

TD

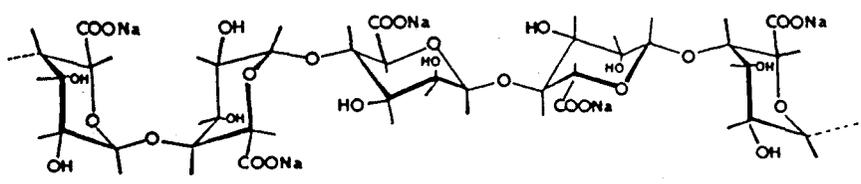
599

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
BIBLIOTECA DE CIENCIAS
Código de acceso al fondo de libros
al folio 239 número 63 del libro
correspondiente a 1984
Sevilla, España, el día del depósito de 1984

Alema Stoffte

BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS

FOTOPRODUCCION DE GLICOLATO Y ELIMINACION
DE N-CONTAMINANTES POR
Chlamydomonas reinhardtii



CARLOS VILCHEZ LOBATO

Universidad de Sevilla

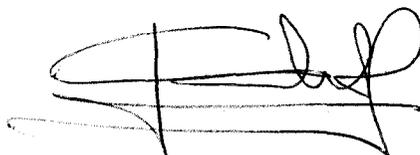
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL Y
BIOLOGIA MOLECULAR

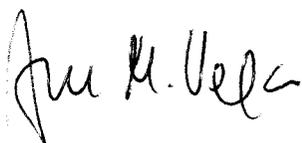
BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS: FOTOPRODUCCION DE
GLICOLATO Y ELIMINACION DE N-CONTAMINANTES POR
Chlamydomonas reinhardtii

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas
por el Licenciado



Carlos Vílchez Lobato

Directores



Dr. José M. Vega Piqueres
Catedrático de Bioquímica
y Biología Molecular



Dr. Francisco Galván Cejudo
Prof. Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

DEDICATORIAS

*A vosotros, papá y mamá, Irene, Rocío, Migue, M^a Jesús,
Tere y Marisa, como fruto de mucho tiempo que no hemos pasado juntos
y de vuestra ayuda en los momentos menos fáciles*

*A tí, Eugenia, que compartiste conmigo los mejores momentos
y me alentaste (y soportaste) en los peores,
quiero dedicarte especialmente este trabajo*

*A vosotros, Javi y Pepe, que habeis convivido conmigo
la mayor parte de los últimos cuatro años en el laboratorio,
y que en innumerables ocasiones me habeis demostrado vuestro apoyo
y amistad incondicionales, también deseo dedicaros esta Tesis*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José M. Vega Piqueres deseo expresarle mi más sincero agradecimiento por acogerme en su grupo de investigación y proporcionarme todos los medios que tuvo a su alcance, tanto para el desarrollo de la labor científica como de mi formación investigadora, no escatimando tiempo y trabajo alguno para coordinar la mejor orientación, elaboración y escritura de esta Tesis Doctoral. El estímulo y apoyo que me ha ofrecido en innumerables ocasiones han influido decisivamente en el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Francisco Galván Cejudo quiero expresarle mi más sincera gratitud por el apoyo humano y la orientación científica que me prestó en la realización de la primera parte de la Tesis. Igualmente, deseo agradecerle su colaboración en las gestiones por las cuales pude realizar una productiva estancia en la Universidad holandesa de Wageningen.

Al Dr. Antonio Márquez Cabeza deseo agradecerle la ayuda que me ofreció en mis primeros pasos en la investigación, como alumno interno del Departamento.

A vosotros, José Román, José Luis, Eloisa y Rosa, compañeros de laboratorio con quienes he compartido momentos muy divertidos, os agradezco el apoyo que me habeis ofrecido y, sobre todo, el entendimiento que nos ha permitido una convivencia grata en el trabajo.

A M. Angeles y Chari les doy las gracias por la ayuda que me prestaron en la realización de algunos de los últimos experimentos de esta Tesis.

A todos los demás compañeros del Departamento (grupo de Química) os doy las gracias por todos los buenos ratos que hemos pasado juntos, sobre todo fuera del trabajo, en horas de copas y tapas por las calles de nuestra Sevilla.

Al Dr. Hans Tramper deseo agradecerle la oportunidad que me brindó de realizar una estancia en su Departamento (Bioprocesos, Universidad Agrícola de Wageningen), y a René Wijffels su amistad, paciencia, apoyo continuo y sincero interés para que todo lo que hice en Holanda, tanto en el plano científico como personal, se desarrollara perfectamente, como así fue.

Al Dr. Codd deseo agradecerle el haberme aceptado en su Departamento (Ciencias Biológicas, Universidad de Dundee) para realizar una estancia durante el próximo invierno.

Al Dr. José Muñoz, del Departamento de Ingeniería Química, le agradezco todo el tiempo que me dedicó en el microscopio óptico para conseguir fotografías de nuestro sistema biológico.

A la Dirección General de Investigación Científica y Técnica deseo agradecerle la concesión de una beca de PFPI, dentro del Plan Nacional de Investigación (Programa de Biotecnología, convocatoria 1988), que me ha permitido desarrollar los trabajos de la Tesis durante los últimos cuatro años. Igualmente quiero expresar a dicho organismo mi gratitud por haberme concedido dos becas para realizar sendas estancias en los Departamentos de Ingeniería de Bioprocesos de la Universidad de Wageningen (Holanda), y Ciencias Biológicas de la Universidad de Dundee (Escocia). Finalmente, desearía agradecerle la financiación concedida a los proyectos en los que he trabajado durante la realización del Doctorado.

Quiero agradecer especialmente a M^a José Cubas y Javier Vigara el tiempo e interés que han invertido para que las diapositivas y la presentación oral de esta Tesis resultaran lo más dignas posibles.

Finalmente, deseo dar las gracias a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han contribuido en los últimos cuatro años a que esta Tesis sea una realidad.

Publicaciones y Comunicaciones a Congresos

Parte de los resultados incluidos en este trabajo se han publicado como artículos en revistas científicas o se han presentado como Comunicaciones a Congresos.

1. Artículos en revistas

GLYCOLATE PHOTOPRODUCTION BY FREE AND ALGINATE-ENTRAPPED CELLS OF *Chlamydomonas reinhardtii*

C Vílchez, F Galván, JM Vega

Appl Microbiol Biotechnol 35:716-719 (1991)

ANALYSIS OF GROWTH AND SPECIFIC ACTIVITIES OF IMMOBILIZED MICROBIAL CELLS

MR Smith, A de Haan, RH Wijffels, EE Beuling, C Vílchez, JAM de Bont

Biotechnol Tech 5:323-326 (1991)

2. Artículos en Libros y Proceedings de Congresos

PHOTOSYNTHETIC, RESPIRATORY AND PHOTORESPIRATORY ACTIVITIES IN *Chlamydomonas reinhardtii* CELLS ENTRAPPED IN ALGINATE MATRIX

F Galván, JA Borrero, C Vílchez, F Santos-Rosa

En: JAM de Bont, J Visser, B Mattiasson, J Tramper (eds)

Physiology of immobilized cells. pp 421-426

Elsevier Science Publishers. Amsterdam 1990

CONSUMO DE NITRITO POR CELULAS DE *Chlamydomonas reinhardtii* INMOVILIZADAS EN ALGINATO CALCICO

C Vílchez, JM Vega

En: M. Pineda, F Castillo (eds) Metabolismo del Nitrógeno. pp 28-32
Sociedad Española de Bioquímica. Córdoba 1992

3. Comunicaciones a Congresos

FOTOPRODUCCION DE GLICOLATO POR CELULAS LIBRES E INMOVILIZADAS DEL ALGA VERDE *Chlamydomonas reinhardtii*

C Vílchez, F Galván, JM Vega

XVI Congreso Nacional de Bioquímica
Resumen 16-34. Alicante 1989

PHOTOSYNTHETIC, RESPIRATORY AND PHOTORESPIRATORY ACTIVITIES IN *Chlamydomonas reinhardtii* CELLS ENTRAPPED IN ALGINATE MATRIX

F Galván, JA Borrero, C Vílchez, F Santos-Rosa

Physiology of Immobilized Cells Congress
Abstracts P.20. Wageningen 1989

FOTOPRODUCCION DE GLICOLATO Y EVOLUCION DE OXIGENO EN CELULAS DE *Chlamydomonas reinhardtii* INMOVILIZADAS EN MATRIZ DE ALGINATO

C Vílchez, F Galván, JM Vega

III Congreso Nacional de Biotecnología
Resúmenes P-10.8. Murcia 1990

ASIMILACION DE NITRATO EN MICROALGAS

JM Vega, JM Martínez-Rivas, A Menacho, C Vílchez

II Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal
Resúmenes pp 47-48. Madrid 1991

CONSUMO DE NITRITO POR CELULAS DEL ALGA VERDE *Chlamydomonas reinhardtii* INMOVILIZADAS EN ALGINATO CALCICO

C Vílchez, JM Vega

Primera Reunión Nacional Metabolismo del Nitrógeno

Resúmenes pág. 18. Málaga 1992

**NITRITE ELIMINATION FROM DOMESTIC WATERS BY AIRLIFT
AND FLUIDIZED BED CONTINUOUS FLOW BIOREACTORS**

C. Vílchez, RH Wijffels, R. Rodríguez, JM Vega

VII PAABS Congress

Abstracts 134-R. Mexico 1992

**BIOELIMINACION DE N-CONTAMINANTES DE AGUAS
DOMESTICAS POR CELULAS INMOVILIZADAS DE
Chlamydomonas reinhardtii EN BIORREACTORES**

C Vílchez, MA López, JM Vega

IV Congreso Nacional de Biotecnología

Resúmenes P-10.4. Santiago de Compostela. 1992

Abreviaturas

ADP	Adenosín-5'-difosfato
AOA	Aminooxiacetato
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
Chl	Clorofila
cps	Centipoises
D	Tasa de dilución
e	electrón
ϵ	Coefficiente de extinción
F	Flujo
Fd	Ferredoxina
G	Gulurónico
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HPMS	Hidroxi piridín metanosulfonato
INH	Isoniazida
M	Manurónico
MES	2 (N-morfolino) etanosulfonato
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
μ	Tasa de crecimiento
N	Número de células

Abreviaturas

NAD(P)H	Nicotinamida adenín dinucleótido (fosfato) reducido
NiR	Nitrito reductasa
P _i	Fosfato inorgánico
PLC	Computador Lógico Programable
p/v	Peso/volumen
RAC	Reactor tipo airlift, continuo
RAD	Reactor tipo airlift, discontinuo
RAL	Reactor tipo airlift loop
RB	Reactor bioquímico
RUBISCO	Ribulosa bifosfato carboxilasa
SCP	Single cell protein
Tricina	Tris-(hidroximetil) metilglicina
TRIS	Tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad de actividad enzimática

Indice

I INTRODUCCION	1
1. Fotosíntesis	2
2. Fotorrespiración	4
3. Metabolismo del nitrógeno inorgánico	9
4. Inmovilización de microorganismos	13
5. N-contaminantes en aguas	16
6. Biotecnología de microorganismos en la depuración de N-contaminantes	21
7. Uso de biorreactores en el tratamiento de aguas	22
II MATERIALES Y METODOS	24
1. Organismos empleados	24
2. Condiciones de cultivo	24
3. Permeabilización de células de <i>C. reinhardtii</i>	27
4. Técnicas de inmovilización celular	27
4.1. Atrapamiento en alginato cálcico o bórico	27
4.2. Atrapamiento en agar	29
4.3. Atrapamiento en carragenato potásico	29
5. Condiciones para la producción de glicolato	31
5.1. Células libres	31
5.2. Células inmovilizadas en alginato cálcico	32
6. Condiciones para el consumo de nitrito	32
6.1. Células libres	32
6.2. Células inmovilizadas en alginato cálcico	33
6.3. Células inmovilizadas en carragenato potásico	33
7. Determinaciones analíticas	34
7.1. Clorofila	34

7.2. Proteína	34
7.3. Glicolato	35
7.4. Amonio	35
7.5. Nitrito	36
7.6. Nitrato	36
8. Determinación de actividades biológicas	37
8.1. Actividades fotosintética y respiratoria	37
8.2. Actividad nitrificante	37
<i>Células libres</i>	37
<i>Células inmovilizadas en carragenato potásico</i>	38
8.3. Actividad fosfoglicolato fosfatasa	38
8.4. Actividad nitrito reductasa	39
9. Reactores utilizados	40
9.1. Reactor tipo airlift discontinuo	40
9.2. Reactor tipo airlift de flujo continuo	40
9.3. Reactor tipo airlift loop de flujo continuo	42
10. Observación al microscopio óptico	43
11. Reactivos	44
12. Aparatos	44
III RESULTADOS	46
1. Actividades fotosintética y respiratoria de células inmovilizadas de <i>C. reinhardtii</i>	46
1.1. Influencia de las condiciones de inmovilización	47
<i>Efecto de los iones Ca^{2+} y Ba^{2+} utilizados en el proceso de gelificación ionotrópica</i>	47
<i>Efecto de la carga celular</i>	49
<i>Efecto de la concentración de la suspensión de alginato</i>	49
1.2. Influencia del tiempo de almacenamiento	51
<i>En alginato</i>	51
<i>En agar</i>	52

1.3. Influencia de las condiciones ambientales sobre las actividades biológicas de células libres e inmovilizadas	53
<i>Efecto de la temperatura</i>	53
<i>Efecto del pH</i>	56
2. Fotoproducción de glicolato por <i>C. reinhardtii</i>	58
2.1. Influencia de la transición alto-bajo CO ₂ e inhibidores fotorrespiratorios	58
<i>Efecto de la transición alto-bajo CO₂ y AOA</i>	58
<i>Efecto de la concentración de AOA</i>	61
<i>Efecto de otros inhibidores fotorrespiratorios</i>	62
2.2. Influencia de las condiciones de inmovilización	64
<i>Efecto de la edad del cultivo</i>	64
<i>Efecto de la carga celular</i>	64
<i>Efecto de la viscosidad de la suspensión de alginato</i>	67
2.3. Influencia de las condiciones ambientales y nutricionales	68
<i>Efecto de la luz</i>	68
<i>Efecto de la temperatura</i>	71
<i>Efecto del pH</i>	71
<i>Efecto de la fuerza iónica</i>	73
<i>Efecto de la fuente de nitrógeno</i>	74
3. Sistemas de producción de glicolato a largo plazo por células de <i>C. reinhardtii</i>	75
3.1. Producción continua por células libres	75
3.2. Producción continua por células inmovilizadas	78
3.3. Producción discontinua por células libres o inmovilizadas	79
4. Caracterización del consumo de nitrito por células de <i>C. reinhardtii</i>	85
4.1. Influencia de las condiciones de inmovilización	85
<i>Efecto de la carga celular</i>	85
<i>Efecto de la concentración de la suspensión de alginato</i>	87

4.2. Influencia de las condiciones ambientales y nutricionales en células libres e inmovilizadas	88
<i>Efecto de la intensidad luminosa</i>	88
<i>Efecto de la carencia de CO₂</i>	89
<i>Efecto de la temperatura</i>	91
<i>Efecto del pH</i>	92
4.3. Estudios cinéticos del consumo de nitrito por células libres e inmovilizadas	94
<i>Estimación de la K_s para el nitrito por células inmovilizadas</i>	94
<i>Inhibición por amonio</i>	95
<i>Efecto del tiempo de almacenamiento de las células</i>	95
5. Desarrollo de biorreactores para la eliminación de nitrito en aguas domésticas mediante el uso de células inmovilizadas	97
5.1. Eliminación de nitrito por células de <i>C. reinhardtii</i> inmovilizadas en alginato y situadas en un reactor tipo airlift	97
5.2. Eliminación de nitrito por células de <i>Nitrobacter agilis</i> inmovilizadas en carragenato y situadas en un reactor tipo airlift loop	111
 IV DISCUSION	 117
1. Actividades fotosintética y respiratoria de células inmovilizadas de <i>C. reinhardtii</i>	117
2. Fotoproducción de glicolato por células de <i>C. reinhardtii</i>	123
3. Consumo de nitrito por células inmovilizadas de <i>C. reinhardtii</i>	130
4. Desarrollo de biorreactores para la eliminación de nitrito en aguas domésticas mediante el uso de células inmovilizadas	134
5. Posibilidades de co-inmovilización de células de <i>C. reinhardtii</i> con bacterias nitrificantes	142

V CONCLUSIONES	145
VI BIBLIOGRAFIA	148

I Introducción

De acuerdo con el informe Spinks (1980) la Biotecnología se define como la utilización de organismos vivos, sistemas o procesos biológicos para la producción industrial o su empleo en los servicios de saneamiento. Desde un principio la Biotecnología fue considerada como creadora de nuevas industrias con baja demanda energética, debido a que el crecimiento de microorganismos representa una fuente de energía renovable que disminuye la dependencia con respecto a los escasos y costosos depósitos de combustibles fósiles existentes, o bien de los productos químicos de ellos derivados. Los microorganismos tienen diversos usos, entre los que se incluyen la síntesis de compuestos químicos, tales como el etanol por fermentación, la producción de cerveza mediante levaduras, o de enzimas o alimentos (proteínas de organismos unicelulares, SCP), así como el tratamiento de residuos, que tiene como objetivo la descontaminación medioambiental. Paralelamente la biomasa obtenida de microorganismos puede usarse como pienso para animales, o bien para la obtención de productos químicos. Una gran parte de la Biotecnología implica el descubrimiento y la subsiguiente optimización de los procesos biológicos y bioquímicos necesarios para explotar las fuentes naturales de materia prima.

