu, and Mn, and considerable amounts of other metals, with the better overall performance of ChISG in terms of ng per g of wet biomass (WB) pellets (Figure 2). EugVP presented a better performance over time (Figure 2). REEs uptake reached significant concentrations in the cellular pellets. ChISG uptake larger REEs amounts, up to 14.97 ng of Gd, 20.36 ng of Pr, 13.77 ng of Ce, or 8.38 ng of La per g of WB.

Neither of the strain pellet chemical analyses showed detectable concentrations of titanium, beryllium, or these REEs: Eu, Ho, Lu, Tb, Tm, and Yb, elements that were present in the removal liquors. In the case of Erbium, chemical analyses were inconsistent, probably an artifact of the sensitivity of the analysis. Control liquor metals concentrations remained constant along with the trials. There was no

chemical precipitation mediated by non-biological factors in the experimental conditions (detailed element analyses can be found in Table A2).

It is not surprising to observe differences between the strains given that both strains, despite being single cell flagellated eukaryotes grouped as microalgae, are completely different organisms that have structural and functional differences (Figure 1). In terms of structure, ChISG is microscopic unicellular oval shape biflagellate green microalgae approximately 10 μm in diameter with a multilayer cell wall. EugVP is microscopic elongated and spindle-shaped single-celled protozoans of approx. 40–60 μm long and 8–12 μm wide with two unequal length flagella and covered by a composite membrane called pellicle devoid of cellulose. ChISG presents both sexual and asexual reproduction, whereas EugVP only reproduces by binary fission. EugVP, unlike ChISG, can also nourish heterotrophically. Furthermore, both strains showed notable differences in growth performances. After 12 days EugVP appears to remain exponential

phase reaching concentrations of $\sim 2.8 \times 10^5$ cells per ml and ChISG is probably in late stationary phase with $\sim 4.8 \times 10^6$ cells per ml showing a drop in the cell densities compared with day 6 (Table A3).

To compare across the strain efficiency over time, we also estimated the amount of element uptake by cell, and by estimated cell volume, as possible indicators of the capacity to remove metals from the solution (detailed description of the calculations is described in Supporting Information at <https://doi.org/10.5281/zenodo.5819060>). Although the amount uptaken per cell is better in EugVP, ChISG uptake larger amounts per biovolume. Taking this into account, and the higher growth rate of ChISG, we can infer that ChISG presented better removal efficiency. *Chlamydomonas* spp. cellular wall displays a strong affinity for metallic cations (Collard & Matagne, 1990), it lacks cellulose but consists of a multilayer of hydroxyproline-rich glycoproteins. The plentiful group's anionic carboxyl of pectin and glycoproteins play a dominant role in binding metal ions, making stronger bonds to metal ions that have lost the hydration sphere (Van Custem & Gillet, 1982). Therefore, *Chlamydomonas* spp. has been widely used in metal biosorption studies from different kinds of liquors (Baselga-Cervera et al., 2018; Bayramoğlu et al., 2006; Flouty & Estephane, 2012; Wan Maznah et al., 2012). *Euglena* spp. pellicle consists of a complex proteinaceous layer underlain by microtubules, with a high concentration of charged and polar amino-acid and sugar residues (Nakano et al., 1987). However, those polar components are very likely in higher proportion in strains cultured anaerobically (Santiago-Martínez et al., 2015). Regarding previous studies of biosorption of metals with species of *Euglena* genus, Santiago-Martínez et al. (2015) observed lower or negligible Cd biosorption at 100 μ M concentrations. Moreno-Sánchez et al. (2017) suggest that this removal mechanism is unproductive, suggesting the intracellular accumulation as the efficient research direction. In terms of intracellular accumulation, studies with cadmium showed 33 times higher accumulation of *E. gracilis*, in comparison with two *Chlamydomonas* spp. (Moreno-Sánchez et al., 2017), and high zinc accumulation (Sánchez-Thomas et al., 2016). Studies in *Chlamydomonas* spp. found 1.8 and 2.75 more biosorption than bioaccumulation of Cu and Pb respectively (Flouty & Estephane, 2012; Flouty & Khalaf, 2015). Although it was not the purpose of this study, if one process is prevalent in either of the species, observed differences could be related to the uptake process.

The uptake kinetics observed varied depending on the strain and element. There were cases where the concentration of an element was constant during the 288 h of the experiments. This was the case of Ba in both strains or Fe, Cd, and Sm in the case of EugVP. In contrast, there are examples where the bio-uptake kinetics increased over time. For example, the precious metal Ag or another as Co, Cu, Mn, Mo, and Zn in both strains. More detailed trials focused on kinetic aspects would be relevant to elucidate this aspect. The phenomenon of desorption was also observed with some elements: U (ChISG), Fe, and Pb in both strains. The fact that EugVP was at its exponential phase while ChISG reached the stationary phase might explain the possible desorption observed at 12 days in ChISG. Other factors, like initial metal concentration, elements' competition for the bidding sites (Aharchaou et al., 2020), or acquired adaptive mechanisms, might influence the observed kinetics.

There is ample literature on research and efficiency of biological removal of metals from leachates and metals solutions (as reviewed by Carvajal-Flórez & Cardona-Gallo, 2019; Dobson & Burgess, 2007; He & Chen, 2014; Ismail et al., 2014; Johnson & Hallberg, 2005, just to name a few). Işıldar et al. (2019) reviewed the literature on biosorption of REEs and other metals of interest from WEEE leachates. For instance, on microalgae death biomass, Birungi and Chirwa (2014) studied the biosorption of La by *C. reinhardtii* (142.86 mg/g) and *Chlorella vulgaris* (74.6 mg/g) and other four species of microalgae. Kucuker et al. (2017) *C. vulgaris* addressed Nd (157.21 mg/g) and Wojciech Jurkowski et al. (2015) addressed 17 species of microalgae being the more efficient *Tetraselmis chuii* and *Calothrix brevissima* in Nd bioaccumulation (efficiency of 51.92 and 69.23 mg/g, respectively). The present study is addressing bio-uptake from complex leachate liquor with living microalgae, solving the pH adaptation mentioned as a bottleneck needed before biosorption (Işıldar et al., 2019). The use of alive biomass also implies enzymatic processes that, although further studies should be conducted, could involve valuable mechanisms for unresolved problems like specific captures toward some metals. We have capitalized on extremophilic microalgae already adapted to acid conditions and dissolved metals. Further studies are needed to elucidate the mechanisms and efficiencies involved in the removal of metals with living microalgae from complex leachate liquors.

4 | CONCLUSIONS

We harvested e-scrap using a sequential microbial-mediated process developed in two stages: bioleaching using an acidophilic ferrous iron-oxidizing bacteria consortium and the bio-uptake of metals from the leachate by extremophilic microalgae strains. Results showed that this biotechnological methodology can be used to recover metals from e-scrap. Recovery values of the bioleaching stage were nearly 100% for Cu, Co, Al, and Zn. ChISG pellets accumulated μ g of Zn, Al, Cu, and Mn, and ng of REEs. This research represents an approach to the complete valorization of e-scrap with extremotolerant microorganisms.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fundación Alfonso Martín Escudero Postdoctoral Grant (number 2048) awarded to B.B.C. Authors want to acknowledge the analytical services of the Centro Analítico Integral (CAI), geological techniques research support center of the Complutense University of Madrid for their support in the chemical and SEM analyses. We acknowledge the company LYRSA-Derichbourg for the support of the present research as the supplier of the scrap material from their production process.