Cuando se consigue un avance en Biotecnología, normalmente éste se traduce en un éxito económico, además del científico. Es esencial, por tanto, que los ingenieros intervengan en las primeras fases de la planificación de un proceso biotecnológico. A menudo es difícil evaluar, en las primeras etapas, si el conocimiento biológico, bioquímico y químico de un sistema en estudio será suficiente para alcanzar el éxito

científico. El ulterior requerimiento de viabilidad económica añade una valoración crítica adicional a cualquier intento de aplicación de un principio de Biotecnología, especialmente cuando su desarrollo a gran escala lleva consigo una considerable inversión en materiales, combustibles y mano de obra. Es esencial, por lo tanto, diseñar sistemas económicamente rentables y técnicamente viables que, dentro de la gran variedad de posibilidades ofrecidas por los distintos campos que abarca la Biotecnología, sean de fácil control y su empleo a gran escala conlleve la menor complejidad posible. Al igual que una enzima puede ser aislada y convenientemente manipulada en reactores apropiados, las células microbianas, especialmente cuando se encuentran inmovilizadas en soportes sólidos, actúan como catalizadores que llevan a cabo reacciones químicas concretas, lo que implica menos trabajo preparativo. De esta manera una gran parte de la Biotecnología se refiere al cultivo de microorganismos a gran escala, ya que éstos comienzan a ser una valiosa alternativa para muchos procesos fisicoquímicos de producción actualmente utilizados en la práctica.

1. FOTOSINTESIS

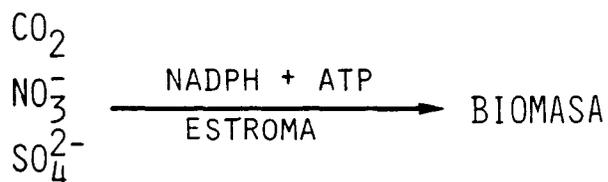
Los seres vivos son sistemas fisicoquímicos inestables que intercambian materia y energía con el medio que les rodea. La fuente última de energía que mueve la vida en la Biosfera es el SOL y una pequeña parte de esta energía se almacena transitoriamente como energía química, gracias al proceso de la Fotosíntesis, sin duda clave para nuestra supervivencia, ya que la biomasa primaria vegetal que inicialmente se forma sirve posteriormente de alimento plástico y energético para los demás seres que habitan el planeta. La Fotosíntesis consiste en la conversión de energía luminosa en energía química y se realiza en el cloroplasto de plantas superiores y algas, o en las lamelas de las cianobacterias y el cromatóforo de algunas bacterias. El proceso consta de dos fases: luminosa y oscura. En la primera de ellas se rompe una molécula de agua para impulsar, con

ayuda de la luz, un flujo de electrones que termina sintetizando NADPH y ATP, los cuales constituyen el poder asimilatorio de la planta, que se utiliza posteriormente en la fase oscura para asimilar CO_2 , nitrato, sulfato, etc, y hacer BIOMASA (Losada et al. 1990). Las reacciones básicas de la fotosíntesis se muestran a continuación:

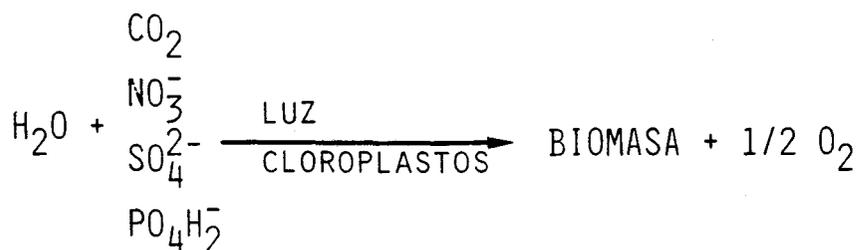
FASE LUMINOSA



FASE OSCURA



BALANCE GLOBAL



Aproximadamente 10^{11} toneladas de carbono y 2×10^{10} de nitrógeno son fijados anualmente por fotosíntesis, con un contenido energético de 3×10^{21} J, lo cual supone unas 10 veces la energía total consumida en un año en todo el mundo. Por lo tanto, la fotosíntesis es una gran fuente de energía, actualmente poco aprovechada. En este sentido se han hecho intentos de diseñar sistemas fotobiológicos, bien a base de células enteras de algas o cianobacterias, tilacoides aislados, cromatóforos bacterianos, o incluso fotosistemas individuales, que han sido usados en el diseño de fotorreactores para la producción de hidrógeno, agua oxigenada, ATP, NADPH y amoníaco, además de polisacáridos, combustibles, etc. (Vega et al. 1983; Hall y Rao 1989). Las posibilidades que actualmente ofrece la Biotecnología en el uso de los microorganismos fotosintéticos se extienden tanto a la producción de metabolitos primarios y secundarios (Scott 1987; Trevan y Mak 1988; Park et al. 1991) como a la descontaminación de aguas, desarrollándose a escala de laboratorio múltiples sistemas particularmente indicados para la eliminación de compuestos tóxicos en aguas de uso doméstico y residuales (Proulx y de la Noüe 1988; de la Noüe et al. 1990; Hall y Rao 1991).

2. FOTORRESPIRACION

El consumo de oxígeno dependiente de luz y la eliminación de CO_2 que tiene lugar en organismos fotosintéticos se ha denominado Fotorrespiración. En dicha ruta metabólica los azúcares son oxidados a CO_2 en la luz, de ahí que se conozca también como el ciclo oxidativo del carbono o ciclo C_2 , que coexiste con el ciclo fotosintético reductivo del carbono o ciclo C_3 , en el cual el CO_2 es reducido hasta azúcar-P en el cloroplasto y subsecuentemente convertido en almidón para almacenamiento y transporte al citoplasma. Los ciclos C_2 y C_3 están internamente relacionados debido a la inevitable competición entre CO_2 y O_2 por la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa, (RUBISCO, EC 4.1.1.39), enzima que cataliza el primer paso en ambos tipos de fijaciones, ya sea de CO_2 vía C_3 , o bien de O_2 vía C_2 (Husic et al. 1987).

La Bioquímica de la Fotorrespiración la propusieron por primera vez, en plantas superiores, Keys et al. (1978), y en ella se dan simultáneamente dos ciclos, uno de compuestos carbonados y otro de compuestos nitrogenados, con la implicación de tres orgánulos: cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. La Fotorrespiración en microalgas muestra algunas características diferentes de la de plantas superiores, o al menos no definitivamente establecidas. Por ejemplo, a) se duda de la participación de unos microcuerpos parecidos a los peroxisomas de plantas superiores; b) algunas actividades enzimáticas implicadas en el proceso, tal y como se ha descrito para hojas de plantas superiores, no se han detectado en microalgas, o sus niveles intracelulares no se consideran significativos; y c) el glicolato es oxidado por O_2 para formar glioxilato, en una reacción catalizada por la glicolato oxidasa (EC 1.1.3.1), localizada en los peroxisomas, mientras que la oxidación de glicolato en microalgas está catalizada por la glicolato deshidrogenasa (EC 1.1.99.14), enzima unida a la membrana mitocondrial en la mayoría de las algas eucarióticas, o a las membranas tilacoidales de las cianobacterias (Husic et al. 1987). Los ciclos fotorrespiratorios del carbono y el nitrógeno en microalgas se muestran en la Fig. 1.

El propósito aparente de esta ruta metabólica es doble y contempla los siguientes puntos:

a) la recuperación del fosfoglicolato producido por la actividad oxidasa de la RUBISCO nos lleva a la formación de glicina que subsiguientemente se oxida en la mitocondria hasta amonio, serina y CO_2 .

b) el ciclo se cierra por la reasimilación del amonio a través de la ruta glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2)-glutamato sintasa (GOGAT; EC 1.4.1.7, para Fd; y EC 1.4.1.13, para NADH), que actúa preferentemente en el cloroplasto.

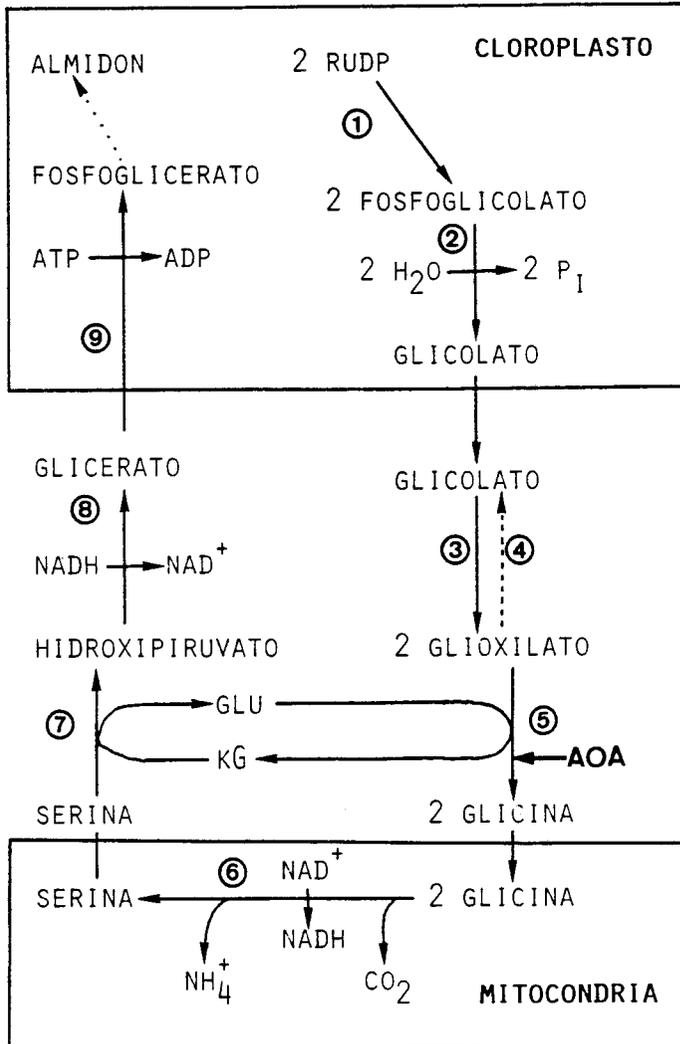
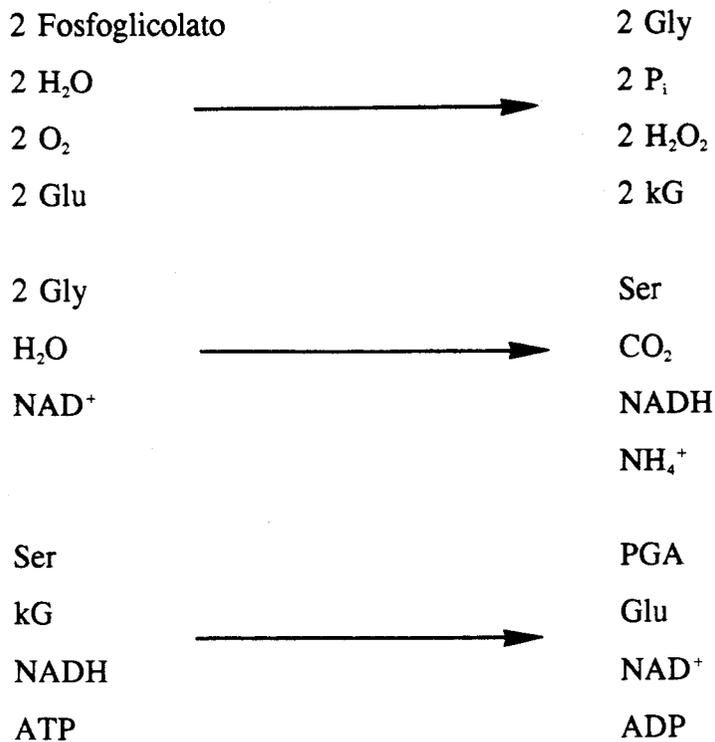


Fig. 1. Esquema de la Fotorrespiración en microalgas.

- 1 Ribulosa bifosfato oxidasa (RUBISCO, EC 4.1.1.39)
- 2 Fosfoglicolato fosfatasa (EC 3.1.3.18)
- 3 Glicolato dehidrogenasa (EC 1.1.99.14)
- 4 Glioxilato reductasa (EC 1.1.1.26)
- 5 Glioxilato aminotransferasa (EC 2.6.1.45)
- 6 Serina hidroximetil transferasa (EC 2.1.2.1)
- 7 Serina aminotransferasa (EC 2.6.1.4)
- 8 Hidroxipiruvato reductasa (EC 1.1.1.29)
- 9 Glicerato kinasa (EC 2.7.1.31)

Las reacciones básicas, o balances de materia, más significativos presentes en la Fotorrespiración son las siguientes:

Recuperación de carbono fijado en fosfoglicolato:



Recuperación de amonio liberado:



Las funciones de la Fotorrespiración han sido ampliamente estudiadas (Tolbert 1980; Ogren 1984). Inicialmente se consideró como un proceso que pierde energía, lo que repercute negativamente en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, debido al importante consumo de poder asimilatorio fotosintético que se produce, se ha propuesto que la Fotorrespiración previene daños fotooxidativos que se producirían inevitablemente como consecuencia del exceso de O₂ (Osmond 1981; Peltier y Thibault 1985). En este sentido, las algas verdes unicelulares y cianobacterias han desarrollado mecanismos para concentrar en el interior celular el carbono inorgánico (CO₂ + HCO₃⁻ + CO₃²⁻) con el fin de estimular las tasas de actividad fotosintética en situaciones de estrés producido por el bajo CO₂ ambiental, y de esta forma suprimir la tasa de Fotorrespiración (Berry et al. 1976; Miller y Colman 1980). La inducción de dicho sistema parece estar estrechamente relacionada con el incremento de la actividad anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1; Coleman et al. 1984).

La Fotorrespiración en algas engloba la biosíntesis de glicolato en los cloroplastos iluminados, seguida de su metabolismo. Puesto que el aminooxiacetato es un excelente inhibidor del ciclo C₂, la cantidad de glicolato excretado por las células en su presencia puede utilizarse para determinar la actividad ribulosa-1,5-bisfosfato oxigenasa, y tener también una idea de la actividad fotorrespiratoria de las células. La excreción de glicolato al medio de cultivo se ha estudiado desde un punto de vista fisiológico para obtener información acerca de la Fotorrespiración en microalgas (Tolbert et al. 1983; Beudeker y Tabita 1984; Moroney et al. 1986), relegando a un segundo término la posibilidad de aprovechar este fenómeno para la obtención de medios ricos en glicolato, metabolito secundario de múltiples usos. En este contexto, la información existente con sistemas inmovilizados es muy escasa.

El glicolato se obtiene químicamente por la acción de la sosa cáustica sobre ácido monocloroacético, y también por reducción electrolítica del ácido oxálico. Su empleo, en sus formas ácida y básica, está actualmente muy extendido en diversos tipos de industrias, como el procesado de textiles, cuero y metales. Se utiliza también en el control de pH, así como

en la manufactura de adhesivos, abrillantamiento del cobre, electrochapado, limpieza y molienda química de metales (Windholz et al. 1976).

En este trabajo hemos establecido un sistema de fotoproducción de glicolato utilizando células de *C. reinhardtii* atrapadas en perlas de alginato, con la idea final de diseñar un proceso productivo de interés biotecnológico para las industrias o actividades que requieran glicolato como materia prima. Los estudios realizados en este campo, analizando la fisiología y enzimología del proceso de excreción, aportan las condiciones óptimas que permiten diseñar sistemas que produzcan elevadas tasas de glicolato en el medio extracelular, y que sean viables durante largos periodos de tiempo.

3. METABOLISMO DEL NITROGENO INORGANICO

El nitrógeno existe en varios estados de oxidación en la naturaleza, que van desde + 5 en el nitrato hasta -3 del amoníaco y la materia orgánica, pasando por el nitrógeno molecular (0). Estas formas pueden interconvertirse en la biosfera gracias a la actividad metabólica de los seres vivos, y vistas en conjunto configuran el ciclo del nitrógeno que está constituido por los siguientes procesos:

a) Reducción asimilatoria de nitrato. La realizan principalmente las plantas y microorganismos en general. En microalgas y células verdes de plantas superiores se ha establecido que la asimilación de nitrato implica tres etapas básicas:

1. El transporte de nitrato, proceso que requiere energía metabólica y está mediado por una permeasa específica.

2. La reducción de nitrato hasta amonio, que requiere 8 e, es independiente de ATP, y está catalizada por la acción sucesiva de dos enzimas, NAD(P)H-nitrato reductasa (EC 1.6.6.2) y Fd-nitrito reductasa (EC 1.7.7.1).

3. La incorporación de amonio en esqueletos carbonados como grupo α -amino de glutamato, que está catalizada por el ciclo GS-GOGAT, que sintetiza una molécula neta de glutamato, con el consumo de 1 ATP y 2 e.

En resumen, la asimilación de 1 N-nitrato como grupo α -amino requiere 10 e y al menos 2 ATP (Guerrero et al. 1981; Vega et al. 1991).

Además del amonio que se forma directamente a partir de nitrato, o que se toma del medio, en las plantas C₃ y microalgas se forma amonio endógenamente por descarboxilación de glicina (amonio fotorrespiratorio), o por degradación de proteínas, seguida de desaminación y desamidación de aminoácidos. El amonio así formado se recicla por medio de la ruta GS-GOGAT. Estimaciones cuantitativas acerca del amonio procedente de la asimilación de nitrato y aquél de la Fotorrespiración son escasas en microalgas, y datos previos indican que el amonio reciclado podría suponer hasta el 40% del total asimilado (Larsson et al. 1982).

b) Fijación de nitrógeno. En su forma inerte (N₂) el nitrógeno es el principal componente de la atmósfera, y a pesar de ser un elemento esencial de muchos compuestos necesarios para la vida (aminoácidos, proteínas, nucléicos, etc.), sólo unos pocos microorganismos altamente especializados son capaces de fijarlo del aire y convertirlo en formas biológicamente asequibles, gracias entre otras cosas, a la dotación de una enzima única, la nitrogenasa (Martínez-Molina y Velázquez 1992). Este proceso es esencialmente anaeróbico y lo realizan los siguientes microorganismos:

1. Algunas bacterias de vida libre, como *Azotobacter* (aeróbica), *Clostridium* y *Klebsiella* (anaeróbica).
2. Cianobacterias de vida libre, como *Anabaena*, *Nostoc*, etc., que presentan la particularidad de acoplarlo a la Fotosíntesis y la compartimentación celular, para proteger a la nitrogenasa del oxígeno.
3. Algunas bacterias, tipo *Rhizobium*, que lo fijan en simbiosis con plantas del tipo leguminosas, diseñando para ello una estructura peculiar o bacteroide, y un mecanismo molecular de protección ante el oxígeno y de reconocimiento específico planta-bacteria.

c) Reducción respiratoria y/o desnitrificación. El nitrógeno atmosférico fijado se ve compensado por la desnitrificación, proceso que está restringido a unas pocas especies de bacterias facultativas, que pueden utilizar bien O₂ o nitrato como aceptor primario de una cadena

transportadora de electrones para producir energía. Existen unos 60 géneros de bacterias capaces de respirar óxidos de nitrógeno bajo condiciones anaeróbicas, y 2/3 aproximadamente pueden considerarse sólo como estrictamente respiratorias de nitrato (o disimilatorias), produciendo nitrito que excretan al medio. El resto, donde destacan *Pseudomonas* y *Thiobacillus* producen gases nitrogenados, que es lo que realmente caracteriza a la desnitrificación y la distingue de la disimilación de nitrato propiamente dicha (Zumft y Vega 1979).

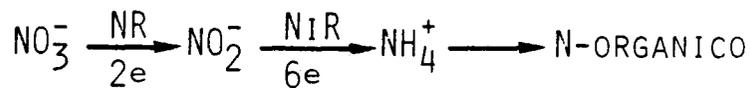
El interés práctico que tiene el estudio de la desnitrificación es la eventual pérdida de fertilidad que puede tener el suelo donde este proceso sea muy activo, y también el impacto ecológico que tienen los óxidos de nitrógeno sobre la capa de ozono. En el aspecto positivo tenemos la depuración de aguas residuales con un alto contenido de compuestos nitrogenados procedentes de la agricultura. Sobre ésto volveremos más adelante.

d) Nitrificación. Es un proceso por el que un determinado número de bacterias oxidan el NH_4^+ formado por la descomposición de la materia orgánica para formar NO_3^- . Se trata, pues, de un proceso aeróbico que produce energía química de enlace (ATP). Las bacterias nitrificantes comprenden las del grupo *nitroso* (*Nitrosomonas*, *Nitrosocistis*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*), que oxidan amoníaco a nitrito, y las del grupo *nitro* (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*) que oxidan el nitrito a nitrato (Zumft y Cárdenas 1979).

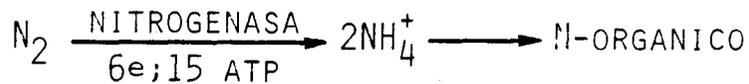
El interés que tiene este proceso para la productividad vegetal es que es tal la actividad de estas bacterias del suelo que cualquier forma nitrogenada que llegue al mismo, procedente de abono o de materia orgánica, se convierte en nitrato, que es la principal fuente de nitrógeno que toman las plantas.

Las principales reacciones que implican las rutas que integran el ciclo del nitrógeno son las siguientes:

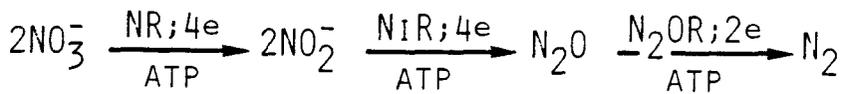
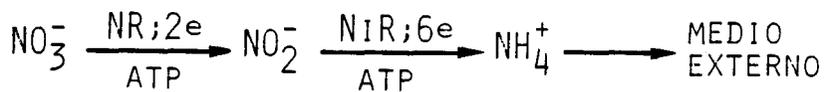
a) Reducción asimilatoria de nitrato



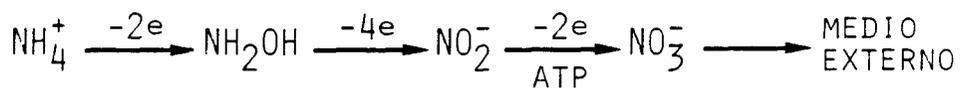
b) Fijación de nitrógeno



c) Reducción respiratoria y/o desnitrificación



d) Nitrificación



4. INMOVILIZACION DE MICROORGANISMOS

La inmovilización de células es el proceso de interacción de éstas con una matriz sólida, de tal forma que no pueden moverse independientemente cuando son colocados en un medio fluído. Puede llevarse a cabo por técnicas físicas, tales como adsorción o atrapamiento en un gel o matriz, o por métodos químicos, como enlace covalente o iónico. Las técnicas de inmovilización de células pueden restringirse a la unión a un soporte, el entrecruzamiento, o el atrapamiento en una matriz. Los requisitos fundamentales que debe reunir un sistema de células fotosintéticas atrapadas son: a) mantenimiento de la viabilidad celular; b) alta densidad celular; c) productividad continuada; y d) estabilidad con baja pérdida celular por parte de la matriz. Adicionalmente el soporte ha de reunir las siguientes características: a) no debe de ser tóxico; b) debe ser transparente; c) estable en un medio líquido; y d) resistente a la ruptura por el crecimiento celular (Mattiasson 1983).

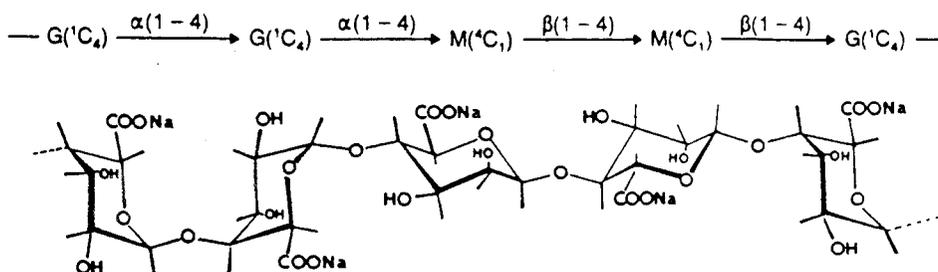
El atrapamiento en geles porosos es, sin duda, el método de inmovilización más estudiado y extendido, pues resulta muy favorable en el caso de células de plantas y algas, ya que no las modifica ni causa daño alguno. Teniendo en cuenta que la luz actúa directamente sobre las células fotosintéticas, la matriz de inmovilización, en estos casos, debe ser razonablemente transparente y porosa, para facilitar la penetración de la luz y los sustratos al interior del gel y concretamente hasta las células ubicadas en los poros del soporte. En la Tabla 1 pueden observarse relacionadas las matrices más utilizadas para el atrapamiento de células de microalgas, así como un ejemplo de sus aplicaciones biotecnológicas (Trevan y Mak 1988).

Dentro de las matrices que permiten el atrapamiento de células fotosintéticas, el alginato proporciona sistemas muy estables, que reúnen todas las características antes mencionadas, facilitando el trabajo en reactores de tipo baño o flujo continuo. En términos moleculares, los alginatos constituyen una familia de copolímeros binarios de β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G), unidos en posiciones 1-4, de amplia variación y secuencia, dependiendo del organismo y el tejido de que son

Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas inmobilizadas

MICROALGA	MATRIZ	APLICACIONES
<i>Chlorella</i>	Agarosa	Biotransformaciones
<i>Dunaliella</i>	Alginato	Glicerol
<i>Euglena</i>	Alginato	Estud. bioquímicos
<i>Anabaena</i>	Alginato, PU, PV	Hidrógeno
<i>Scenedesmus</i>	Carragenato	Consumo N y P
<i>Chlamydomonas</i>	Alginato	Glicolato

aislados. Los alginatos comerciales son principalmente producidos a partir de *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* y *Ascophyllum nodosum*, y en menor extensión, de *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negresceus* y *Sargassum sp.* Su estructura química se muestra a continuación:



Las propiedades funcionales del alginato como matriz de inmovilización se correlacionan fuertemente con la composición y estructura de bloque, dependiendo básicamente de la relación G:M en el polímero. Los residuos G diaxialmente unidos forman cavidades que funcionan como sitios de enlace para cationes (Fig. 2,a), por lo que las propiedades gelificantes dependen de la composición y secuencia del polímero. Cationes divalentes tales como Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} se enlazan preferentemente a bloques de ácido gúlorónico produciendo unidades de más de 20 monómeros, lo que les confiere la capacidad de formar geles ionotrópicos, en los cuales aparecen zonas aptas para el atrapamiento celular (Fig. 2,b). Adicionalmente, las células atrapadas en alginato tienen muchas aplicaciones potenciales en Biotecnología, ya que son preferibles en biorreactores a causa de su alta estabilidad mecánica y porosidad, así como su tolerancia a la sal y agentes quelantes (Smidsrod y Skjak-Braek 1990).

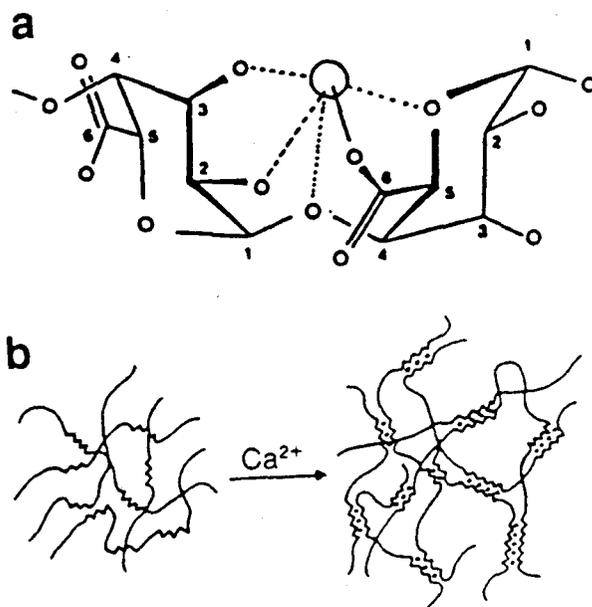


Fig. 2. Interacción de alginato con cationes divalentes. a) Unión de un catión a dos residuos de ácido gúlorónico diaxialmente dispuestos. b) Aspecto del gel ionotrópico.

Las principales ventajas que ofrece el uso de células atrapadas son: a) separación física del biocatalizador y producto obtenido; b) reutilización del biocatalizador; c) uso en reactores de flujo continuo; d) utilización de altas densidades celulares en el reactor; e) preservación de la biomasa frente al medio externo; y f) modificación de las características del biocatalizador, como mayor estabilidad y productividad (Trevan 1980; Rosevear y Lambe 1983).

Estas propiedades tienen carácter general, con la lógica variación en función del sistema célula-soporte utilizado. Generalmente, la facilidad de manejo, la inmediata separación producto-biocatalizador y la gran estabilidad operativa hacen que sean sistemas rentables en su utilización biotecnológica para la obtención de productos de alto valor añadido y en procesos de descontaminación, presentando generalmente mejores rendimientos que los correspondientes sistemas de células libremente suspendidas. Ello ha propiciado que estén actualmente empleándose en todos aquellos proyectos que pretenden aprovechar las numerosas ventajas de las microalgas fotosintéticas (Rao y Hall 1990).

5. N-CONTAMINANTES EN AGUAS

En el marco general de la contaminación de las aguas la problemática originada por los compuestos nitrogenados constituye uno de los capítulos de mayor interés. Ello se justifica en razón del elevado número de acuíferos en explotación afectados, que aumentan progresivamente debido, entre otros factores, a la creciente y persistente acción de una serie de focos contaminantes, relacionados con ciertas actividades industriales, agrícolas y de gestión de residuos de origen urbano. El resultado es un incremento de la presencia de compuestos nitrogenados en el agua, que en ocasiones alcanza niveles que entrañan un riesgo sanitario para la población. Esta pérdida de aptitud para el consumo genera a su vez diversos problemas de índole económico y social, puesto que supone la inhabilitación del recurso en uno de sus usos más importantes (Fernández et al. 1989).

La contaminación de las aguas se define como un proceso de alteración de su calidad natural, que provoca la pérdida parcial o total de su capacidad respecto al uso al que estaban destinadas. Atendiendo a su origen y distribución espacial, se distinguen dos tipos principales de fuentes de contaminación: puntual y dispersa. El primer caso se asocia generalmente a actividades de origen industrial y urbano (vertido de residuos, lixiviación de vertederos, etc.), mientras en el segundo la actividad agrícola es la principal protagonista. De acuerdo con este esquema, los aportes de nitrógeno al agua podrían resumirse como sigue:

- a) nitrógeno de origen atmosférico, que en zonas industriales resulta especialmente importante.
- b) efluentes procedentes de diversas actividades industriales que, a través de un vertido inadecuado, pueden entrar en contacto con el agua.
- c) aguas residuales urbanas, incorporadas a cauces superficiales, ríos, o directamente al suelo, con o sin tratamiento previo.
- d) lixiviados procedentes de vertederos de residuos sólidos urbanos.
- e) efluentes de carácter orgánico originados por las explotaciones ganaderas intensivas.
- f) aplicación de fertilizantes, que genera un volumen de nitrógeno residual no asimilado por las plantas, que se filtra hasta cauces subterráneos.

Si bien las fuentes de contaminación de naturaleza puntual pueden ejercer un intenso y localizado impacto sobre áreas concretas, las prácticas de abonado y riego constituyen, desde el punto de vista de volumen y amplitud de distribución, el elemento causal más importante de esta problemática (Fernández et al. 1989).

La formación de nitrito en el agua potable puede deberse a dos tipos de mecanismos potenciales: químicos o microbiológicos. La formación química de nitrito se produce por oxidación de amonio o reducción de nitrato:



No hay evidencias que sugieran que, en la práctica, el nitrito provenga de un proceso puramente químico, máxime cuando existen muchas bacterias en el agua capaces de producirlo. Es más, si se encuentran altas concentraciones de nitrito en el agua, ello parece deberse en la mayoría de los casos a la acción de bacterias y hongos que poseen la capacidad para colonizar y formar biofilms de poblaciones microbianas mixtas que actúan sobre los materiales usados en la fabricación de las conducciones de aguas (Keevil et al. 1989; MacKerness y Keevil 1991). Además, los biofilms formados pueden actuar como protectores de las coliformes ante la presencia de agentes desinfectantes, por lo que parece evidente que la formación de biofilms compromete seriamente la eficacia de biocidas de uso muy extendido (LeChevalier et al. 1988). Teniendo en cuenta que el nitrito producido deteriora la calidad del agua incluso más que la contaminación microbiana misma, es actualmente muy interesante y al mismo tiempo urgente el diseño de sistemas de eliminación de nitrito en el agua, en tanto en cuanto la eliminación de biofilms parece, por el momento, un problema de difícil solución a corto plazo, por la necesidad de emplear biocidas muy específicos y por la variedad de microorganismos que los forman.

Diversos estudios epidemiológicos y clínicos han puesto de manifiesto que la principal manifestación tóxica derivada de la ingestión de nitratos y nitritos en agua potable es la metahemoglobinemia. El ión nitrito oxida el hierro ferroso de la hemoglobina al estado férrico, dando lugar a la formación de metahemoglobina, la cuál es incapaz de fijar el oxígeno y, en consecuencia, de transportarlo hacia los tejidos (Newsholme y Leech 1986). La primera manifestación clínica es la cianosis, con aparición de una tonalidad azulada característica de la piel, y a medida que aumenta el porcentaje de metahemoglobina aparecen signos de anoxia, hasta producir coma en las proximidades de la concentración letal. Si bien los adultos poseen un sistema enzimático capaz de convertir rápidamente la metahemoglobina en oxihemoglobina, éste no se encuentra completamente

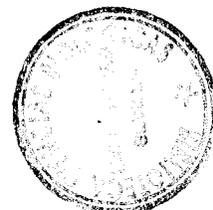
desarrollado en los lactantes de edad inferior a tres meses, por lo que este sector de la población es el más expuesto a los efectos de la ingestión de nitratos o nitritos en el agua. Aunque no se dispone aún de datos fidedignos, se ha llegado también a apuntar la posibilidad de que nitratos y nitritos puedan actuar como precursores de ciertas sustancias carcinógenas, tales como nitrosaminas y nitrosamidas (Gilvery y Goldstein 1986).

La presencia de altos niveles de nitrógeno inorgánico en vertidos urbanos, industriales, agrícolas y ganaderos constituyen actualmente un grave problema en el tratamiento de aguas (Wijffels et al. 1990), que afecta directamente a la calidad de éstas, sobre todo en usos domésticos o industriales. En el caso concreto del nitrito, su ingestión es baja, comparada con la del nitrato, y ciertos alimentos como carnes curadas y algunas raíces vegetales aportan en el consumo cantidades de nitrito mucho mayores que las del agua potable. Recientemente, la legislación europea (EC Directive 80/778/EEC) ha establecido como máximas concentraciones en el agua doméstica 50 mg/l para el nitrato y 0,1 mg/l para el nitrito. En la Tabla 2 se recogen los datos correspondientes a las cantidades medias de ingestión de nitritos en distintos países.

Tabla 2. Cantidades medias de ingestión de nitrito en distintos países

Pais	Consumo nitrito	Referencia
Alemania Federal	0,022	1
Noruega	0,0024	2
Estados Unidos	0,054	3
Suecia	0,08	4
Holanda	0,097	5

Las referencias indicadas son las siguientes: 1 Sander (1971); 2 Höyem (1974); 3 White (1976); 4 Jägerstad y Nordén (1976); 5 Stephany y Schuller (1978). Los valores de consumo de nitrito están expresados en moles por persona y día.



El tratamiento de aguas es un problema crucial en la mayoría de los países, y frecuentemente los tratamientos primario y secundario no son suficientes para eliminar los compuestos de nitrógeno inorgánico y fosfatos presentes en el agua. Varios procesos se han propuesto para la eliminación de compuestos nitrogenados mediante los citados tratamientos, empleando sistemas que pueden ser biológicos, químicos o físicos. Su eficacia es altamente variable al igual que su costo. Los tratamientos terciarios convencionales dan lugar muchas veces a diversos tipos de contaminación secundaria. En este contexto, los procesos biotecnológicos presentan algunas ventajas: además de emular ecosistemas naturales, son limpios para el medioambiente, ya que muchos utilizan la energía solar y no causan contaminación secundaria. Además, en el caso de las microalgas, éstas eliminan de forma eficiente ciertos nutrientes como compuestos nitrogenados y de fósforo causantes de problemas de eutrofización, con lo que son interesantes para el desarrollo de tratamientos terciarios en la descontaminación de efluentes (de la Noüe y de Pauw 1988; Laliberté et al. 1992).