CONFLICT OF INTERESTS

None declared.

ETHICS STATEMENT

None required.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Camino García-Balboa: conceptualization (lead), data curation (equal), formal analysis (equal), investigation (equal), writing—original draft (supporting), writing—review and editing (equal). **Paloma Martínez-Alesón:** conceptualization (supporting), formal analysis (supporting), investigation (equal), writing—original draft (supporting), writing—review and editing (equal). **Victoria López-Rodas:** funding acquisition (lead), supervision (equal), writing—review and editing (equal). **Eduardo Costas:** funding acquisition (lead), supervision (equal), writing—review and editing (equal). **Beatriz Baselga-Cervera:** conceptualization (supporting), data curation (equal), formal analysis (equal), funding acquisition (supporting), visualization (lead), writing—original draft (lead), writing—review and editing (lead).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data generated during the current study are provided in full in this paper apart from the data matrix for all the OTU reads from the consortium and metals biouptake normalized by microalgae biomass, which is available in the Zenodo repository at <https://doi.org/10.5281/zenodo.5819060>.

ORCID

Camino García-Balboa  <http://orcid.org/0000-0002-3132-5305>

Paloma Martínez-Alesón García  <https://orcid.org/0000-0003-2624-1809>

Beatriz Baselga-Cervera  <https://orcid.org/0000-0003-3423-4780>

REFERENCES

- Aharchaou, I., Bahloul, F., & Fortin, C. (2020). Competition among trivalent elements (Al, Eu, Fe, Gd, Nd, Tm, and Y) for uptake in algae and applicability of the biotic ligand model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 612–620. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00786-z>
- Ambaye T. G., Vaccari M., Castro F. D., Prasad S., & Rtimi S. (2020). Emerging technologies for the recovery of rare earth elements (REEs) from the end-of-life electronic wastes: A review on progress, challenges, and perspectives. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, (29), 36052–36074. <http://doi.org/10.1007/s11356-020-09630-2>
- Arshadi, M., Mousavi, S. M., & Rasoulnia, P. (2016). Enhancement of simultaneous gold and copper recovery from discarded mobile phone PCBs using *Bacillus megaterium*: RSM based optimization of effective factors and evaluation of their interactions. *Waste Management*, 57, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.012>
- Barmettler, F., Castelberg, C., Fabbri, C., & Brandl, H. (2016). Microbial mobilization of rare earth elements (REE) from mineral solids—A mini review. *AIMS Microbiology*, 2(2), 190–204. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.2.190>
- Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., Díaz-Alejo, H. M., Costas, E., & López-Rodas, V. (2020). Rapid colonization of uranium mining-impacted waters, the biodiversity of successful lineages of phytoplankton extremophiles. *Microbial Ecology*, 79(3), 576–587. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01431-6>
- Baselga-Cervera, B., García-Balboa, C., López-Rodas, V., Fernández Díaz, M., & Costas, E. (2019). Evidence of microalgal isotopic fractionation through enrichment of depleted uranium. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38740-2>

- Baselga-Cervera, B., Romero-López, J., García-Balboa, C., Costas, E., & López-Rodas, V. (2018). Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas*, sp. (ChSP strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00523>
- Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yılmaz, M., & Arica, M. Y. (2006). Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *International Journal of Mineral Processing*, 81(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2006.06.002>
- Beolchini, F., Fonti, V., Dell'Anno, A., Rocchetti, L., & Vegliò, F. (2012). Assessment of biotechnological strategies for the valorization of metal bearing wastes. *Waste Management*, 32(5), 949–956. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.10.014>
- Birungi, Z. S., & Chirwa, E. M. N. (2014). The kinetics of uptake and recovery of lanthanum using freshwater algae as biosorbents: Comparative analysis. *Bioresource Technology*, 160, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.033>
- Brandl, H., Bosshard, R., & Wegmann, M. (2001). Computer-munching microbes: Metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00188-2)
- Cao, J., Lu, B., Chen, Y., Zhang, X., Zhai, G., Zhou, G., Jiang, B., & Schnoor, J. (2016). Extended producer responsibility system in China improves e-waste recycling: Government policies, enterprise, and public awareness. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 62, 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.078>
- Carvajal-Flórez, E., & Cardona-Gallo, S.-A. (2019). Technologies applicable to the removal of heavy metals from landfill leachate. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 15725–15753. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04888-7>
- Chen S., Yang Y., Liu C., Dong F., & Liu B. (2015). Column bioleaching copper and its kinetics of waste printed circuit boards (WPCBs) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Chemosphere*, 141, 162–168. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.082>
- Collard, J. M., & Matagne, R. F. (1990). Isolation and genetic analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* strains resistant to cadmium. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2051–2055.
- Creamer, N. J., Baxter-Plant, V. S., Henderson, J., Potter, M., & Macaskie, L. E. (2006). Palladium and gold removal and recovery from precious metal solutions and electronic scrap leachates by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology Letters*, 28(18), 1475–1484. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9120-9>
- Cucchiella, F., D'Adamo, I., Lenny Koh, S. C., & Rosa, P. (2015). Recycling of WEEE: An economic assessment of present and future e-waste streams. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.010>
- Cui, J., & Forssberg, E. (2007). Characterization of shredded television scrap and implications for materials recovery. *Waste Management*, 27(3), 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.02.003>
- Cui, J., & Zhang, L. (2008). Metallurgical recovery of metals from electronic waste: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 158, 228–256. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.02.001>
- Van Custem, P., & Gillet, C. (1982). Activity coefficients and selectivity values of Cu²⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺ ions adsorbed in the *Nitella flexilis* L. cell wall during triangular ion exchanges. *Journal of Experimental Botany*, 33(5), 847–854. <https://doi.org/10.1093/jxb/33.5.847>
- Daoud, J., & Karamanev, D. (2006). Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 19(9), 960–967. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2005.10.024>
- Das, S., Natarajan, G., & Ting, Y. P. (2017). Bio-extraction of precious metals from urban solid waste. In *AIP Conference Proceedings* (p. 020004). American Institute of Physics Inc. <https://doi.org/10.1063/1.4974410>

- Desouky, O. A., El-Moughith, A. A., Hassanien, W. A., Awadalla, G. S., & Hussien, S. S. (2016). Extraction of some strategic elements from thorium-uranium concentrate using bioproducts of *Aspergillus ficuum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S795–S805. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.08.010>
- Dobson, R. S., & Burgess, J. E. (2007). Biological treatment of precious metal refinery wastewater: A review. *Minerals Engineering*, 20(6), 519–532. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2006.10.011>
- Drexler, I. L. C., & Yeh, D. H. (2014). Membrane applications for microalgae cultivation and harvesting: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 13, 487–504. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9350-6>
- Flouty, R., & Estephane, G. (2012). Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. *Journal of Environmental Management*, 111, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.042>
- Flouty, R., & Khalaf, G. (2015). Role of Cu and pb on Ni bioaccumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*: Validation of the biotic ligand model in binary metal mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.022>
- García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., García-Sánchez, A., Igual, J. M., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2013). Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.003>
- Grand View Research. (2018). *E-waste Management Market Size and Share. Industry Report, 2018–2025*. GVR-2-68038-397-3
- Gu, Y., Wu, Y., Xu, M., Mu, X., & Zuo, T. (2016). Waste electrical and electronic equipment (WEEE) recycling for a sustainable resource supply in the electronics industry in China. *Journal of Cleaner Production*, 127, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.041>
- He, J., & Chen, J. P. (2014). A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresource Technology*, 160, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.068>
- Hopfe, S., Flemming, K., Lehmann, F., Möckel, R., Kutschke, S., & Pollmann, K. (2017). Leaching of rare earth elements from fluorescent powder using the tea fungus *Kombucha*. *Waste Management*, 62, 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.005>
- Hopfe, S., Konsulke, S., Barthen, R., Lehmann, F., Kutschke, S., & Pollmann, K. (2018). Screening and selection of technologically applicable microorganisms for recovery of rare earth elements from fluorescent powder. *Waste Management*, 79, 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.030>
- Hoshaw, R. W., & Rosowski, J. R. (1973). Methods for microscopic algae. In Stein, J. R. (ed.), *Handbook of phycological methods: Culture methods & growth measurements* (pp. 53–68). Cambridge University Press.
- Ilyas, S., Anwar, M. A., Niazi, S. B., & Afzal Ghauri, M. (2007). Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*, 88(1–4), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2007.04.007>
- Ilyas, S., & Lee, J. (2014). Biometallurgical recovery of metals from waste electrical and electronic equipment: A review. *ChemBioEng Reviews*, 1(4), 148–169. <https://doi.org/10.1002/cben.201400001>
- Ilyas, S., Lee, J. C., & Chi, R. A. (2013). Bioleaching of metals from electronic scrap and its potential for commercial exploitation. *Hydrometallurgy*, 131–132, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.11.010>
- Ismail, I., Moustafa, T., Sulaymon, A. H., & Abbas, S. H. (2014). *Bisorption of heavy metals: A review biosorption of heavy metals: A review*. Accessed May 7, 2020. <https://www.researchgate.net/publication/268022877>
- İşildar, A., van Hullebusch, E. D., Lenz, M., Du Laing, G., Marra, A., Cesaro, A., Panda, S., Akcil, A., Kucuker, M. A., & Kuchta, K. (2019). Biotechnological strategies for the recovery of valuable and critical raw materials from waste electrical and electronic equipment (WEEE)—A review. *Journal of Hazardous Materials*, 362, 467–481. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.050>
- Johnson, D. B., & Bridge, T. A. M. (2002). Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: Evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 315–321. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01535.x>
- Johnson, D. B., & Hallberg, K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: A review. *Science of the Total Environment*, 338(1–2 SPEC. ISS.), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.002>
- Joseph, A. M., Snellings, R., Van den Heede, P., Matthys, S., & De Belie, N. (2018). The use of municipal solidwaste incineration ash in various building materials: A Belgian point of view. *Materials*, 11, 141. <https://doi.org/10.3390/ma11010141>
- Kiddee, P., Naidu, R., & Wong, M. H. (2013). Electronic waste management approaches: An overview. *Waste Management*, 33(5), 1237–1250. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.01.006>
- Kucuker, M. A., Wiczorek, N., Kuchta, K., & Copt, N. K. (2017). Biosorption of neodymium on *Chlorella vulgaris* in aqueous solution obtained from hard disk drive magnets. *PLOS ONE*, 12(4), e0175255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175255>
- Kumar, A., Saini, H. S., & Kumar, S. (2018). Enhancement of gold and silver recovery from discarded computer printed circuit boards by *Pseudomonas balearica* SAE1 using response surface methodology (RSM). *3 Biotech*, 8(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1129-y>
- Li, Q., Zhu, J., Li, S., Zhang, R., Xiao, T., & Sand, W. (2020). Interactions between cells of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum* during pyrite bioleaching. *Frontiers in Microbiology*, 11, 44. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00044/BIBTEX>
- Madrigal-Arias, J. E., Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Mendoza-López, M. R., García-Barradas, O., Cruz-Sánchez, J. S., Ferrera-Cerrato, R., & Jiménez-Fernández, M. (2015). Bioleaching of gold, copper and nickel from waste cellular phone PCBs and computer goldfinger motherboards by two *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 707–713. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140256>
- Marra, A., Cesaro, A., Rene, E. R., Belgioirio, V., & Lens, P. (2018). Bioleaching of metals from WEEE shredding dust. *Journal of Environmental Management. Academic Press*, 210, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.066>
- Mecucci, A., & Scott, K. (2002). Leaching and electrochemical recovery of copper, lead and tin from scrap printed circuit boards. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(4), 449–457. <https://doi.org/10.1002/jctb.575>
- Mishra, D., Kim, D.-J., Ralph, D. E., Ahn, J.-G., & Rhee, Y.-H. (2008). Bioleaching of metals from spent lithium ion secondary batteries using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Waste Management*, 28(2), 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.01.010>
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, A., Jasso-Chávez, R., Saavedra, E., & García-García, J. D. (2017). Biochemistry and physiology of heavy metal resistance and accumulation in *Euglena*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 979, 91–121. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1_6
- Mouna, H. M., & Baral, S. S. (2019). A bio-hydrometallurgical approach towards leaching of lanthanum from the spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. *Hydrometallurgy*, 184, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2019.01.007>
- Nakano, Y., Urade, Y., Urade, R., & Kitaoka, S. (1987). Isolation, purification, and characterization of the pellicle of *Euglena gracilis*. *Journal of Biochemistry*, 102(5), 1053–1063. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122143>
- Natarajan, G., Ramanathan, T., Bharadwaj, A., & Ting, Y.-P. (2015). Bioleaching of metals from major hazardous solid wastes. In P.