Según los datos obtenidos por el Instituto Tecnológico Geominero de España en el año 1987 sobre la calidad del agua en el país, medida en función de su contenido en nitrógeno inorgánico (nitrato, nitrito y amonio), se pueden deducir las siguientes consideraciones:

a) en Andalucía, la tendencia es hacia un deterioro de la calidad del agua, exceptuando algunos puntos de la cuenca del Guadalquivir donde se observa una cierta estabilidad. Las concentraciones de nitrógeno determinadas se encuentran, en muchos casos, por encima de 50 mg/l, alcanzando valores extremos comprendidos entre 500 y 700 mg/l. Lo mismo sucede en la vertiente mediterránea, desde Murcia hasta Tarragona.

b) la zona centro de la península presenta una tendencia a la mejora en la evolución de la calidad del agua, manteniendo un valor medio inferior a 50 mg/l, si bien en bastantes puntos se detectaron concentraciones superiores, aunque en general no se apreciaron valores superiores a 400 mg/l.

c) en la zona norte se detectaron muy pocos puntos que presentaran concentraciones superiores a 50 mg/l, siendo la estabilidad y mejora de la calidad la tendencia de la evolución.

A la vista de estos datos, resulta evidente la necesidad perentoria de afrontar en nuestra región proyectos a gran escala de prevención y tratamiento de dicha contaminación acuosa. En este contexto, puede ser de relevancia el papel que desempeñan en dicho campo los sistemas biológicos como biocatalizadores de especies químicas que contaminan los recursos hídricos.

6. BIOTECNOLOGIA DE MICROORGANISMOS EN LA DEPURACION DE N-CONTAMINANTES

Entre las ventajas que presenta el uso biotecnológico de las microalgas, puede mencionarse que utilizando una fuente abundante y barata de energía, como es la luz solar, producen una biomasa a priori útil para la alimentación animal (Soeder y Binsack 1978) o la obtención de productos de alto valor añadido (Aaronson et al. 1980; Metting 1986). Además, dadas las facilidades que ofrecen a la hora de su recolección, muchos investigadores han recurrido al uso de microalgas filamentosas, especialmente algas verde-azuladas como *Spirulina* (Gauthier et al. 1985) o *Phormidium* (Talbot et al. 1988). Normalmente las microalgas inmovilizadas se han utilizado con objetivos más directamente relacionados con la producción de compuestos químicos y/o biomasa, pero poco se ha estudiado acerca de sus posibilidades en el tratamiento de aguas, tan sólo algunos trabajos se han publicado en este sentido por Chevalier y de la Noüe (1985 a,b) utilizando *Scenedesmus*, o por Garbisu et al. (1991) con *P. laminosum*.

La capacidad que poseen microorganismos fotosintéticos, como microalgas eucarióticas, de asimilar nitrógeno, preferentemente como nitrato, nitrito o amonio, permitiría definir sistemas potencialmente útiles para la eliminación biológica de estos compuestos, empleando dichas

microalgas como biocatalizadores. Por otra parte, las ventajas que ofrece la inmovilización en el uso y estabilidad celular, así como el creciente avance en el diseño de biorreactores, han estimulado el desarrollo de sistemas biológicos para el tratamiento de este tipo de contaminación medioambiental. En este trabajo hemos estudiado el consumo de nitrito por células de *C. reinhardtii* inmovilizadas en alginato cálcico, con la idea de obtener un sistema biológico que sea eficaz en el tratamiento de influentes contaminados por dicho ión.

La nitrificación es un proceso problemático dentro del tratamiento de aguas residuales debido a la lenta velocidad de crecimiento de los organismos nitrificantes (Wijffels y Tramper 1989). Las principales especies dentro de este grupo son *Nitrosomonas europaeae* y *Nitrobacter agilis*, que sucesivamente oxidan amonio a nitrito y nitrato. Como ya se ha comentado anteriormente, las bacterias nitrificantes realizan su actividad utilizando oxígeno en las reacciones de oxidación de la fuente nitrogenada. Teniendo en cuenta la alta capacidad de algunos de estos microorganismos para la transformación de compuestos nitrogenados, sería de indudable interés profundizar en el estudio, poco abordado hasta el momento, del tratamiento de aguas mediante sistemas inmovilizados que contengan células de microorganismos fotosintéticos, productores de oxígeno, y células nitrificantes, que lo demandan para realizar su actividad.

Algunos trabajos se han desarrollado ya en esta línea, como la inmovilización de algas y bacterias para la producción de amilasa (Chevalier y de la Noüe 1988), alcohol (Mücke y Hartmeier 1985) e hidrógeno (Kayano et al. 1981). Además buenas revisiones sobre procesos de co-inmovilización han sido publicadas (Hahn-Hagerdal 1983).

7. USO DE BIORREACTORES EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS

Un biorreactor es un recipiente en el que tiene lugar una reacción catalizada por enzimas o células, libres o inmovilizadas, y en el que existen distintos sistemas para la toma de muestras y control de la reacción. Realiza

un proceso a partir de unos reactivos en un tiempo dado y con un mínimo coste y, a diferencia de los reactores químicos, opera a baja presión y temperatura. Se clasifican de acuerdo a su contenido, que puede ser homogéneo en aquellos casos en los que existe una sola fase, o heterogéneos en donde tiene lugar más de una fase, lo que ocurre a menudo con el sustrato, que está en forma líquida, y el biocatalizador inmovilizado, que es sólido. También se pueden clasificar según funcionen por "carga" o de manera continua, o bien si son cerrados o abiertos, es decir, si el catalizador sale del reactor o no (Cheetham 1986).

El desarrollo de biorreactores empleando células inmovilizadas de distintos microorganismos, especialmente microalgas, ha sido notable en los últimos años, ya sea con fines productivos (Venkatasubramanian y Karkare 1983; Ramakrishna et al. 1988; Spalding 1991), o bien aplicándolas al tratamiento de aguas residuales para eliminar distintos contaminantes, como nitrógeno inorgánico (Sumino et al. 1987,1992) u otros productos que afectan a la calidad del agua como metales (Barkley 1991; Rai y Mallick 1992; Dvorak et al. 1992). Son más abundantes los estudios del tratamiento de aguas residuales con células de microalgas libremente suspendidas (Kilani 1992; Aziz y Ng 1992; Travieso et al. 1992), aunque la inmovilización, por sus especiales ventajas, es la herramienta más prometedora en el diseño de este tipo de sistemas. En estudios previos se ha mostrado que las bacterias nitrificantes pueden ser retenidas en biorreactores de flujo continuo por inmovilización en un gel, manteniendo intacta su capacidad nitrificante (Wijffels y Tramper 1989).

Un objetivo de nuestro trabajo ha sido también sondear la potencial utilidad de células de *C. reinhardtii*, inmovilizadas por atrapamiento en alginato, en la configuración y funcionamiento de sistemas de depuración de aguas residuales en biorreactores. Los resultados obtenidos en los procesos separados de eliminación de nitrito en dichos sistemas por células de *C. reinhardtii* (alga verde) y *N. agilis* (bacteria nitrificante) inmovilizadas por atrapamiento en geles, demuestran la utilidad potencial que tendría la co-inmovilización de ambos tipos de microorganismos en el tratamiento de aguas contaminadas por nitrógeno inorgánico.

II Materiales y Métodos

1. ORGANISMOS EMPLEADOS

En la realización de este trabajo se han utilizado las estirpes silvestre 21 gr del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 3) y la ATCC 14123 de la bacteria nitrificante *Nitrobacter agilis*, obtenida de la colección del Departamento de Ciencias de los Alimentos, de la Agricultural University de Wageningen (Holanda).

2. CONDICIONES DE CULTIVO

Las células de *C. reinhardtii* se cultivaron en medio líquido, utilizando recipientes de vidrio de 0,2 a 1 l situados en una cámara climatizada a 25°C, manteniendo la asepsia y bajo iluminación continua con luz blanca fluorescente, de una potencia de 50 W/m² en la superficie de los cultivos (Fig. 4). El medio líquido empleado para el crecimiento celular fue el previamente descrito por Sueoka et al. (1967), cuyo contenido por litro es el siguiente: K₂HPO₄, 1,44 g; KH₂PO₄, 0,72 g; MgSO₄·7H₂O, 0,06 g; CaCl₂·2H₂O, 0,02 g y 5 ml de una disolución que contiene trazas de algunos elementos y que se preparó según describieron Hutner et al. (1950). La composición por litro de dicha disolución es la que sigue: H₃BO₃, 2,28 g; ZnSO₄·7H₂O, 4,4 g; MnCl₂·4H₂O, 1,02 g; FeSO₄·7H₂O, 1,00 g; CoCl₂·6H₂O, 0,32 g; CuSO₄·5H₂O, 0,32 g y (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0,22 g. El pH del medio así preparado fue de 7,2. El suministro de carbono al cultivo celular se realizó haciendo pasar por el mismo una corriente de aire

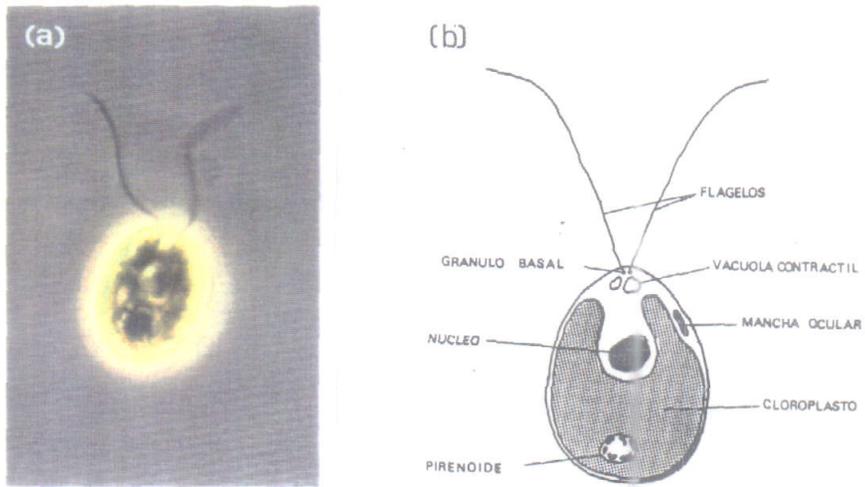


Fig. 3. Alga verde unicelular *C. reinhardtii*. a) Fotografía al microscopio óptico (100 aumentos). b) Dibujo esquemático de la célula mostrando sus principales características.

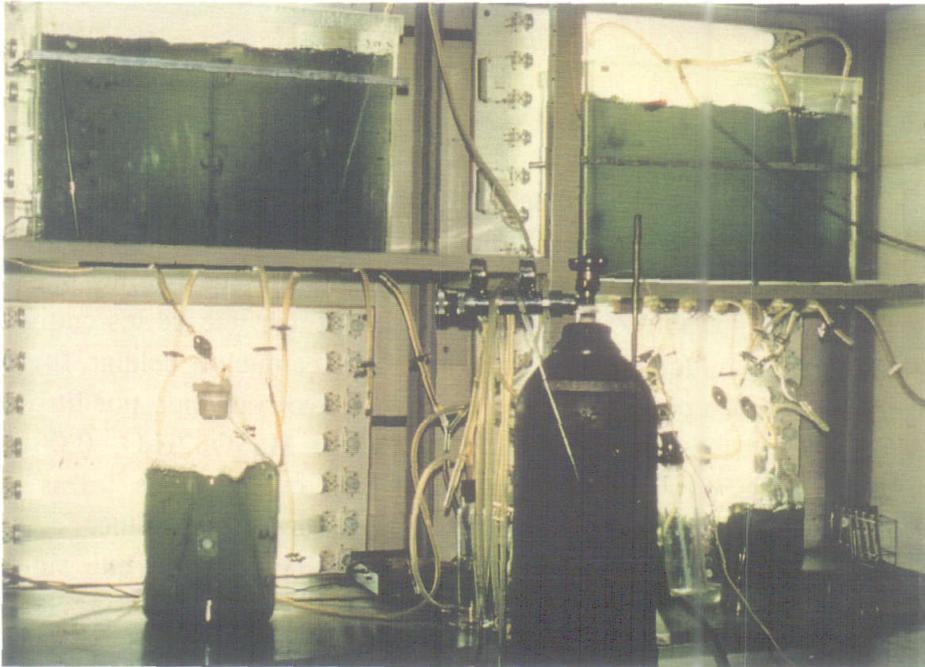


Fig. 4. Instalación utilizada para el cultivo de *C. reinhardtii* en condiciones fotoautotróficas.

enriquecida con un 5% (v/v) de CO₂. Como fuentes de nitrógeno se añadieron al medio de cultivo KNO₃ 10 mM, KNO₂ 6 mM, o NH₄Cl 10 mM. Bajo las condiciones de crecimiento descritas, el tiempo de generación observado para las células de *C. reinhardtii* fue de 8 h, aproximadamente. Para realizar el recuento de células, se tomó 1 ml de cultivo, conteniendo entre 200.000 y 500.000 células, se adicionaron 25 µl de etanol absoluto, se agitó y colocó, con ayuda de una micropipeta, una alícuota de la preparación en la cámara de Neubauer. La observación al microscopio óptico reveló un número de células N, que permitió el cálculo de la concentración celular en la muestra, mediante la siguiente operación:

$$n^{\circ} \text{ células/ml} = N / (6,25 \times 10^{-5})$$

Las células de *C. reinhardtii* se conservaron en tubos que contenían medio estéril sólido, obtenido suplementando el medio de cultivo estándar, previamente descrito, con Bacto-agar DIFCO al 2% (p/v), calentando a 100°C y enfriando posteriormente hasta su solidificación en forma de gel. Después de la inoculación, los cultivos en medio sólido se mantuvieron intensamente iluminados durante tres o cuatro días, y posteriormente se conservaron en luz difusa. A partir de dichos cultivos se inocularon nuevos medios sólidos, frescos y estériles, cada tres meses. La axenia se conseguía esterilizando el medio y recipientes correspondientes en un autoclave SELECTA durante 20 min a 1 atm de sobrepresión (120°C).

Por su parte, las células de *N. agilis* se crecieron igualmente en medio líquido, utilizando recipientes de vidrio de 1 l de capacidad, situados en una cámara climatizada a 35°C. El medio de cultivo empleado fue el previamente descrito por Tramper y de Man (1986) y contenía, por litro, los siguientes componentes: MgSO₄, 0,21 mmol; NaH₂PO₄·2H₂O, 1,2 mmol; Na₂HPO₄·2H₂O, 10 mmol; Na₂MoO₄, 1 µmol; ZnSO₄, 0,015 µmoles; CuSO₄, 0,016 µmoles y CaCl₂, 5 µmoles. El suministro de carbono al cultivo celular se realizó suplementando el medio con NaHCO₃, a razón de 0,02 moles por cada mol de NaNO₂ adicionado, que servía de fuente nitrogenada a una concentración de 15 mM. Las células de *N. agilis* se crecieron en frascos estériles de 1 l y, bajo las condiciones señaladas, el

tiempo de generación observado fue de 30 h.

La conservación de las células se realizó inoculando placas de Petri que contenían medio sólido, preparado con medio de cultivo suplementado al 2% (p/v) con agar, según vimos en el caso de las microalgas. Las células se refrescaban cada mes por transferencia a nuevas placas de cultivo.

3. PERMEABILIZACION DE CELULAS DE *C. reinhardtii*

Para medir actividades enzimáticas *in situ* se tomaron alícuotas de 1 ml del correspondiente cultivo, conteniendo unos 20 μg de Chl, y se centrifugaron a 3.000 g durante 5 min, se lavaron dos veces con 5 ml de tampón MES 25 mM (pH 6,3), y se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón conteniendo 0,1 ml de tolueno. Se agitaron vigorosamente durante 1 min y la suspensión resultante de células permeabilizadas se utilizó como fuente de enzima.

4. TECNICAS DE INMOVILIZACION CELULAR

4.1. Atrapamiento en alginato cálcico o bórico

Células de *C. reinhardtii*, crecidas en condiciones estándar, se recogieron por centrifugación a 5.000 g durante 5 min, se lavaron con medio de cultivo tamponado con Tricina-NaOH 20 mM (pH 8,0) y se resuspendieron en dicho medio en la relación p/v necesaria para obtener la concentración de clorofila deseada, normalmente entre 20 y 150 $\mu\text{g/g}$ gel.

Se preparó una disolución al 6% (p/v) de alginato, según se ha descrito por Vélchez et al. (1991), disolviendo 4 g de ácido algínico (viscosidad de 250 cps en disolución acuosa al 2%) en 100 ml de tampón Tricina-NaOH, 20 mM (pH 8,0), ajustando el pH de la disolución con sosa al 10% en el intervalo 6,5-7,5. A continuación, y manteniendo una agitación vigorosa, se le añadieron lentamente 2 g de alginato sódico (viscosidad de

3.500 cps en disolución acuosa al 2%), permitiendo la homogenización del medio durante 10 min. La disolución así formada presentó una viscosidad de 6.000 cps, y se guardó cerrada y en frío durante 4 h para facilitar la eliminación del aire retenido como consecuencia de la agitación.