- Abhilash, B. D. Pandey & K. A. Natarajan (Eds.), *Microbiology for minerals, metals, materials, and the environment* (pp. 229–262). Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/b18124-10>
- Natarajan, G., Tay, S. B., Yew, W. S., & Ting, Y.-P. (2015). Engineered strains enhance gold biorecovery from electronic scrap. *Minerals Engineering*, 75, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2015.01.002>
- Natarajan, G., & Ting, Y. P. (2014). Pretreatment of e-waste and mutation of alkali-tolerant cyanogenic bacteria promote gold biorecovery. *Bioresource Technology*, 152, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.108>
- Nemati, M., Harrison, S. T. L., Hansford, G. S., & Webb, C. (1998). Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: A review on the kinetic aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 1, 171–190. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(98\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(98)00006-0)
- Pradhan, J. K., & Kumar, S. (2012). Metals bioleaching from electronic waste by *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas* sp. *Waste Management & Research*, 30(11), 1151–1159. <https://doi.org/10.1177/0734242X12437565>
- Qu, Y., & Lian, B. (2013). Bioleaching of rare earth and radioactive elements from red mud using *Penicillium tricolor* RM-10. *Bioresource Technology*, 136, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.070>
- Reed, D. W., Fujita, Y., Daubaras, D. L., Jiao, Y., & Thompson, V. S. (2016). Bioleaching of rare earth elements from waste phosphors and cracking catalysts. *Hydrometallurgy*, 166, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.08.006>
- Sánchez-Thomas, R., Moreno-Sánchez, R., & García-García, J. D. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*, 131, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.06.009>
- Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Zepeda-Rodríguez, A., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., & Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 288, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.027>
- Savvilitidou, V., Hahladakis, J. N., & Gidarakos, E. (2015). Leaching capacity of metals-metalloids and recovery of valuable materials from waste LCDs. *Waste Management*, 45, 314–324. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.05.025>
- Shaikh Shafikh, M., Ahmed, A. A., & Ahmed, S. A. (2018). Impact of pulp density on extraction of metals, by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Pseudomonas fluorescens* from bauxite ore. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3), 1647–1654. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.3.72>
- Shin, D., Kim, J., Kim, B., Jeong, J., & Lee, J. (2015). Use of phosphate solubilizing bacteria to leach rare earth elements from monazite-bearing ore. *Minerals*, 5(2), 189–202. <https://doi.org/10.3390/min5020189>
- Silverman, M. P., & Lundgren, D. G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus*. *Journal of Bacteriology*, 78(5), 326–331. <https://doi.org/10.1128/JB.77.5.642-647.1959>
- Smith, S. L., & Johnson, D. B. (2018). Growth of *Leptospirillum ferrophilum* in sulfur medium in co-culture with *Acidithiobacillus caldus*. *Extremophiles*, 22(2), 327. <https://doi.org/10.1007/S00792-018-1001-3>
- Tan, Q., Li, J., & Zeng, X. (2015). Rare earth elements recovery from waste fluorescent lamps: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(7), 749–776. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.900240>
- Tipre, D. R., & Dave, S. R. (2004). Bioleaching process for Cu-Pb-Zn bulk concentrate at high pulp density. *Hydrometallurgy*, 75(1–4), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2004.06.002>
- Tran, C. D., Lee, J. C., Pandey, B. D., Jeong, J., Yoo, K., & Huynh, T. H. (2011). Bacterial cyanide generation in the presence of metal ions (Na⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺) and gold bioleaching from waste PCBs. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 44(10), 692–700. <https://doi.org/10.1252/jcej.10we232>
- Utimura, S. K., Rosario, C. G. A., Botelho, A. B., Tenório, J. A. S., & Espinosa, D. C. R. (2017). Bioleaching process for metal recovery from waste materials. In M. Zhang, J. Li & B. Li (Eds.), *Minerals, metals and materials series* (pp. 283–290). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52192-3_28
- Veit, H. M., Bernardes, A. M., Ferreira, J. Z., Tenório, J. A., & de Fraga Malfatti, C. (2006). Recovery of copper from printed circuit boards scraps by mechanical processing and electrometallurgy. *Journal of Hazardous Materials*, 137(3), 1704–1709. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.05.010>
- Vestola, E. A., Kuusenaho, M. K., Närhi, H. M., Tuovinen, O. H., Puhakka, J. A., Plumb, J. J., & Kaksonen, J. A. (2010). Acid bioleaching of solid waste materials from copper, steel and recycling industries. *Hydrometallurgy*, 103(1–4), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.017>
- Wäger, P. A., Schlupe, M., Müller, E., & Gloor, R. (2012). RoHS regulated substances in mixed plastics from waste electrical and electronic equipment. *Environmental Science and Technology*, 46(2), 628–635. <https://doi.org/10.1021/es202518n>
- Wakao, N., Nagasawa, N., Matsuura, T., Matsukura, H., Matsumoto, T., Hiraishi, A., Sakurai, Y., & Shiota, H. (1994). *Acidiphilium multivorum* sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(2), 143–159. <https://doi.org/10.2323/JGAM.40.143>
- Wan Maznah, W. O., Al-Fawwaz, A. T., & Surif, M. (2012). Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia. *Journal of Environmental Sciences*, 24(8), 1386–1393. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60931-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60931-5)
- Wibowo, S., & Deng, H. (2015). Multi-criteria group decision making for evaluating the performance of e-waste recycling programs under uncertainty. *Waste Management*, 40, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.02.035>
- Wojciech Jurkowski M. H., Thomas Brueck R. B., & Becker A. M. (2015). Biosorption of neodymium by selected photoautotrophic and heterotrophic species. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 6(4). <http://doi.org/10.4172/2157-7048.1000241>
- Wu, W., Liu, X., Zhang, X., Zhu, M., & Tan, W. (2018). Bioleaching of copper from waste printed circuit boards by bacteria-free cultural supernatant of iron-sulfur-oxidizing bacteria. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0196-6>
- Xue, M., Yang, Y., Ruan, J., & Xu, Z. (2012). Assessment of noise and heavy metals (Cr, Cu, Cd, Pb) in the ambience of the production line for recycling waste printed circuit boards. *Environmental Science and Technology*, 46(1), 494–499. <https://doi.org/10.1021/es202513b>
- Zhan, A., Xiong, W., He, S., & Macisaac, H. J. (2014). Influence of artifact removal on rare species recovery in natural complex communities using high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 9(5), 96928. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0096928>
- Zhang, J., Gu, P., Xu, J., Xue, H., & Pang, H. (2016). High performance of electrochemical lithium storage batteries: ZnO-based nanomaterials for lithium-ion and lithium-sulfur batteries. *Nanoscale*, 18578–18595. <https://doi.org/10.1039/c6nr07207k>

How to cite this article: García-Balboa, C., Martínez-Alesón García, P., López-Rodas, V., Costas, E., & Baselga-Cervera, B. (2022). Microbial biominers: Sequential bioleaching and biouptake of metals from electronic scraps. *MicrobiologyOpen*, e1265. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1265>