El proceso de inmovilización celular se llevó a cabo por gelificación ionotrópica de la forma que se muestra en la Figura 5. Una mezcla de la suspensión celular y la disolución de alginato sódico, en proporción 1:1, se goteó, con ayuda de una jeringa provista de una aguja de 0,9 mm de orificio, sobre una disolución de CaCl_2 ó BaCl_2 , 100 mM. El contacto de las gotas con el medio rico en ión calcio o bario provocó la formación de un tipo de perla de alginato cálcico o bórico de 2 mm de diámetro, las cuales se agitaban suavemente en dicho medio durante 30 min para facilitar su consistencia física. Dichas perlas se recuperaron sobre papel de filtro con embudo Büchner, lavándolas hasta tres o cuatro veces con tampón Tricina-NaOH 20 mM (pH 8,0) con objeto de eliminar el exceso del ión salino. Para su conservación, las perlas se resuspendieron en una mezcla 1:1 (v/v) del tampón indicado y una disolución de CaCl_2 o BaCl_2 , 10 mM, y se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C) o en frío (4°C) hasta su uso. El tiempo de almacenamiento nunca fue superior a 2 h, salvo para realizar experimentos sobre la estabilidad del sistema.

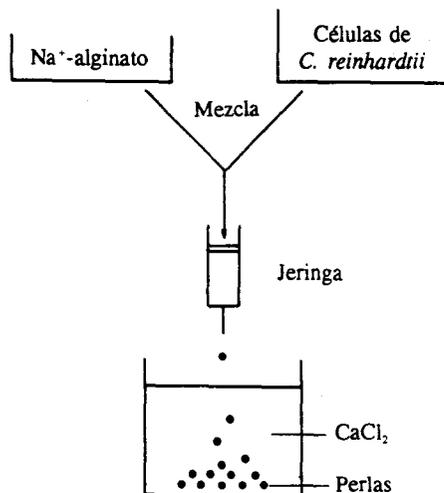


Fig. 5. Esquema del método utilizado para la inmovilización de células de *C. reinhardtii* por atrapamiento en alginato cálcico. La mezcla 1:1 de la suspensión celular y de la disolución de alginato, se gotea con ayuda de una jeringa (aguja de 0,8 mm de diámetro) sobre una disolución de Cl_2Ca 100 mM.

4.2. Atrapamiento en agar

Para proceder a la inmovilización de células en este soporte sólido, se obtuvo una suspensión de *C. reinhardtii* según se indicó anteriormente. La preparación del soporte se realizó a una concentración del 4% (p/v), y para ello se añadieron 4 g de agar a 100 ml de tampón Tricina-NaOH, 20 mM (pH 8,0), y la suspensión se calentó a 100°C. La disolución resultante se enfrió hasta 35°C en un baño termostatzado, y antes de que solidificara se mezcló en proporción 1:1 con la suspensión celular en una campana de flujo laminar, distribuyendo posteriormente la mezcla homogénea en placas de Petri a razón de 10 ml cada una, y permitiendo su enfriamiento hasta solidificación. El gel formado con las células inmovilizadas se fraccionó en pequeños cubos de 1 a 2 mm de arista, que fueron conservados en tampón Tricina-NaOH, 20 mM (pH 8,0), a temperatura ambiente o en frío. Salvo en el caso de estudios de estabilidad, nunca transcurrieron más de 2 h hasta su uso.

4.3. Atrapamiento en carragenato potásico

Células de *N. agilis*, crecidas en condiciones estándar, se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min, se lavaron con medio de cultivo suplementado con NaCl 15 mM y se resuspendieron nuevamente en dicho medio.

La preparación de la disolución de carragenato se realizó al 2,6 %, añadiendo a 100 ml de medio de cultivo estándar 2,6 g de carragenato y calentando la mezcla a 100°C hasta conseguir la disolución total del sólido. Una vez enfriada a temperatura ambiente, quedó lista para su utilización.

La inmovilización celular, al igual que con el alginato, se llevó a cabo mediante un proceso de gelificación ionotrópica (Wijffels et al. 1991), con ayuda de un sistema como el que se muestra en la Figura 6. La disolución de carragenato se mezcló con la suspensión celular en la proporción 1:1, homogeneizándose y procediendo a su goteo sobre una disolución de KCl 750 mM. Para obtener esferas perfectas se aplicó una capa de un disolvente

orgánico (decano) sobre la disolución de KCl, y el goteo se realizó con ayuda de un sistema automático. Se permitió la residencia de las perlas así formadas en la disolución de KCl durante un periodo de 30 min, tiempo necesario y suficiente para que adquiriesen la consistencia adecuada. Posteriormente se recogieron de forma selectiva utilizando tamices con distintos tamaños de poro, que permitieron obtener esferas de 2 mm de diámetro. Las perlas se lavaron varias veces en medio de cultivo estándar, para eliminar el exceso de sal procedente del proceso de inmovilización.

La conservación de las perlas se realizó resuspendiéndolas en medio de cultivo fresco, suplementado con KCl hasta una concentración de 10 mM, y manteniéndolas a temperatura ambiente o en frío hasta su utilización, generalmente antes de 2 h.

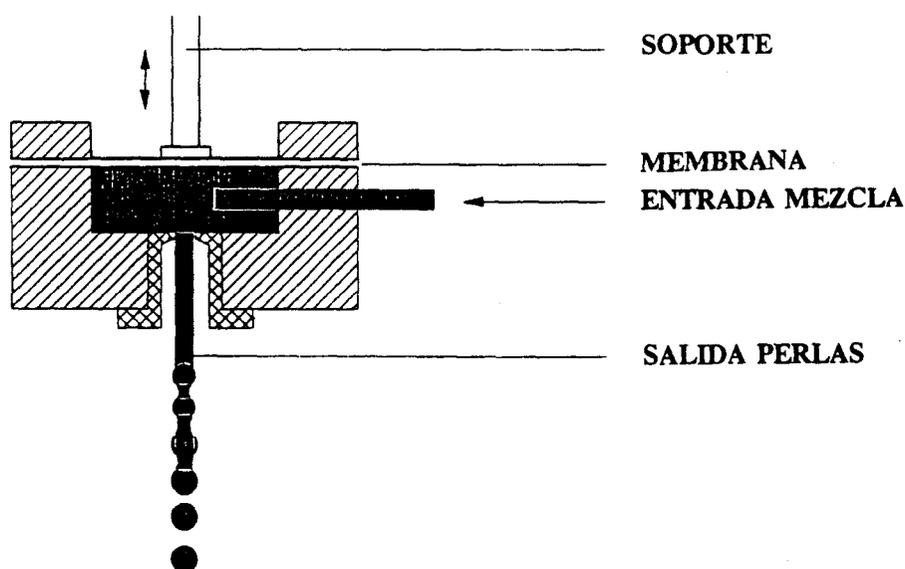


Fig. 6. Esquema del sistema utilizado para la inmovilización de células de *N. agilis* por atrapamiento en carragenato. Dispositivo de membrana empleado para la formación de las gotas.

Se han sugerido varios métodos para valorar el crecimiento de células inmovilizadas, que incluyen la liberación de las mismas al medio de cultivo, determinadas por contaje celular o cantidad de proteína, o alternativamente midiendo el incremento de peso del sistema inmovilizado. En el caso de células inmovilizadas de *N. agilis*, el crecimiento celular se ha determinado en función de la proteína total inmovilizada (Smith et al. 1991).

5. CONDICIONES PARA LA PRODUCCION DE GLICOLATO

5.1. Células libres

Células de *C. reinhardtii*, cultivadas en medio líquido con KNO_3 10 mM como fuente de nitrógeno, se recogieron por centrifugación a 5.000 g durante 5 min, se lavaron en medio de cultivo tamponado con Tricina-NaOH 20 mM (pH 8,0) y se resuspendieron en el mismo hasta una concentración de clorofila igual a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Posteriormente se añadió al cultivo 1 mM de AOA, con objeto de inhibir las transaminasas, provocando de esta forma la excreción de glicolato al medio. La preparación celular resultante se incubó a 25°C en recipientes de vidrio de 25 a 250 ml de capacidad, y se iluminó continuamente con luz blanca fluorescente a 50 W/m^2 , burbujeándola con una corriente de aire cuyo contenido en CO_2 (0,033%) sirvió como única fuente de carbono para las células. En algunos experimentos dicha corriente de aire se suplementó con proporciones variables de CO_2 , entre 0,1% y 1,0% (v/v), empleando para ello medidores de flujo de distinto caudal.

En los procesos de fotoproducción discontinua de glicolato, después de las primeras 12 h de excreción, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con medio de cultivo tamponado con Tricina-NaOH 20 mM (pH 8,0) y posteriormente se resuspendieron en dicho medio suplementado con KNO_3 10 mM y en ausencia de AOA. La preparación resultante se incubó a 25°C bajo las condiciones de iluminación anteriormente detalladas, y se burbujeó con una corriente de aire suplementada con un 5% de CO_2 (v/v). Después de 12 h de tratamiento en

alto CO₂, las células se recogieron y prepararon para un nuevo periodo de excreción de glicolato de 12 h, en idénticas condiciones a las inicialmente descritas a tal efecto.

5.2. Células inmovilizadas en alginato cálcico

Perlas de alginato cálcico conteniendo células de *C. reinhardtii* (40 µg Chl/g de gel), se resuspendieron al 10 % (p/v) en medio de cultivo tamponado con Tricina-NaOH 20 mM (pH 8,0), y suplementado con KNO₃ 10 mM como fuente de nitrógeno y AOA 1 mM. La preparación resultante se incubó en las mismas condiciones de temperatura, luz y carbono que se detallaron para el caso de las células libres.

En los procesos de fotoproducción discontinua de glicolato, las perlas se recogieron sobre papel de filtro después de 12 h de excreción, se lavaron con medio de cultivo tamponado con Tricina-NaOH 20 mM (pH 8,0) y se resuspendieron en el mismo en la relación del 10% (p/v) antes citada. El medio se suplementó con KNO₃ 10 mM, incubándose durante 12 h en las mismas condiciones de temperatura, luz y carbono que para las células libres y en ausencia de AOA. Después de este periodo, las perlas se recogieron, lavaron y prepararon nuevamente para excretar glicolato en las condiciones detalladas anteriormente.

6. CONDICIONES PARA EL CONSUMO DE NITRITO

6.1. Células libres

Células de *C. reinhardtii*, crecidas en condiciones estándar con KNO₃ 6 mM como fuente de nitrógeno, se recogieron por centrifugación a 5.000 g durante 5 min, se lavaron en medio de cultivo y se resuspendieron en el mismo hasta una concentración de clorofila de 30 µg/ml, y posteriormente se incubaron según las condiciones requeridas en los distintos experimentos realizados.

6.2. Células inmovilizadas en alginato cálcico

Células de *C. reinhardtii* crecidas en condiciones estándar con KNO_3 6 mM como fuente de nitrógeno, se recogieron por centrifugación a 5.000 g durante 5 min, se lavaron con medio de cultivo tamponado con Tricina-NaOH 20 mM (pH 7,5) y se resuspendieron en el mismo hasta una concentración de clorofila de 100 $\mu\text{g/ml}$. La preparación celular se inmovilizó en alginato cálcico según se detalló anteriormente y las perlas obtenidas se resuspendieron al 10% (p/v) en el medio de cultivo antes mencionado, que además contenía CaCl_2 10 mM. La suspensión de células inmovilizadas se incubó entonces según las condiciones requeridas en cada experimento.

Para los estudios de consumo de nitrito en un reactor tipo airlift operando en modo discontinuo, las células inmovilizadas se incubaron a 25°C, bajo iluminación continua con luz blanca fluorescente (50 W/m^2) y se mantuvieron en suspensión mediante una corriente de aire suplementada con un 5% CO_2 , aplicada desde la base del reactor. El sistema permaneció en estas condiciones hasta el consumo total del nitrito del medio.

Para los estudios de consumo de nitrito en un reactor tipo airlift de flujo continuo, las células inmovilizadas se incubaron en las mismas condiciones de temperatura, luz y carbono del reactor discontinuo, pero manteniendo un flujo de entrada del mismo medio de incubación en el reactor de 90 ml/h.

6.3. Células inmovilizadas en carragenato potásico

Células de *N. agilis* crecidas en condiciones estándar e inmovilizadas posteriormente en carragenato potásico se resuspendieron al 10% en medio de cultivo y se situaron en un reactor tipo airlift de flujo continuo, de 3 l de capacidad. El reactor se alimentaba con medio fresco de cultivo a un flujo de 3,2 ml/min y se burbujeó con aire enriquecido al 50% (v/v) con oxígeno (0,12 mM). El medio de cultivo, cuya composición se detalló anteriormente, contenía además KCl 5 mM, y el pH se ajustó hasta 7,8 con una disolución de KOH 2 N. Las incubaciones se realizaron a 30°C y

en oscuridad para prevenir efectos de inhibición por luz.

7. DETERMINACIONES ANALITICAS

7.1. Clorofila

En células libres se determinó por el método descrito por Arnon (1949). Una alícuota de 1 ml de cultivo con una cantidad de clorofila entre 10 y 30 μg se calentó en un baño a 100°C durante 1 min. A continuación se adicionaron 4 ml de acetona comercial, agitando durante 10 s para facilitar la extracción de la clorofila. La preparación se centrifugó a 5.000 g durante 5 min, midiendo en el sobrenadante la absorbancia a 652 nm ($\epsilon = 34,5$ ml/mg.cm).

Por su parte, la clorofila en las células inmovilizadas se determinó como se ha descrito por Vílchez et al. (1991). Una muestra de 0,3 g de perlas de alginato cálcico conteniendo células con una cantidad de clorofila entre 10 y 30 μg se resuspendió en 3 ml de metanol, y se calentó a 60°C en un baño termostatzado durante 20 min. La absorbancia a 665 nm ($\epsilon = 0,076$ ml/mg.cm), se determinó en la fase soluble obtenida. En el caso de células inmovilizadas en gel de agar, la clorofila se determinó de forma análoga.

7.2. Proteína

La proteína se determinó de manera rutinaria por el método de Bradford (1976), añadiendo a 0,1 ml de muestra 1 ml de reactivo de azul de Coomassie, y después de 10 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 595 nm, $\epsilon = 51$ ml/(mg.cm). El calibrado del método se realizó con una disolución de seroalbúmina al 0,2 % (p/v), cuya concentración exacta se determinó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción a 279 nm, $\epsilon = 0,67$ ml/(mg.cm) (Rideal y Roberts 1951). El reactivo se preparó disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G en 50 ml de etanol al 95 % (v/v) y añadiendo posteriormente 100

ml de ácido fosfórico al 85 % (p/v) y completando con agua destilada hasta 1 l. El reactivo se filtraba antes de utilizarse.

Para la determinación de proteína en células inmovilizadas en carragenato potásico, las muestras, conteniendo unas 150 perlas, se colocaron en recipientes de vidrio de 50 ml, se congelaron a -18°C , y posteriormente se desecaron a vacío en un liofilizador durante dos días, a -60°C y una presión de 50-100 mbar. Después de este tratamiento, se añadieron a cada muestra 2 ml de agua destilada, tapándolas seguidamente con papel de aluminio. Las perlas de carragenato se rompieron entonces por tratamiento en microondas durante 30 s, y para liberar la proteína, 0,5 ml de cada suspensión resultante se mezclaron con 0,5 ml de NaOH 1 N, se taparon los tubos con bolas de cristal para evitar la pérdida de agua, y se calentaron a 100°C durante 30 min. Cuando las muestras así tratadas se enfriaron hasta temperatura ambiente, se determinó la proteína por el método de Bradford, según se ha descrito con anterioridad.

7.3. Glicolato

Se determinó mediante el método descrito por Calkins (1943) y que se detalla seguidamente. A una muestra que contenía entre 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de glicolato se le adicionó igual volumen de H_2SO_4 4 N, y una alícuota de 0,2 ml de la mezcla resultante se trató en un tubo de ensayo con 2 ml de una disolución al 0,01 %, en sulfúrico concentrado, de 2,7-dihidroxinaftaleno, manteniendo la preparación en frío durante la adición del reactivo. La disolución resultante se calentó a 100°C durante 20 min, y después de su enfriamiento a temperatura ambiente, se añadieron 2 ml de H_2SO_4 2 N, agitando vigorosamente y midiendo la absorbancia a 530 nm después de 10 min, para que se desarrollara el color ($\epsilon = 0,75 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

7.4. Amonio

La concentración de amonio se determinó mediante el método del fenol-

hipoclorito (Solorzano 1969). A una muestra de 1,6 ml (conteniendo de 0 a 100 nmoles de amonio) se le añadieron, en el orden indicado, 0,2 ml de fenol al 10 % (p/v) en etanol absoluto, 0,2 ml de disolución de nitroprusiato sódico al 0,5 % (p/v) en agua destilada y 0,5 ml de una disolución oxidante, recientemente preparada. Tras agitación vigorosa, la mezcla de reacción se mantuvo en la oscuridad durante 2 h y posteriormente se midió la absorbancia a 640 nm ($\epsilon = 15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La disolución oxidante se preparó mezclando 20 volúmenes de una disolución alcalina estable (20 g de citrato trisódico dihidrato y 1 g de hidróxido sódico por cada 100 ml de agua destilada).

7.5. Nitrito

Se determinó por el método descrito por Snell y Snell (1949), basado en una determinación colorimétrica posterior a la reacción de diazotación de Griess-Illosway. Para ello, a 1 ml de muestra conteniendo una cantidad entre 10 y 60 nmoles de nitrito, se añadieron 1 ml del reactivo de sulfanilamida y 1 ml del reactivo de N-naftil-1-etilendiamina. El primero se preparó al 1% en HCl 2,5 M, y el segundo al 0,02% (p/v) en agua destilada. Después de 15 min, se midió la absorbancia a 540 nm ($\epsilon = 53 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

7.6. Nitrato

Para la determinación de nitrato en medio de cultivo cuando se realizaron experimentos con células de *N. agilis*, se siguió el método descrito por Greenberg et al. (1985), que utiliza un analizador automático de muestras. Como dicho medio de cultivo contiene habitualmente nitrato y nitrito, inicialmente cuantificábamos el nitrito presente, y posteriormente una alícuota de 2 ml, conteniendo entre 5 y 20 ppm de nitrato, se pasó primero por una columna que contenía un catalizador a base de Cd y Cu para la reducción estequiométrica del nitrato presente hasta nitrito. El

nitrito total resultante se determinó colorimétricamente y el nitrato se obtuvo por diferencia entre este dato y el obtenido previamente para el nitrito.