APPENDIX A

TABLE A1 Chemical analyses of metal content

Parameter (µg/g)	E-scrap metallic content (t_0)	Solid phase (t_7)	Solid-phase (t_{15})	E_i (%) (t_7)	E_i (%) (t_{15})	Metal solubilized (%) (t_7)	Metal solubilized (%) (t_{15})
Al	5862 ± 1465	3823 ± 955	4038 ± 1009	>99	80.0	34.8	31.1
Ba	3347 ± 836	2175 ± 543	2175 ± 543	0.2	0.1	35.0	35.0
Ca	6 ± 1.5	1.5 ± 0.3	3.8 ± 1	n/a	n/a	75.0	36.7
Cd	27 ± 6.7	9 ± 2.2	1.2 ± 0.3	53.7	31.5	66.7	95.6
Co	92 ± 23	36 ± 9	39 ± 9	>99	38.7	60.9	57.6
Cr	694 ± 173	524 ± 131	533 ± 133	10.9	0.2	24.5	23.2
Cu	1007 ± 251	470 ± 117	571 ± 142	>99	72.9	53.3	43.3
Li	142 ± 35	79 ± 19	79 ± 19	8.5	6.1	44.4	44.4
Mg	4587 ± 1146	2179 ± 544	2779 ± 694	n/a	n/a	52.5	39.4
Mn	3298 ± 824	2559 ± 639	2265 ± 566	22.5	19.6	22.4	31.3
Mo	98 ± 24	79 ± 19	81 ± 20	14	0	19.4	17.3
Ni	430 ± 107	186 ± 46	232 ± 58	57.5	40	56.7	46.0
P	776 ± 194	338 ± 84	212 ± 53	n/a	n/a	56.4	72.7
Pb	1623 ± 405	891 ± 222	918 ± 229	35	2	45.1	43.4
Ti	5179 ± 1294	3412 ± 853	2492 ± 623	1.5	0	34.1	51.9
Zn	7279 ± 1819	402 ± 100	640 ± 160	>98	93.8	94.5	91.2

Note: The content of the main metals (value ± analytical error) analyzed in e-scrap raw material, solid-phase at the initial time (t_0), after bioleaching for 7 (t_7) and 15 (t_{15}) days, the leaching efficiencies E_i (%) (Equation 2), and the percent of metal solubilized estimated from e-scrap and solid-phase metallic content change are shown.

Abbreviation: n/a, not applicable.

TABLE A2 Biouptake experiment metals content (ng/ml) in the control leachate over time (value ± analytical error)

Element	0 h	8 h	144 h	288 h
Ag	2.6 ± 0.65	3.6 ± 0.9	1.4 ± 0.35	1 ± 0.25
Al	28,954 ± 7238	29,220 ± 7305	34,257 ± 8564	40,460 ± 10,115
Ba	19 ± 4.75	20 ± 0.5	20 ± 5	23 ± 5.7
Be	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.37	2.1 ± 0.52
Cd	75 ± 18.7	73 ± 18.25	80 ± 20	86 ± 21.5
Ce	68 ± 17	66 ± 16.5	71 ± 17	78 ± 19.5
Co	266 ± 66	262 ± 65.5	298 ± 74	343 ± 85.75
Cr	13 ± 3	20 ± 5	13 ± 3	16 ± 4
Cu	8154 ± 2038	8134 ± 2033	9121 ± 2280	10,324 ± 2581
Dy	7.3 ± 1.8	7.1 ± 1.77	7.9 ± 1.9	8.1 ± 2.02
Er	1.8 ± 0.45	2 ± 0.5	2.1 ± 0.52	2 ± 0.5
Eu	2 ± 0.5	2 ± 0.5	2.2 ± 0.5	2.3 ± 0.57

(Continues)

TABLE A2 (Continued)

Element	0 h	8 h	144 h	288 h
Fe*	839 ± 209	1490 ± 372	988 ± 247	1038 ± 259
Gd	120 ± 30	117 ± 29	128 ± 32	137 ± 34
Ho	2.1 ± 0.5	2 ± 0.5	2.3 ± 0.57	2.5 ± 0.62
La	35 ± 8.7	34 ± 8.5	37 ± 9.2	40 ± 10
Lu	0.25 ± 0.06	0.24 ± 0.06	0.27 ± 0.06	0.3 ± 0.075
Mn	6466 ± 1616	6497 ± 1624	7430 ± 1857	8499 ± 2124
Mo	13 ± 3.2	13 ± 3.2	13 ± 3.2	14 ± 3.5
Nd	572 ± 143	555 ± 138	613 ± 153	672 ± 168
Ni	1404 ± 351	1389 ± 347	1582 ± 395	1805 ± 451
Pb	26 ± 6.5	27 ± 6.7	30 ± 7.5	33 ± 8.2
Pr	150 ± 37	144 ± 36	161 ± 40	175 ± 43.75
Sm	4.8 ± 1.2	5.2 ± 1.3	5.1 ± 1.2	5.4 ± 1.3
Sr	447 ± 111	456 ± 114	500 ± 125	553 ± 138
Tb	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.27	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.32
Ti	1.2 ± 0.3	2.3 ± 0.57	2 ± 0.5	1.9 ± 0.47
Tm	0.23 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.22 ± 0.55	0.27 ± 0.06
U	85 ± 21	85 ± 21	93 ± 23	102 ± 25
Y	33 ± 8.2	33 ± 8.2	36 ± 9	41 ± 10
Yb	1.7 ± 0.42	1.5 ± 0.37	1.7 ± 0.42	2 ± 0.5
Zn	53,818 ± 13,454	53,147 ± 13,286	58,805 ± 14,701	66,746 ± 16,686
Zr	1.3 ± 0.32	1.8 ± 0.45	2.1 ± 0.5	2.8 ± 0.7

*Calculated as ng per kg.

TABLE A3 Cell densities of both microalgae strains counted in a hemocytometer

	ChlSG strain	EugVP
Initial inoculum (cells)	3,576,000	21,200
8 h (cells/ml)	$3.57 \pm 1.12 \times 10^5$	$21.2 \pm 4.98 \times 10^2$
114 h (cells/ml)	$5.24 \pm 1.45 \times 10^6$	$51.8 \pm 18.87 \times 10^3$
228 h (cells/ml)	$4.77 \pm 1.26 \times 10^6$	$2.78 \pm 1.13 \times 10^5$

Anexo 6.

Desarrollo de un biosensor para la detección y cuantificación de HTF, basado en la disminución de la fluorescencia que estos microorganismos emiten al entrar en contacto con esta sustancia.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 846 473**

⑫ Número de solicitud: 202030068

⑤① Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación:

28.01.2020

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud:

28.07.2021

⑦① Solicitantes:

ACCIONA ENERGÍA, S.A. (100.0%)
Avda. Ciudad de la Innovación, nº 5
31621 Sarriguren (Navarra) ES

⑦② Inventor/es:

REYES GARCIA, Mari Luz;
BASAIL IZCUE, Pedro Miguel;
DIAZ-ALEJO GUERRERO, Héctor Miguel;
MARTÍNEZ - ALESÓN GARCÍA, Paloma María y
MARTÍNEZ ESTEBAN, Paloma

⑦④ Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

⑤④ Título: **Biosensor microalgal para la detección de HTF**

⑤⑦ Resumen:

Biosensor microalgal para la detección de HTF.
Biosensor para la detección de HTF que comprende un biodetector formado una población de microalgas y un sistema de transducción de señal configurado para medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas. La disminución en la fluorescencia emitida por las microalgas en presencia de una muestra indicaría la presencia de HTF en la misma. En función de los valores de fluorescencia obtenidos es posible cuantificar la cantidad de HTF existente en la muestra. La invención también se refiere, por tanto, al uso del biosensor y al método para la detección de HTF.

ES 2 846 473 A1

ES 2 846 473 A1

DESCRIPCIÓN

Biosensor microalgal para la detección de HTF

- 5 La presente invención se refiere a un biosensor microalgal, así como a su uso para la
detección de HTF (fluido térmico caloportador, del inglés, *heat transfer fluid*), que es una
mezcla de dos hidrocarburos aromáticos derivados del benceno: difenilo y éter difenílico.
Por tanto, la presente invención se encuadra dentro del sector del Medio Ambiente,
siendo especialmente útil en las Plantas Termosolares que utilizan HTF como fluido
10 caloportador.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- En la actualidad existen numerosos dispositivos para la medición de diferentes
15 parámetros físico-químicos en agua, pero muy pocos pueden ser considerados como
sistemas integrados que monitorizan de manera remota, continua y autónoma los
parámetros de calidad de un cuerpo de agua. En concreto, existen numerosos productos
comerciales de transductores convencionales para la medida de parámetros como
temperatura, conductividad, oxígeno disuelto, turbidez, nutrientes, etc. Sin embargo, no
20 existe ningún transductor convencional capaz de realizar una estimación sensible y
específica de HTF.

- Las tecnologías más tradicionales incluyen la espectrofotometría o la cromatografía
liquida y de gases entre otras, para medir la concentración de los componentes del HTF.
25 Este tipo de análisis, aunque pueden alcanzar especificidad y sensibilidad elevadas, son
técnicas que demandan tiempos largos de análisis y el empleo de reactivos.

- Los sensores Micro Electro Mecánicos (MEMs) están revolucionando el mercado con
dispositivos que en un tamaño inferior a 20 mm son capaces de incorporar
30 acelerómetros, giroscopios, magnetómetros, barómetros o higrómetros con una
robustez y precisión que supera a la de los instrumentos convencionales. Compañías
como BOSCH o los comercializan a precios muy bajos por su amplio uso en plataformas
autónomas como la telefonía digital y los mandos de videojuego. Sin embargo, la batería
de sensores disponibles es aún muy baja y está fundamentalmente limitada a sensores
35 inerciales sin incorporar aún la recepción de contaminantes concretos.

ES 2 846 473 A1

Los LabOn Chip (LOC) constituyen una tecnología conectada con los MEMs y es novedosa para el análisis de volúmenes de fluidos extremadamente pequeños. Sin embargo, su estado de madurez tecnológica aún no es suficiente.

- 5 Los transistores de efecto de campo (FET's), los dispositivos ion-selectivos (ISFETs) o los sensores químicos que miden la energía de reacción con moléculas simple (CHEMFET) son sensores tipo chip similares a los usados en los ordenadores excepto que la puerta metálica que controla la corriente del transistor se reemplaza por un material orgánico o biológico. El material sensible responde a un cambio en el medio
10 circundante, bien sea gaseoso o líquido y la respuesta ejerce un efecto de campo sobre la corriente de fuente a sumidero en el FET. A pesar de su potencialidad, incluso para actuar como un biosensor, la encapsulación se ha convertido en una dificultad crucial mientras que las propiedades de conducción de la superficie del sensor se han demostrado que son difíciles de superar (Vat Dam, W. Olthuis; A van Den Berg, (2007) *Analyst*, 132, 365–370).

- Las técnicas basadas en sonidos y ultrasonidos, al igual que las de microondas, utilizan los cambios en la propagación de ondas a través de diferentes medios como elemento de detección de compuestos en medios sólidos, líquidos y acuosos. Aunque se aplican
20 en entornos industriales, su implementación a la determinación de contaminantes orgánicos en agua parece contar con grandes dificultades de operatividad y especificidad (Franco et al. (2012) *Dyna*, 176: 4-9).

- Otras técnicas como la visión por computador o las imágenes hiperespectrales, aunque
25 útiles para construir mapas de distribución de contaminantes como los hidrocarburos en masas de agua, no han demostrado aún su validez para realizar determinaciones precisas y sensibles de contaminantes concretos.

- Asimismo, se han utilizado biosensores para la identificación de compuestos o
30 contaminantes. Un biosensor es un dispositivo analítico que transforma procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas, permitiendo así la medición de parámetros biológicos o químicos. Está constituido por un receptor biológico, que detecta específicamente una sustancia mediante interacciones biomoleculares, y un transductor, que interpreta la reacción de reconocimiento biológico que produce el
35 receptor traduciéndola en una señal cuantificable. Los elementos biológicos receptores

ES 2 846 473 A1

pueden ser enzimas, anticuerpos, proteínas, secuencias de oligonucleótidos, fragmentos subcelulares, secciones de tejidos animales y vegetales, o células completas entre las que se encuentran bacterias o algas. Por su parte, como transductores se emplean dispositivos ópticos, electroquímicos, mecano-acústicos, etc.

5 Este contacto íntimo entre material biológico y electrónica permite utilizar una respuesta de naturaleza biológica ante un compuesto determinado para generar un sensor que funciona como un transductor convencional, capaz de operar en continuo generando datos exactos y reproducibles sin intervención humana (Brayner et al. (2011) *Anal.Bioanal. Chem.* 401, 581–597).

10 Se han utilizado biosensores, por ejemplo, en la detección de compuestos organofosforados (WO 2009/013370 A1), así como biosensores microalgales específicos para herbicidas (ej. Marvá et al., 2010. *Aquatic Toxicology* 96: 130-134) o plaguicidas (ej. González et al., (2012).. *Aquatic Toxicology* 109: 25-32).

15 Sin embargo, no se conoce hasta la fecha un biosensor como el de la presente invención, basado en microalgas, que permita la detección de HTF en una muestra.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un biosensor para la detección de HTF caracterizado por comprender:

- un biodetector que comprende una población de microalgas y
- un transductor de señal configurado para medir la fluorescencia emitida por la

25 población de microalgas.

Por microalga, según se usa en el contexto de la presente invención, se entiende un alga microscópica (preferiblemente de entre 2 y 200 μm), unicelular, eucariota y fotoautótrofa.

30 El biosensor microalgal objeto de la presente invención aprovecha el hecho de que las microalgas contienen clorofila como pigmento fotosintético, lo que permite usar la fluorescencia de ésta como base para la medida de la actividad biológica celular de las microalgas. La población de microalgas debe recibir luz, bien sea natural (luz solar) o

35 artificial, para realizar la fotosíntesis.

ES 2 846 473 A1

Por biosensor, según se usa en la presente invención, se entiende una herramienta o sistema analítico compuesto por un material biológico inmovilizado (enzima, anticuerpo, célula entera, orgánulo o combinaciones de los mismos), acoplado a un sistema transductor adecuado que convertirá la señal biológica en una señal cuantificable.

5

El biodetector (población de microalgas) se encuentra integrado en el sistema de transducción o transductor.

En una forma de realización, la población de microalgas se dispone en una cubeta o pocillo integrado en el equipo transductor de señal.

10

En particular, en la presente invención, el transductor transforma una señal de fluorescencia en una señal eléctrica.

En una realización preferida, el transductor de señal es un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada.