8. DETERMINACION DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

8.1. Actividades fotosintética y respiratoria

La determinación de oxígeno para la evaluación de estas actividades en células de *C. reinhardtii* se llevó a cabo con un electrodo de tipo Clark de Pt/AgCl, utilizando para el oxígeno un coeficiente de solubilidad de 0,253 $\mu\text{moles/ml}$, a 25°C. En la cámara de reacción se colocó una alícuota de 1 ml de cultivo, en el caso de células libres, ó 10 perlas de alginato cálcico o bórico en el caso de células inmovilizadas, y la evolución de oxígeno se siguió a 25°C mediante un registrador tipo Linseins. La actividad respiratoria se determinó midiendo el consumo de oxígeno en la oscuridad. Posteriormente, la cámara del electrodo se iluminó con una lámpara de tungsteno que suministraba alrededor de 200 W/m² en la superficie, y la cinética de desprendimiento de oxígeno obtenida es el resultado del funcionamiento simultáneo de la fotosíntesis y la respiración celular. La actividad fotosintética propiamente dicha resulta de sumar a la pendiente de la recta obtenida en este último caso, la pendiente correspondiente a la actividad respiratoria previamente calculada.

8.2. Actividad nitrificante

Células libres

Una alícuota de 300 ml de efluente procedente del biorreactor (tipo airlift loop) conteniendo células de *N. agilis* se centrifugó a 16.000 g durante 30 min, desechándose el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 20 ml de tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7,8). En

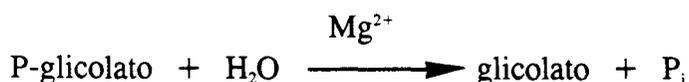
la cámara de reacción del electrodo de oxígeno se dispuso una alícuota de 4 ml de muestra que se saturó con aire y a la que se inyectaron entonces 100 μ l de una disolución de KNO_2 0,8 M, de tal manera que el medio alcanzó una concentración final en nitrito de 20 mM. El cálculo de la actividad se realizó siguiendo las pendientes de consumo de oxígeno en un registrador.

Células inmovilizadas en carragenato potásico

Se realizó de la misma forma en que se ha detallado para el caso de las células libres, introduciendo en la cámara del electrodo de oxígeno una suspensión de 50 a 200 perlas de carragenato potásico, conteniendo las células inmovilizadas, suspendidas en 4 ml de tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7,8). El medio se saturó con aire, salvo cuando la actividad sobrepasaba los 5 μ mol/g.h, en cuyo caso se hacía con oxígeno puro para evitar las limitaciones de transferencia de masa. Se introdujeron en la cámara 100 μ l de KNO_2 0,8 M, comenzando la oxidación de nitrito y siguiendo la evolución de oxígeno como en el caso anterior.

8.3. Actividad fosfoglicolato fosfatasa

La medida se realizó *in situ* según el método descrito por Husic et al. (1984), determinando espectrofotométricamente el fosfato liberado como consecuencia de la hidrólisis irreversible del fosfoglicolato por la acción catalítica de células permeabilizadas de *C. reinhardtii*, según la siguiente reacción:



Para ello, a 0,5 ml de células permeabilizadas se añadieron 0,1 ml de una disolución de MgCl_2 25 mM y 0,1 ml de una disolución tamponada con MES 10 mM, que contenía fosfoglicolato 20 mM. En el blanco se adicionó

0,1 ml de agua destilada en lugar de la disolución de fosfoglicolato. La preparación se incubó a 30°C durante 20 min, calentando posteriormente 1 min a 100°C para detener la reacción. La medida del fosfato liberado se realizó adicionando a la preparación anterior 0,2 ml de una disolución de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 17,5% en H_2SO_4 5,1 N, y después de 10 min, 0,2 ml de una disolución de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 8% en H_2SO_4 1,2 N. En el blanco se empleó agua destilada en lugar de la disolución de Mo. El color se reveló entonces calentando 5 min a 100°C y midiendo la absorbancia a 710 nm, después de enfriar a temperatura ambiente ($\epsilon = 1,82 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La actividad se refirió a clorofila, expresada como mU/mg. Una unidad de actividad enzimática representa la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar irreversiblemente 1 μmol de fosfoglicolato hasta glicolato por min.

8.4. Actividad nitrito reductasa

La enzima cataliza la transferencia de 6 e al nitrito para producir amonio, según la reacción:



La actividad se determinó *in situ* por el método descrito por Vega et al. (1980), midiendo el consumo de nitrito utilizando metil viológeno reducido como donador de electrones. Para ello, se tomaron 0,4 ml de una suspensión de células de *C. reinhardtii* permeabilizadas como se indicó anteriormente y se les añadió 0,5 ml de una mezcla de ensayo compuesta por 30 ml de agua destilada, 10 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 25 mg de KNO_2 y 51 mg de metil viológeno. La reacción se inició por adición de 0,1 ml de una disolución reciente de ditionito sódico en NaHCO_3 0,3 M conteniendo 100 mg/ml. En el blanco correspondiente se empleó agua destilada en lugar de la disolución de ditionito. La preparación se incubó a 40°C durante 10 min, deteniendo la reacción por agitación vigorosa hasta la oxidación total del exceso de reductor. Se determinó el

consumo de nitrito midiendo la diferencia de absorbancia a 540 nm entre el blanco y la muestra. Una unidad de actividad representa la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmol de nitrito hasta amonio por min.

9. REACTORES UTILIZADOS

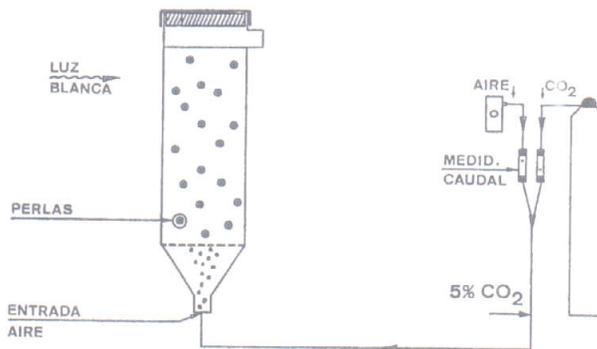
9.1. Reactor tipo airlift discontinuo

Para trabajar con células de *C. reinhardtii* en este tipo de reactor (RAD), se utilizó a tal efecto una columna de vidrio transparente, con una sección circular de 6 cm de diámetro y una longitud de 59 cm, proporcionando un volumen útil de 1,4 l, y trabajando de forma discontinua (Fig. 7). Las células se mantenían en suspensión gracias a la corriente de aire suplementada con un 5% (v/v) de CO_2 que se aplicó desde la base de la columna, manteniendo un caudal constante de gas de 2,3 l/min. El reactor se iluminó continuamente con tubos de luz blanca fluorescente, que suministraban una intensidad en la superficie del mismo de 50 W/m^2 . Las muestras para realizar el análisis del medio se tomaron desde una salida aplicada en la parte inferior del reactor, como se observa en la figura adjunta.

9.2. Reactor tipo airlift de flujo continuo

Para trabajar con células de *C. reinhardtii* en este caso se utilizó la misma columna diseñada para el reactor anterior, con idénticas condiciones de luz, gaseo y toma de muestra, pero manteniendo la entrada continua de medio de cultivo por la parte superior con un flujo igual a 90 ml/h. Simultáneamente se hacía salir la misma cantidad de efluente del reactor (RAC), tal y como se indica en la Figura 8.

A



B

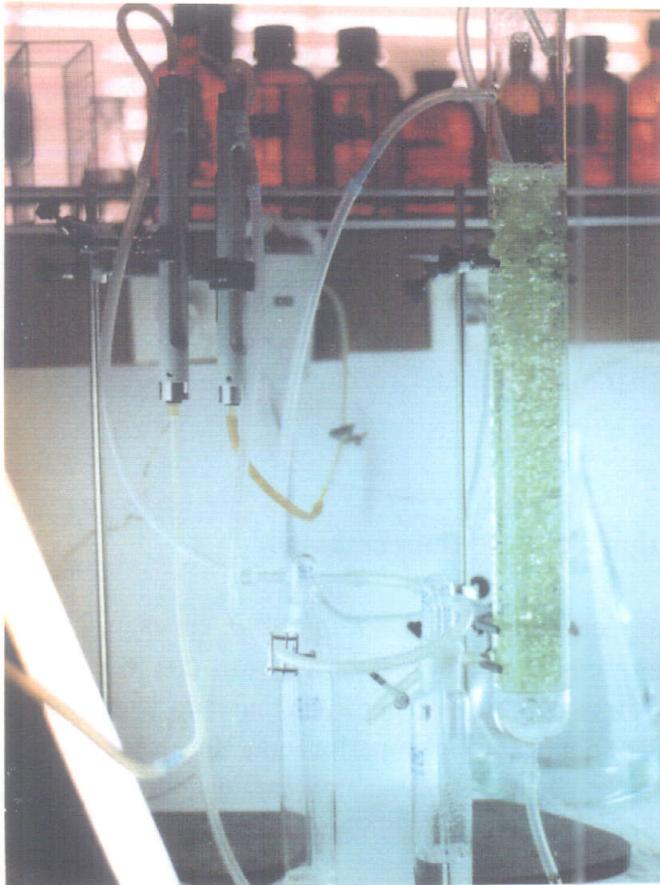


Fig. 7. Sistema discontinuo (RAD) para bioprocesos utilizando células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. a) Los elementos que lo componen son los siguientes: biorreactor de lecho fluidizado y flujómetros para gas, que regulan el suministro de carbono (CO₂) a aquél. b) Fotografía del biorreactor, utilizado como RAD y RAC.

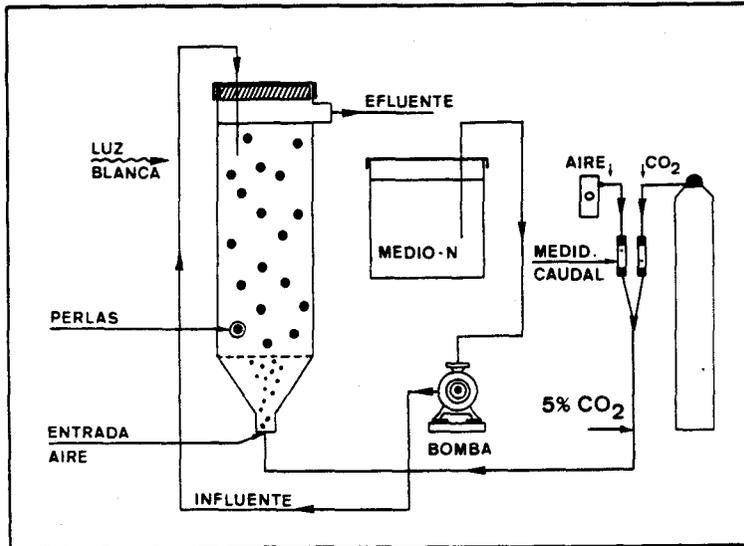


Fig. 8. Sistema de flujo continuo (RAC) para bioprocesos utilizando células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. Los elementos que lo componen son los siguientes: biorreactor de lecho fluidizado y bomba peristáltica para el suministro de alimentación continua al mismo. El suministro de carbono (CO_2) al biorreactor está regulado por flujómetros para gas.

9.3. Reactor tipo airlift loop de flujo continuo

Por otra parte, y para trabajar con células de *N. agilis* inmovilizadas en carragenato potásico, se utilizó un reactor tipo airlift loop de flujo continuo (RAL), que se detalla en la Figura 9. Este proporcionaba un volumen útil de 3 l, y la aplicación de una corriente de oxígeno y aire, saturando el medio al 50 %, se realizó desde la base de uno de los brazos del biorreactor. Se mantuvo un flujo continuo del medio de 3,2 ml/min, realizando la adición de éste, así como la recogida de efluente, por la parte superior del biorreactor, tal y como se indica en el esquema. El reactor estaba acoplado a un Programmable Logical Computer, que recogía continuamente los datos de concentración de oxígeno, medidos con una sonda específica. Para mantenerla constante y en el citado valor, el PLC ajustaba automáticamente dos flujómetros diferentes, uno para el oxígeno y otro para el aire.

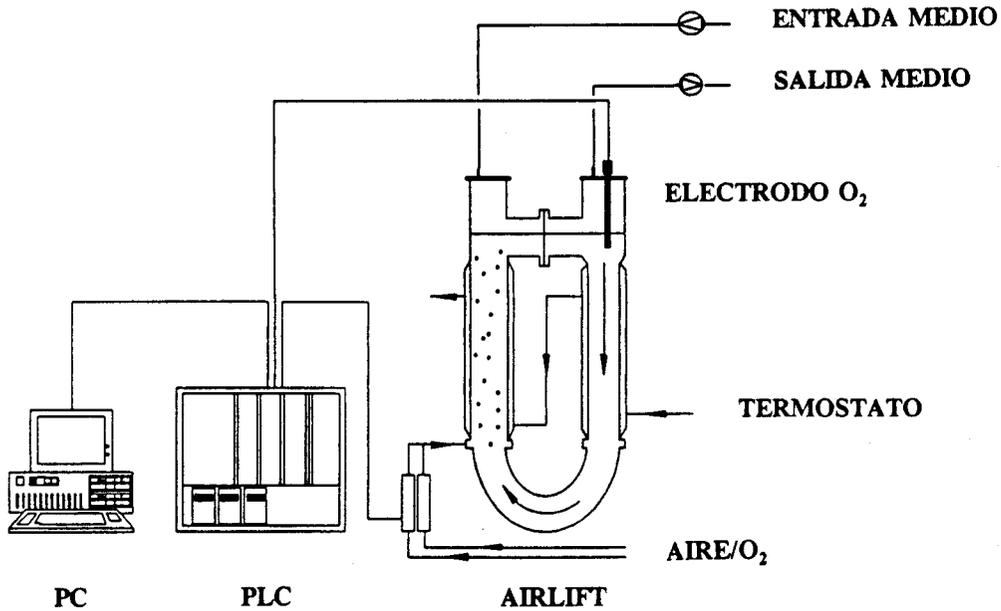


Fig. 9. Sistema de flujo continuo (RAL) para bioprocesos utilizando células inmobilizadas de *N. agilis*. Los elementos que lo componen son los siguientes: biorreactor tipo airlift de lecho fluidizado, computador lógico programable (PLC) y terminal de ordenador (PC). El suministro de oxígeno al biorreactor está regulado por controladores automáticos de flujo.

10. OBSERVACION AL MICROSCOPIO OPTICO

Secciones finas de las perlas de alginato cálcico (0,5 mm) conteniendo células inmobilizadas de *C. reinhardtii*, provenientes de la fase estacionaria de crecimiento alcanzada en los reactores RAD y RAC, se dispusieron sobre

portaobjetos Menzel, de 76 x 26 mm de superficie y se sometieron a una corriente de aire a 35°C durante 15 min, con objeto de eliminar la humedad del gel. A continuación se realizó la observación de las muestras en un microscopio Nikon, obteniendo las micrográficas a 4, 10 y 20 aumentos, mediante un dispositivo acoplado al microscopio, que incluía una cámara Nikon.

11. REACTIVOS

Las sales utilizadas en gran cantidad para la preparación de medios de cultivo y tampones, así como la acetona, y los ácidos acético, clorhídrico, nítrico y sulfúrico fueron suministrados por Panreac. Las sales de cationes metálicos, utilizados en la preparación de trazas para la elaboración de medios de cultivo, algunos líquidos orgánicos como etanol absoluto, ácidos como el fosfórico y sulfámico, compuestos con fines analíticos como fenol, ditionito sódico y nitroprusiato sódico, fueron adquiridos a Merck. Los compuestos utilizados en la preparación de tampones, como Tricina y Mes, y otros compuestos como alginato sódico, aminooxiacetato, p-hidroximercuribenzoato, metil viológeno, fosfoglicolato y L-metionina D,L-sulfoximina fueron suministrados por Sigma. La sulfanilamida se adquirió de Scharlau y el hipoclorito sódico de Aldrich, y DIFCO suministró el agar.

El agua desionizada fue obtenida utilizando un desionizador Aqualab y el agua destilada mediante un destilador Aquatron A8S.

El anhídrido carbónico empleado como fuente de carbono para el crecimiento de las algas se adquirió a la Sociedad Española del Oxígeno.

12. APARATOS

Las medidas espectrofotométricas se realizaron a temperatura ambiente en los espectrofotómetros ultravioleta-visible Beckman, modelo DU-7, y Bausch & Lomb, modelo Spectronic 2000, utilizando cubetas

de 1 cm de paso de luz, tanto de cuarzo para longitudes de onda inferiores a 340 nm, como de plástico y cristal para el resto.

Las centrifugaciones se realizaron en centrifugas refrigeradas Beckman, modelo J2-21 con rotores JA-20 y JA-14, y Sorvall, modelo RC-5B, con rotores SS-34 y GSA. Las centrifugaciones a temperatura ambiente se hicieron en una centrífuga Heraeus, modelo Labofuge, y Eppendorf, modelo 5415, esta última para volúmenes de muestra inferiores a 1,5 ml.

Las pesadas se efectuaron en balanzas Mettler, modelos PC 2200 y AE 160. Las medidas de pH se realizaron con un pH-metro Beckman, modelo 71, y las de concentración de oxígeno mediante un electrodo tipo Clark de Hansatech acoplado a un registrador Linseis, modelo 6512.

La esterilización de recipientes y medios de cultivo se consiguió mediante tratamiento térmico a 120°C durante 20 min y 1 atmósfera de sobrepresión en autoclaves Selecta, modelos Autester 437-G y 437-P.

Los ensayos a temperatura constante fueron realizados en baños termostatzados Selecta, modelos Tectron S-543. La agitación magnética de disoluciones se consiguió mediante agitadores Selecta, modelo Agimatic.

La viscosidad de las soluciones de alginato preparadas para realizar la inmovilización de células se determinó utilizando un viscosímetro Brookfield RTV, a 20 rpm.