15

El estado de la actividad fotosintética de las algas verdes puede monitorizarse mediante la intensidad de la fluorescencia. Ello se debe a que luz solar es absorbida por una red de pigmentos unidos a proteínas (fotosistemas I y II). Una pequeña parte de la energía absorbida se disipa en forma de calor; mientras que otra parte se emite como fluorescencia. Es ésta la medida que se realiza con el fluorímetro. Si el alga está en presencia de un tóxico (contaminante) su actividad fotosintética se ve afectada y la medida de la fluorescencia cambia.

20

25

En una realización preferida, la población de microalgas comprende o consiste en la microalga *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) depositada en el Banco Nacional de Algas con nº de depósito BNA D32-09. Esta microalga fue depositada bajo el Tratado de Budapest en el Banco Nacional de Algas (BNA), Centro de Biotecnología Marina, Universidad de la Palmas de GC, C/ Muelle de Taliarte s/n; 35214 Telde -Las Palmas (España), el 25 de marzo de 2009 y le correspondió el nº de depósito BNA D32-09.

30

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del biosensor descrito en el primer aspecto de la invención para la detección y/o cuantificación de HTF en una muestra.

35

ES 2 846 473 A1

Como es conocido para el experto en la materia, el fluido térmico caloportador HTF es una mezcla de dos hidrocarburos: difenilo y éter difenílico. De forma más concreta, HTF se refiere a una mezcla eutéctica de bifenilo (26,5 %) y óxido de difenilo (73,5 %). Este fluido es ampliamente utilizado en centrales termosolares.

El biosensor de la invención permite obtener datos cuantificables en tiempo real, con elevada especificidad y reproducibilidad. Puede utilizarse para la medida de HTF *in situ* y/o en continuo. Además, presenta gran versatilidad al poder utilizarse para medir HTF en aire, en agua y en suelo. En este último caso realizando un proceso previo de extracción, que se realizaría preferiblemente mediante sonicación en medio acuoso, sin uso de disolventes orgánicos

El biosensor presenta una gran relevancia para la detección de HTF en centrales termosolares, no sólo en el agua, sino que puede aplicarse también, con la incorporación de sencillos sistemas de muestreo, para determinar la concentración a la que están expuestos los trabajadores en el ambiente laboral (detección en aire). Igualmente, incorporando una etapa de extracción, es posible aplicar el biosensor para evaluar la posible presencia de HTF en suelos tras derrames. En el caso de muestras de aire, es necesario muestrear durante un tiempo definido en el aire, lo cual se realiza exponiendo un muestreador de aire que lleva un filtro en el que queda retenido el HTF que pueda haber en el aire.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de HTF en una muestra, mediante el biosensor descrito en el primer aspecto de la invención, que comprende las etapas de:

- a) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas mediante el transductor de señal,
- b) contactar la muestra a analizar con la población de microalgas,
- c) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas en contacto con la muestra,
- d) determinar los cambios de fluorescencia entre la medida de la etapa a) y la c) , de manera que la disminución en la fluorescencia implicaría la existencia de HTF.

35

ES 2 846 473 A1

A fin de cuantificar la cantidad de HTF, se llevaría a cabo una etapa adicional e) que comprendería correlacionar dichos cambios de fluorescencia con la concentración de HTF en la muestra, para lo cual se realizaría previamente una recta de calibrado con medidas de fluorescencia de muestras de concentración conocida de HTF.

5

En el caso de que la muestra sea sólida (suelo) o gaseosa (aire), habría que realizar una etapa a'), antes de la etapa b), a fin de extraer el HTF de la muestra sólida o gaseosa en agua.

10 Este método, por tanto, se basa en la medida de los cambios en la fluorescencia que se hayan podido dar debido a la presencia de HTF. El HTF produce una inhibición en la fotosíntesis de las microalgas, lo que da lugar a una menor fluorescencia de las mismas cuando están expuestas a dicho fluido térmico. Esta variación (inhibición) de la fluorescencia se relaciona con la concentración de HTF en la muestra.

15

Para medir el HTF en una muestra, el biosensor se puede utilizar *in situ* en el mismo lugar donde se encuentre la muestra a analizar, ya sea en un entorno cerrado en el ambiente exterior. Para hacer la medida *in situ* y/o en continuo, el biosensor se puede acoplar a un equipo de bombeo que hace pasar la muestra (en estado líquido) a los pocillos donde se encuentre la población de microalgas. El sistema de bombeo se puede programar electrónicamente, bien de forma remota o *in situ*, para que se active de forma automática y con la periodicidad que se establezca.

20

Por tanto, otro objeto de la presente invención es un sistema para detectar y/o cuantificar HTF en una muestra líquida *in situ* que comprende el biosensor de la presente invención y un equipo de bombeo configurado para enviar la muestra líquida a analizar desde su situación original hasta el biosensor a fin de ponerla en contacto con la población de microalgas.

25

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

ES 2 846 473 A1

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **FIG. 1:** Esquema del biosensor de la presente invención.

FIG. 2: Recta de calibrado (% inhibición de fluorescencia frente a concentración de HTF en la muestra) obtenida en el ejemplo 1 de la presente invención.

10 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante un ejemplo realizado por los inventores.

15 Ejemplo 1: Preparación del biosensor y medida de HTF en muestra de agua

En primer lugar, se preparó un cultivo de *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) (BNA D32_09) que constituye la base de la detección. Para ello, se tomó un inóculo de la especie *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) con número de depósito BNA D32-09, depositada en el Banco Nacional de Algas y se cultivó en medio BG-11 (Sigma-Aldrich).

25 A fin de hacer las mediciones, se colocaron 1,5 ml de medio de cultivo (BG-11) con una pipeta pasteur de plástico de un solo uso en una celdilla integrada en el fluorímetro de pulsos de amplitud modulada (Toxy-Pam. Waltz). Este medio de cultivo dota a las algas de las condiciones idóneas para hacer una comparación correcta respecto a la muestra problema y servirá como blanco en la medida. Después se tapó la cubeta correctamente con un tapón negro para evitar la entrada de luz del medio ambiente exterior a la cubeta. Posteriormente se realizó la medida de fluorescencia. Dicha medida correspondió al blanco.

30 Después se destapó la cubeta y se añadieron 100 µl del cultivo de *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) (BNA D32-09) con una micropipeta automática. Este cultivo estuvo al menos 2 horas antes en completa oscuridad. Se tapó la cubeta con el tapón negro y se realizó la medida de fluorescencia. El biosensor realizó tres medidas, una cada 30 segundos. Se hizo la media de las tres medidas y se calculó la desviación estándar.

ES 2 846 473 A1

Estas medidas se realizaron como control para después comparar el resultado con la muestra de interés.

- 5 Para hacer la medida con la muestra real a analizar (en este caso, se preparó una muestra de agua contaminada con HTF para hacer el ensayo, que será la muestra a analizar) se añadieron 1,5 ml de dicha muestra. Se tapó la cubeta con el tapón negro. Se destapó y se añadieron 100 μ l de cultivo de algas con ayuda de una micropipeta automática. Mezclar tres veces para conseguir de esta manera una mezcla homogénea.
- 10 Y se realizaron las medidas de fluorescencia de la muestra problema.