Finalmente, la columna de vidrio diseñada para ser empleada como biorreactor (RAD y RAC) se adquirió a Afora. El biorreactor RAL se diseñó y construyó en los laboratorios de vidrio de la Universidad de Wageningen (Holanda), acoplándole un Computador Lógico Programable modelo PLC Melsec-G, Mitsubishi G62P. La concentración de oxígeno en este reactor se controló mediante un sensor modelo WTW Oxy 219/90R, y el flujo de gas suministrado al reactor se determinó mediante un controlador de flujo de Brooks Instruments, modelo 5850 TR. En el RAL, las concentraciones de nitrito y nitrato se determinaron mediante un autoanalizador de flujo continuo, modelo Technicon Auto Analyser 2. Las bombas peristálticas empleadas en la alimentación continua a los reactores fueron del modelo LKB, Microperpex S 2232, suministradas por Pharmacia.

III Resultados

1. ACTIVIDADES FOTOSINTETICA Y RESPIRATORIA DE CELULAS INMOVILIZADAS DE *C. reinhardtii*

Las características especiales que la inmovilización confiere al microambiente celular y a la célula en sí misma respecto a su relación de intercambio con el medio externo al soporte, condicionan en gran manera su comportamiento ante los posibles cambios que en dicho medio puedan tener lugar. La entrada de oxígeno en la célula, necesario para su actividad respiratoria, y la salida del mismo derivada de la actividad fotosintética, pueden verse notablemente alteradas y, consecuentemente, afectar de una u otra forma a los distintos procesos que quieran llevarse a cabo con las células inmovilizadas (Galván et al. 1990). Entre los factores que condicionan estas variaciones, el tiempo de residencia en la disolución salina durante la gelificación ionotrópica, la temperatura, el pH, la carga celular inmovilizada, la concentración de la suspensión de alginato destinada a la preparación de las células inmovilizadas y el tiempo transcurrido desde la inmovilización celular son críticos a la hora de definir el comportamiento y las mejores condiciones de uso de estas células. El estudio de las actividades fotosintética y respiratoria frente a variaciones en dichos parámetros es una forma adecuada de definir el estado celular en cada situación.

1.1. Influencia de las condiciones de inmovilización

Efecto de los iones Ca^{2+} y Ba^{2+} utilizados en el proceso de gelificación ionotrópica

La gelificación de la suspensión de alginato y células se realiza, como se detalló en Materiales y Métodos, sobre una disolución de $CaCl_2$ 100 mM, permaneciendo las perlas en ella durante 60 min para adquirir la consistencia adecuada. La gelificación puede igualmente llevarse a cabo empleando $BaCl_2$ 100 mM. En dicho periodo de tiempo es indispensable realizar un seguimiento de las actividades fotosintética y respiratoria, pues de su evolución pueden derivarse consecuencias relevantes para el empleo de las células en otros procesos. En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos para la actividad fotosintética a lo largo del citado periodo, y en ella puede observarse que los niveles de dicha actividad son muy similares, tanto en células inmovilizadas en alginato cálcico como en alginato bórico ($40 \mu\text{g Chl/g gel}$), y después de 60 min de residencia en el medio salino correspondiente, muestran un valor en torno a $110 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$. Dicha actividad permanece prácticamente constante y resulta ligeramente superior a la que muestran las células libremente suspendidas, en las mismas condiciones, que está en torno a $100 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$.

En la Figura 11 puede observarse cómo la actividad respiratoria se mantiene en torno a $45 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ durante el proceso de gelificación ionotrópica, tanto si se emplea Ca^{2+} ó Ba^{2+} como contraión. Estos valores son ligeramente inferiores a los mostrados por células libremente suspendidas, que se presentan en la zona de $60\text{-}70 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$.

Para posteriores estudios con células inmovilizadas hemos utilizado, salvo que se indique otra cosa, Ca^{2+} como contraión y un tiempo de endurecimiento de 30 min.

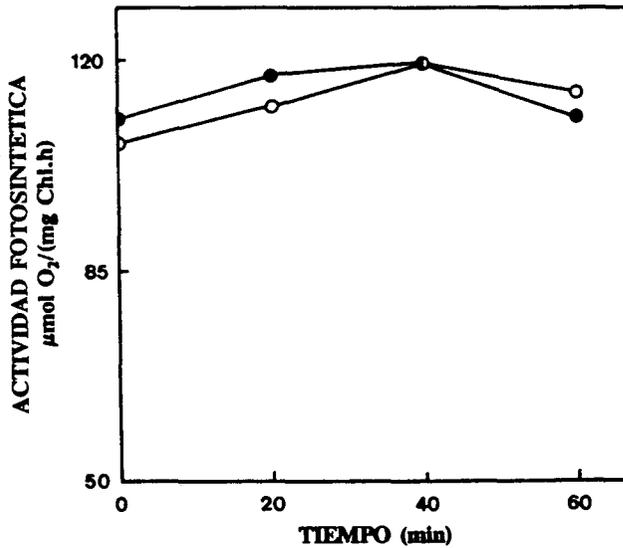


Fig. 10. Efecto de los iones Ca^{2+} o Ba^{2+} utilizados durante la gelificación sobre la actividad fotosintética de células inmobilizadas de *C. reinhardtii*. Las células se inmobilizaron en alginato, utilizando Ca^{2+} (●) o Ba^{2+} (○) como contraión. A los tiempos indicados, transcurridos desde el contacto de las gotas de suspensión de células en alginato con la disolución del ión correspondiente, se determinó la actividad fotosintética en las células inmobilizadas resultantes.

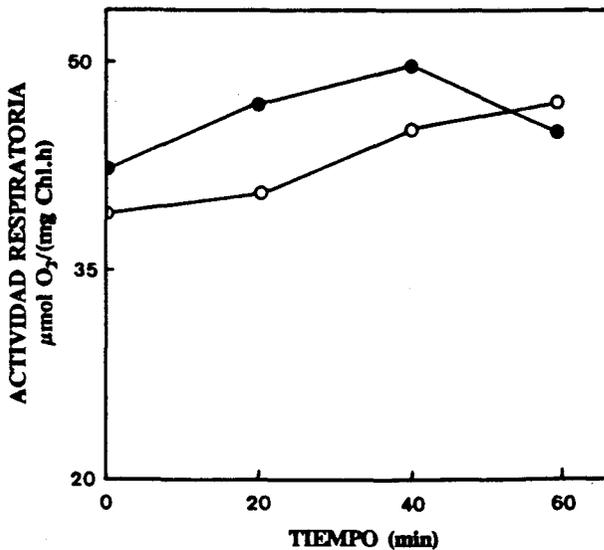


Fig. 11. Efecto de los iones Ca^{2+} o Ba^{2+} utilizados durante la gelificación sobre la actividad respiratoria de células inmobilizadas de *C. reinhardtii*. Se procedió según se ha descrito en la figura anterior, excepto que en este caso se determinó la actividad respiratoria de las células.

Efecto de la carga celular

La Figura 12 muestra los datos de las actividades fotosintética y respiratoria obtenidos empleando distintas cargas celulares inmovilizadas en alginato cálcico. La actividad fotosintética es máxima, $155 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$, para una carga celular en torno a $15 \mu\text{g Chl/g soporte}$, descendiendo progresivamente hasta un valor de $70 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ para una carga de $100 \mu\text{g Chl/g soporte}$. Por su parte, la actividad respiratoria permanece prácticamente constante, apreciándose un ligero descenso hasta una carga celular de $50 \mu\text{g Chl/g soporte}$. El valor mínimo determinado para dicha actividad fue de $20 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ para una carga de $100 \mu\text{g Chl/g soporte}$. Es importante indicar que, cuando la carga celular inmovilizada es baja, la producción de oxígeno alcanza valores del orden del doble de los mostrados para cargas iniciales superiores a $75 \mu\text{g Chl/g soporte}$, mientras que las tasas de consumo de oxígeno (actividad respiratoria) apenas sufren variaciones significativas cuando la carga inicialmente inmovilizada se multiplica incluso hasta por cinco o diez. Estos datos ponen de manifiesto el enorme interés de considerar el efecto pantalla para la luz provocado por las células más externas del soporte, así como la influencia que éste puede tener en el rendimiento de todos aquellos procesos celulares directamente relacionados con la luz. Salvo que se indique otra cosa, la carga celular utilizada en posteriores estudios fue de unos $30\text{-}40 \mu\text{g Chl/g de gel}$.

Efecto de la concentración de la suspensión de alginato

La difusión de moléculas en el soporte está fuertemente condicionada por la concentración que de éste se emplea al preparar la suspensión de alginato y células para realizar la inmovilización. Es fundamental, por lo tanto, determinar su influencia en los distintos procesos estudiados.

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos al medir las actividades fotosintética y respiratoria en células de *C. reinhardtii* inmovilizadas empleando disoluciones con distinta concentración de alginato (% p/v), produciéndose un suave descenso en ambas actividades, a medida que

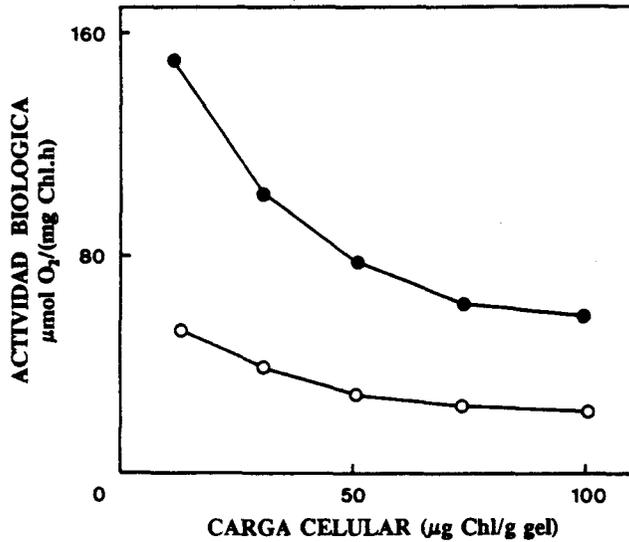


Fig. 12. Efecto de la carga celular sobre las actividades fotosintética y respiratoria de células inmobilizadas de *C. reinhardtii*. Las células se inmobilizaron en alginato cálcico utilizando distintas cargas celulares, y las actividades fotosintética (●) y respiratoria (○) se determinaron según se ha descrito en Materiales y Métodos.

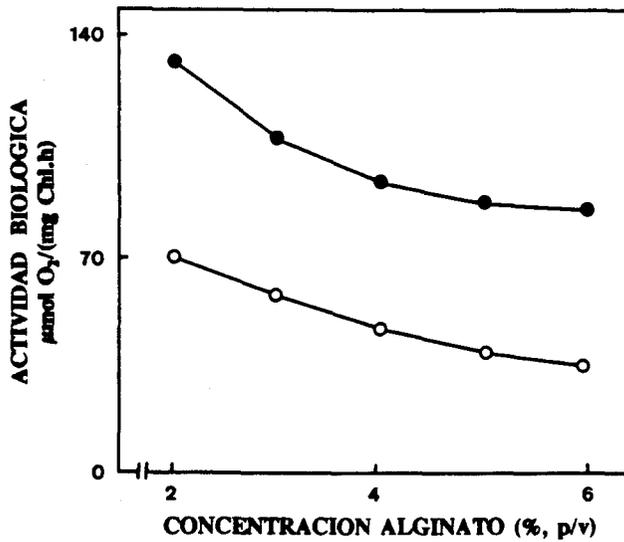


Fig. 13. Efecto de la concentración de la disolución de alginato utilizada en la inmobilización sobre las actividades fotosintética y respiratoria de células de *C. reinhardtii*. Las células se inmobilizaron utilizando distintas concentraciones de alginato, y las actividades fotosintética (●) y respiratoria (○) se determinaron según se ha descrito en Materiales y Métodos.

aumenta dicha concentración. Este descenso es ligeramente más acentuado en la actividad fotosintética cuando se incrementa la concentración de alginato desde un 2 % a un 4 %, observándose una tendencia a la estabilización para valores más elevados. Dicha actividad presenta un valor máximo de $130 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ para una concentración de alginato del 2 %, descendiendo hasta $90 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ para alginato al 6 %, lo que supone una pérdida del 30 % en la eficiencia de la producción de oxígeno entre ambos extremos. La actividad respiratoria, por su parte, presenta un máximo de $70 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ para una concentración de alginato del 2 %, descendiendo hasta 35 cuando ésta es del 6%, lo que significa una pérdida del 50 % en el consumo de oxígeno como consecuencia del efecto de la concentración de alginato empleada en el proceso de inmovilización. En nuestro trabajo hemos optado por un valor próximo al 3% ya que mejoraba mucho la consistencia de las perlas.

1.2. Influencia del tiempo de almacenamiento

En alginato

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos al determinar actividades biológicas en las células inmovilizadas después de distintos periodos de almacenamiento a 4°C . La actividad fotosintética incrementa desde el momento de la inmovilización celular, $120 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$, hasta alcanzar un máximo de $180 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ 4 días después de dicha inmovilización. Posteriormente la actividad desciende lentamente hasta alcanzar el mismo valor inicial al cabo de 12 días de almacenamiento. Por su parte, la actividad respiratoria tiene un comportamiento análogo aunque menos marcado que en el caso anterior, mostrando un ligero incremento desde un valor inicial de $60 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ hasta $80 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$, transcurridos 4 días desde la inmovilización celular, seguido de un descenso igualmente suave hasta $50 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ al cabo de 12 días de almacenamiento.

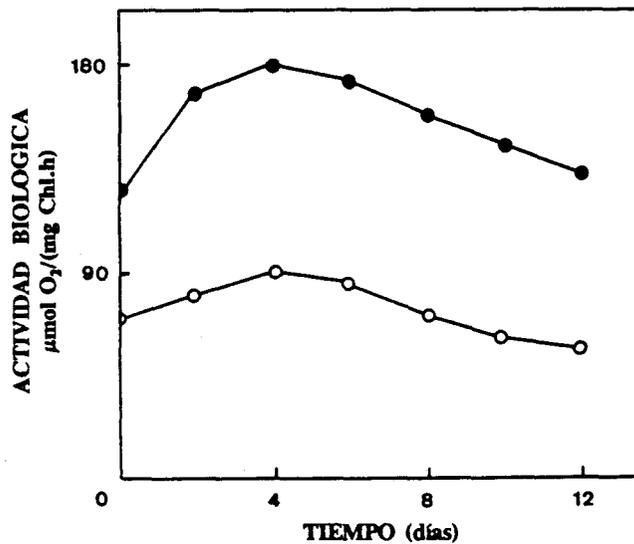


Fig. 14. Efecto del tiempo de almacenamiento de células de *C. reinhardtii* inmovilizadas en alginato sobre las actividades fotosintética y respiratoria. Las células previamente inmovilizadas en alginato cálcico se almacenaron a 4°C, y a los tiempos indicados se determinaron las actividades fotosintética (●) y respiratoria (○). Para más detalles ver Materiales y Métodos.

En agar

En la Figura 15 se recogen los resultados obtenidos al determinar actividades biológicas después de someter las células inmovilizadas en agar a distintos periodos de almacenamiento a 4°C. Los datos observados muestran que las actividades fotosintética y respiratoria tienen un comportamiento análogo al que presentan cuando las células se inmovilizan en alginato. La primera de ellas incrementa su valor desde el instante de la inmovilización, $110 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$, hasta el cuarto día de almacenamiento, en que alcanza su valor máximo, $150 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$, lo que supone un incremento aproximado del 40%. Dicha actividad desciende entonces de forma continua hasta un valor de $60 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ al cabo de 12 días. Este valor equivale a un 40% del mostrado por las células en el momento de la inmovilización. La pérdida de actividad después de este periodo de tiempo es mayor que la observada en las células inmovilizadas en alginato.

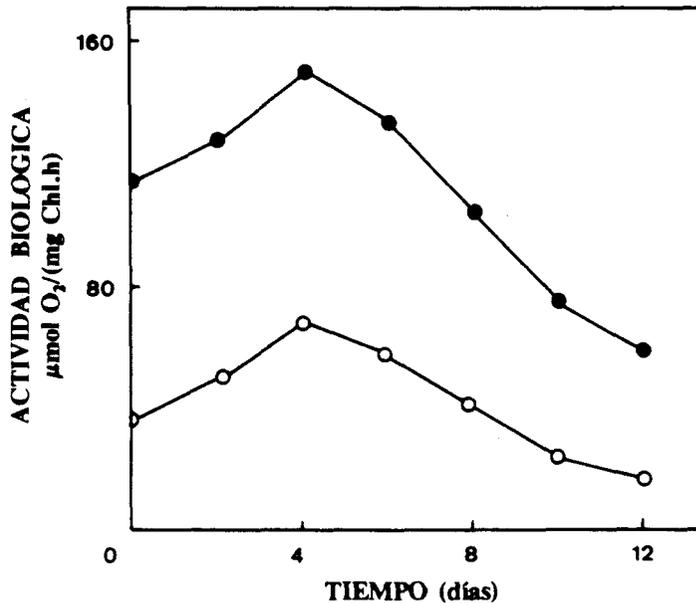


Fig. 15. Efecto del tiempo de almacenamiento de células de *C. reinhardtii* inmovilizadas en agar sobre las actividades fotosintética y respiratoria. Se procedió de forma análoga a la figura anterior, excepto que las células se inmovilizaron en agar.

Por su parte, la actividad respiratoria presenta un comportamiento similar, mostrando un valor inicial de $35 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ y un máximo de 70 al cabo de 4 días, descendiendo posteriormente hasta alcanzar un mínimo de 20 al cabo de 12 días. Las fluctuaciones observadas en la actividad respiratoria son análogas a las que muestran las células inmovilizadas en alginato.