- Una vez hechas las medidas del control y de la muestra problema, el fluorímetro que mide las variaciones en la fluorescencia permitió obtener los datos del % inhibición de la capacidad fotosintética del cultivo al estar en contacto con el tóxico (HTF). El %
- 15 inhibición tendrá un valor de 0 a 100, indicando que el alga está en correctas condiciones cerca del 0 y que ha muerto a causa del toxico cercano al 100. En el caso de la muestra a analizar se obtuvo un valor de inhibición del 55%.

- 20 Para saber la concentración exacta de HTF en la muestra se realizó una recta de calibrado con medidas de muestras con concentración de HTF conocida, que en el caso del HTF y la microalga usada dio el resultado de la figura 2. En el caso de la muestra a analizar se obtuvo un valor de inhibición del 55%, que corresponde a una concentración de HTF de 90.000 microgramos/l.

25

ES 2 846 473 A1

REIVINDICACIONES

1. Biosensor para la detección de HTF caracterizado por comprender:
 - un biodetector que comprende una población de microalgas y
 - un transductor de señal configurado para medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas.
2. Biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 donde el transductor de señal es un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada.
3. Biosensor de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde la población de microalgas comprende o consiste en la especie *Scenedesmus obtusus* (Gp4p) depositada en el Banco Nacional de Algas con nº de depósito BNA D32-09.
4. Sistema para detectar y/o cuantificar HTF en una muestra líquida que comprende el biosensor descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un equipo de bombeo configurado para enviar la muestra líquida a analizar desde su situación original hasta el biosensor a fin de ponerla en contacto con la población de microalgas.
5. Uso del biosensor descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para detectar y/o cuantificar HTF en una muestra.
6. Uso según reivindicación 5 donde la muestra es una muestra de agua, de aire o de suelo.
7. Uso según reivindicación 5 para detectar HTF en una muestra de agua en continuo y/o *in situ*.
8. Método para la detección y/o cuantificación de HTF en una muestra, mediante el biosensor descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:
 - a) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas mediante el transductor de señal,
 - b) contactar la muestra a analizar con la población de microalgas,
 - c) medir la fluorescencia emitida por la población de microalgas en contacto con la muestra,

ES 2 846 473 A1

d) determinar los cambios de fluorescencia entre la medida de la etapa a) y la etapa.

5 9. Método, según reivindicación 8, donde la muestra a analizar es es una muestra de agua, de aire o de suelo.

10. Método, según reivindicación 8, donde las etapas a) a d) se realizan en continuo y/o *in situ*.

10 11. Método, según reivindicación 8, donde, a fin de cuantificar la cantidad de HTF, se llevaría a cabo una etapa adicional e) que comprendería correlacionar dichos cambios de fluorescencia con la concentración de HTF en la muestra mediante una recta de calibrado realizada con medidas de fluorescencia de muestras de concentración conocida de HTF.

15 12. Método, según reivindicación cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 11, donde se realiza una etapa adicional a'), antes de la etapa b), en caso de que la muestra proceda del suelo o del aire y donde dicha etapa a') comprende la extracción el HTF de la muestra sólida o gaseosa en agua.

20

ES 2 846 473 A1

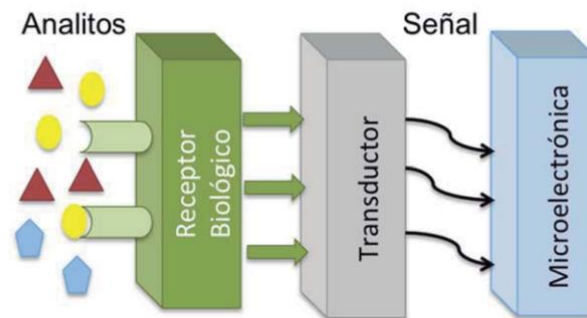


FIG. 1

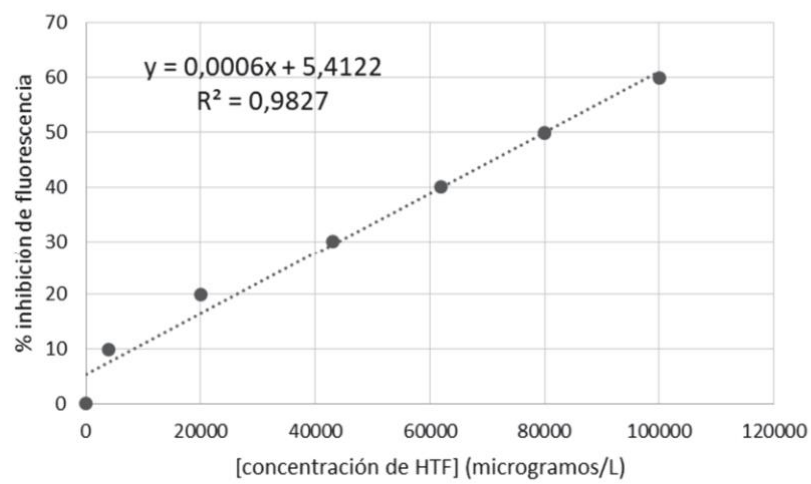


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- 21 N.º solicitud: 202030068
22 Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2020
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FRENSE D <i>et al.</i> Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. Sensors and Actuators B: Chemical, 19980831 Elsevier BV, NL. McDonagh Colette; MacCraith Brian, 31/08/1998, Vol. 51, N° 1-3, Páginas 256 - 260, ISSN 0925-4005, <DOI: doi:10.1016/S0925-4005(98)00203-2>. Página 256, columna derecha, tercer párrafo; página 257, columna izquierda; página 257, columna derecha, cuarto párrafo; página 258, columna derecha, segundo párrafo.	1-12
A	WO 2009013370 A1 (UNIV COMPLUTENSE DE MADRID REC <i>et al.</i>) 29/01/2009, Página 1, líneas 8-13; página 12, línea 24; página 13, líneas 1-20.	1-12
A	GIROTTI <i>et al.</i> Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. Analytica Chimica Acta, 20071231 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Xu Guowang; Wishart David; Li Liang, 31/12/2007, Vol. 608, N° 1, Páginas 2 - 29, ISSN 0003-2670, <DOI: doi:10.1016/j.aca.2007.12.008>. Página 6, columna derecha, tercer párrafo; página 16, columna derecha, segundo párrafo; página 20, columna derecha, último párrafo.	1-12
A	EJEIAN FATEMEH <i>et al.</i> Biosensors for wastewater monitoring: A review. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, 20180712 ELSEVIER SCIENCE LTD. UK, AMSTERDAM, NL. Turner Anthony P F; Tang Alice, 12/07/2018, Vol. 118, Páginas 66 - 79, ISSN 0956-5663, <DOI: doi:10.1016/j.bios.2018.07.019>. Página 67, columna izquierda, último párrafo.	1-12
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones n°:		
Fecha de realización del informe 27.05.2020	Examinador S. González Peñalba	Página 1/2

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 202030068

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N21/64 (2006.01)

G01N33/00 (2006.01)

C12N1/12 (2006.01)

C12Q1/02 (2006.01)

C12R1/89 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12N, C12Q, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, INTERNET.