1.3. Influencia de las condiciones ambientales sobre las actividades biológicas de células libres e inmovilizadas

Efecto de la temperatura

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos al determinar la actividad fotosintética de células libres e inmovilizadas en alginato cálcico a distintas

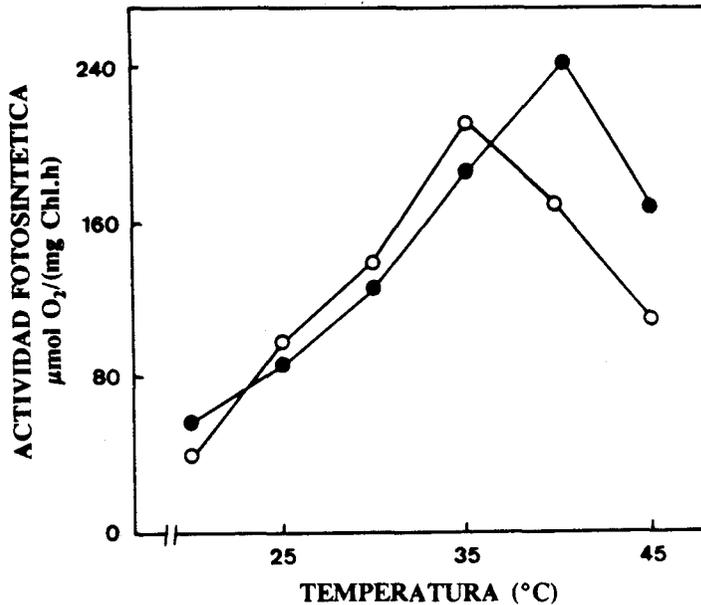


Fig. 16. Efecto de la temperatura sobre la actividad fotosintética de células de *C. reinhardtii*. Las células se utilizaron, libres (○) o inmovilizadas en alginato cálcico (●), para determinar, a las temperaturas indicadas, su actividad fotosintética, según se ha descrito en Materiales y Métodos.

temperaturas. Tanto en unas como en otras se observa un incremento lineal en la producción de oxígeno, derivada de dicha actividad, a medida que se incrementa la temperatura del experimento. Las células libremente suspendidas alcanzan un máximo de actividad de $180 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ a 35°C , valor que se incrementa hasta 240 (20 % más alto) a 40°C para las inmovilizadas y que supone el máximo para las mismas. En ambos tipos de células se produce un descenso de la actividad para temperaturas más elevadas. Es importante observar que a las temperaturas más bajas se muestra la mayor similitud entre la producción de oxígeno por células libres e inmovilizadas, mientras que las diferencias más altas se producen entre 35 y 45°C . Los valores más bajos obtenidos fueron 40 y $55 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ para células libres e inmovilizadas, respectivamente, medidos a 20°C .

La actividad respiratoria mostrada por células libres e inmovilizadas (Fig. 17) aumenta ligeramente con la temperatura hasta estabilizarse prácticamente entre 35 y 45°C en valores entre 40 y 50 $\mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$. El incremento observado es además, poco significativo, pues la diferencia entre el máximo y el mínimo consumo de oxígeno, tanto para las células libres como inmovilizadas, se aproxima a 10 $\mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$. Esta diferencia es la que se observa casi como una constante entre las actividades respiratorias de ambos tipos de células, correspondiendo los valores más altos a las células libremente suspendidas.

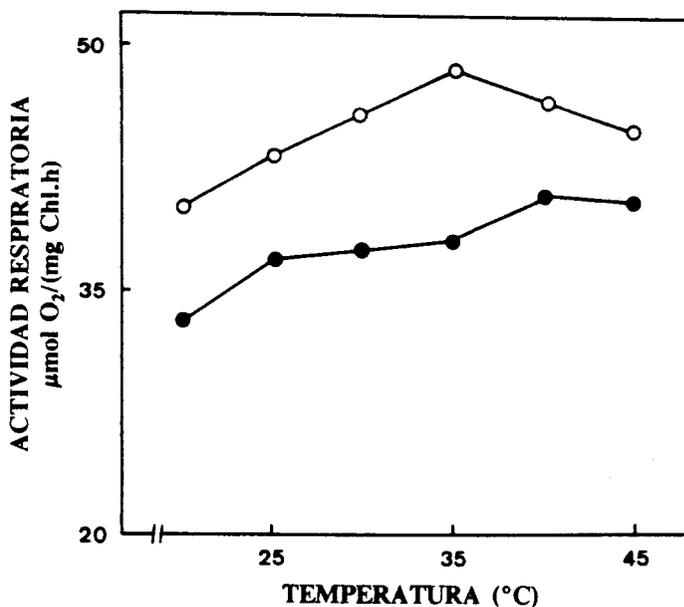


Fig. 17. Efecto de la temperatura sobre la actividad respiratoria de células de *C. reinhardtii*. Se procedió análogamente a la figura anterior, excepto que en este caso se determinó la actividad respiratoria de las células.

Efecto del pH

La actividad fotosintética (Fig. 18) alcanza un máximo de $130 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ tanto para las células libres como inmovilizadas, si bien a un pH de 8,0 para las primeras y de 7,5 para las segundas. A valores de pH superiores a 7,5, la producción de oxígeno es ligeramente superior para las células libres, mientras que por debajo de dicho pH lo es a favor de las inmovilizadas. A pH 6,0 la diferencia entre la producción de oxígeno por ambos tipos de células es máxima, mostrando las inmovilizadas un valor de $110 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ frente a 85 en las células libres, que es además el mínimo observado en la actividad fotosintética de las mismas en el intervalo de pH en el que se realizaron las medidas (6-9). Puede deducirse igualmente de esta figura que los valores de producción de oxígeno mostrados por las células inmovilizadas se mantienen, en todo el intervalo de pH estudiado, superiores al 80 % del máximo mostrado a pH 7,5. Para las células libres, la actividad fotosintética a pH 6,0 supone un 60 % de su máximo valor a pH 8,0, mostrando sin embargo un descenso poco significativo entre pH 8,0 y 9,0.

La actividad respiratoria (Fig. 19) presenta valores similares para células libres e inmovilizadas en el intervalo de pH 6,0-7,0, incrementándose en las células libres al aumentar el pH hasta presentar un máximo de $45 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ a pH 8,0. Por el contrario, el consumo de oxígeno en las células inmovilizadas se mantiene constante entre pH 7,0 y 8,0, descendiendo ligeramente hasta pH 9,0, al igual que sucede para las células libres.

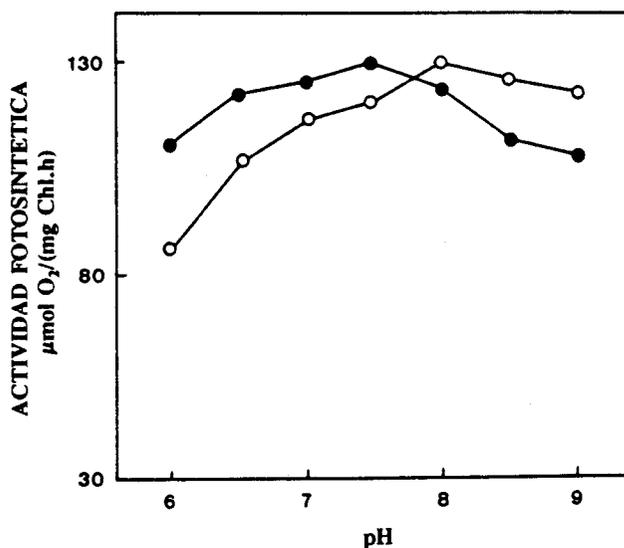


Fig. 18. Efecto del pH sobre la actividad fotosintética de células de *C. reinhardtii*. Las células se utilizaron, libres (○) o inmovilizadas en alginato cálcico (●), para determinar, a los pH indicados, su actividad fotosintética, según se ha descrito en Materiales y Métodos. Los tampones utilizados fueron: 20 mM MES, entre pH 6 y 7, y 20 mM Tricina, entre pH 7 y 9.

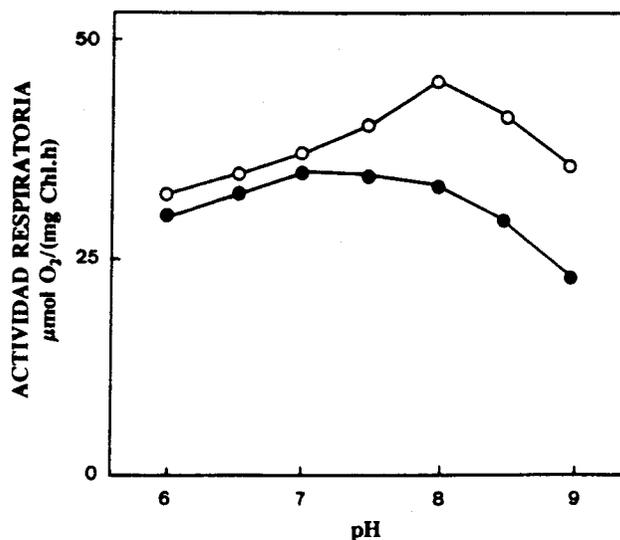


Fig. 19. Efecto del pH sobre la actividad respiratoria de células de *C. reinhardtii*. Se procedió de forma análoga a la figura anterior, excepto que en este caso se determinó la actividad respiratoria de las células.

2. FOTOPRODUCCION DE GLICOLATO POR *C. reinhardtii*

La acumulación intracelular de glicolato en microalgas y consecuentemente su excreción al medio de cultivo dependen directamente de la luz y de la relación O_2/CO_2 (Berry et al. 1976), que condicionan la fijación de CO_2 y el proceso de la Fotorrespiración. Considerando que la cantidad de glicolato excretada por un organismo fotosintético es un índice de la medida del flujo fotorrespiratorio de CO_2 , parece lógico pensar que si se bloquea la Fotorrespiración mediante el uso de los inhibidores adecuados se podría definir un sistema eficaz de fotoproducción biológica de glicolato.

2.1. Influencia de la transición alto-bajo CO_2 e inhibidores fotorrespiratorios

Efecto de la transición alto-bajo CO_2 y AOA

Cuando células de *C. reinhardtii* se transfieren de unas condiciones de cultivo saturantes en CO_2 (5% CO_2 en aire), a una situación de bajo CO_2 , se estimula significativamente la velocidad de Fotorrespiración y, por tanto, la biosíntesis de glicolato, por lo que dicha transición es el factor desencadenante de la excreción de glicolato al medio por parte de las células. No obstante, los datos recogidos en la Figura 20 indican que dicha transición no es suficiente para una excreción significativa de glicolato, pero la presencia de 1 mM de aminooxiacetato (AOA) en el medio de cultivo, que bloquea las transaminasas al combinarse directamente con su grupo prostético (Tolbert et al. 1983), detiene la Fotorrespiración en el paso de glioxilato a glicina, reacción catalizada por la glicina-glioxilato aminotransferasa. Aparentemente el glioxilato no se acumula, ya que la reacción catalizada por la glioxilato reductasa lo convierte en glicolato, el cual sí se acumula intracelularmente en estas condiciones y se excreta finalmente al medio.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en la medida de la actividad fosfoglicolato fosfatasa, directamente implicada en la formación de glicolato a partir de fosfoglicolato. Puede observarse que cuando las células crecidas en alto CO_2 se transfieren a aire en presencia de 1 mM de AOA, la actividad se incrementa en un 30% aproximadamente, tras 12 h de fotoproducción de glicolato. Si se realiza dicha transición pero no se adiciona ningún inhibidor, la actividad enzimática sólo aumenta un 10% en el mismo periodo de tiempo. En las siguientes 12 h de proceso, la actividad fosfoglicolato fosfatasa se mantiene constante en el primer caso y disminuye ligeramente cuando no se utiliza inhibidor, hasta alcanzar el nivel que presentó al inicio del periodo de fotoproducción. El control (células crecidas en alto CO_2 y transferidas igualmente a condiciones de alto carbono) mostró niveles de actividad constantes durante las 24 h de duración del experimento.

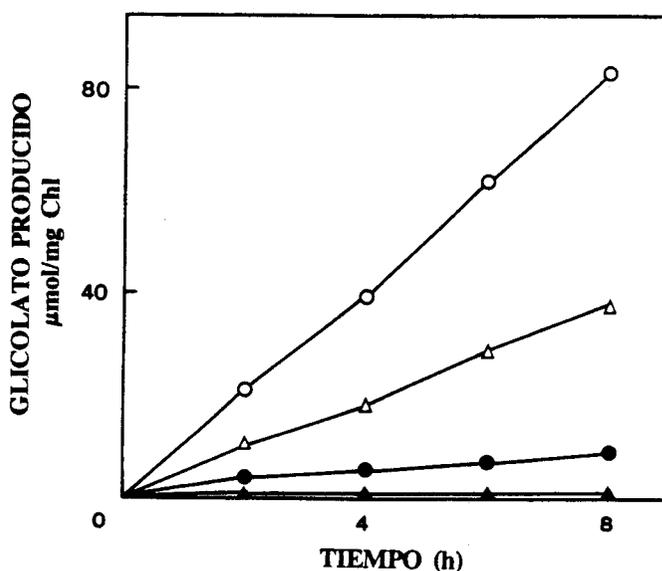


Fig. 20. Efecto de la transición alto-bajo CO_2 y del AOA sobre la producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se cultivaron en condiciones estándar, y se incubaron para la producción de glicolato según las siguientes condiciones: aire + AOA 1 mM (○), aire (●), 5% CO_2 en aire + AOA 1 mM (△) y 5% CO_2 en aire (▲).

Tabla 3. Niveles de actividad fosfoglicolato fosfatasa en células de *C. reinhardtii* sometidas a distintas condiciones

CONDICIONES	FOSFOGLICOLATO FOSFATASA mU/mg Chl	%
Aire + 1 mM AOA		
0 h	1000	100
12 h	1334	133
24 h	1350	135
Aire		
0 h	1000	100
12 h	1117	112
24 h	1033	103
CO ₂		
0 h	1000	100
12 h	983	98
24 h	983	98

Las células se cultivaron en alto CO₂ (5 % en aire) y se transfirieron a las condiciones indicadas, determinando la actividad fosfoglicolato fosfatasa, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos

Efecto de la concentración de CO_2

Antes hemos descrito un tránsito de las células desde una concentración saturante de CO_2 (5% en aire) hasta otra que supone una limitación de carbono para el crecimiento celular (0,03% en aire), lo que provoca cambios importantes en las enzimas fotorrespiratorias implicadas en la biosíntesis de glicolato, en presencia de AOA. Cuando se utilizan concentraciones intermedias de CO_2 , superiores al 0,4% en aire y se mantiene el inhibidor, disminuye progresivamente la capacidad celular para producir glicolato (Fig. 21). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (Nelson y Tolbert 1969).

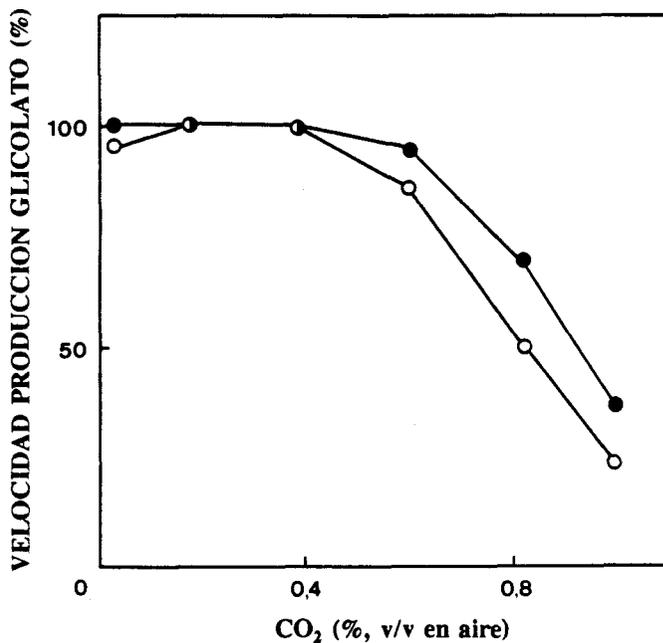


Fig. 21. Efecto de la concentración de CO_2 sobre la velocidad de producción de glicolato por células de *C. reinhardtii*. Cantidades iguales de células libres (O) o inmobilizadas en alginato (●), crecidas en alto CO_2 , se transfirieron a distintas concentraciones de CO_2 , manteniendo el inhibidor (AOA 1 mM), determinando en cada caso la velocidad de producción de glicolato (100% = 12 y 22 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$, respectivamente).

Efecto de la concentración de AOA

Con objeto de optimizar las condiciones de producción de glicolato, hemos estudiado el efecto que tienen distintas concentraciones de AOA sobre el proceso productivo. La Figura 22 muestra que la concentración de AOA afecta a la velocidad de producción de glicolato, que es un proceso lineal durante las primeras 8 h independientemente de la concentración de inhibidor. Aunque utilizando 10 mM de AOA en el cultivo la producción de glicolato es de 1,5 a 2 veces superior a la obtenida con 1 mM, los efectos secundarios (degeneración celular) hacen inviable el uso de concentraciones elevadas de dicho inhibidor, siendo aconsejable seleccionar como óptima la concentración de 1 mM. Experimentos de Tolbert et al. (1983) realizados con *C. reinhardtii* mostraron que, en cortos periodos de tiempo (20-30 min), la excreción de glicolato no dependía de la concentración de inhibidor utilizada.

Efecto de otros inhibidores fotorrespiratorios

La Figura 23 muestra que la producción de glicolato por células de *C. reinhardtii* es lineal durante las primeras 8 h, si se incluye en el medio de cultivo 1 mM de AOA o L-metionina-D,L- sulfoximina (MSX), si bien en el primer caso la cantidad de glicolato producido al cabo de este tiempo es aproximadamente el doble que la producida con MSX, inhibidor de la glutamina sintetasa. Con hidroxipiridín-metanosulfonato (HPMS) o isonicotín hidrazida (INH), la fotoproducción de glicolato fue lineal durante 4 ó 6 h, estabilizándose posteriormente y obteniéndose en ambos casos rendimientos no superiores al 25% de la producción obtenida con AOA. El HPMS, inhibidor de la glicolato deshidrogenasa, estimula la excreción de glicolato por algas verdes (Jahnke 1981) y cianobacterias (Ingle y Coleman 1976), aunque en ningún caso tan eficazmente como lo hace el AOA. Análoga situación podemos comentar para INH en *Chlorella* (Findenegg 1977).

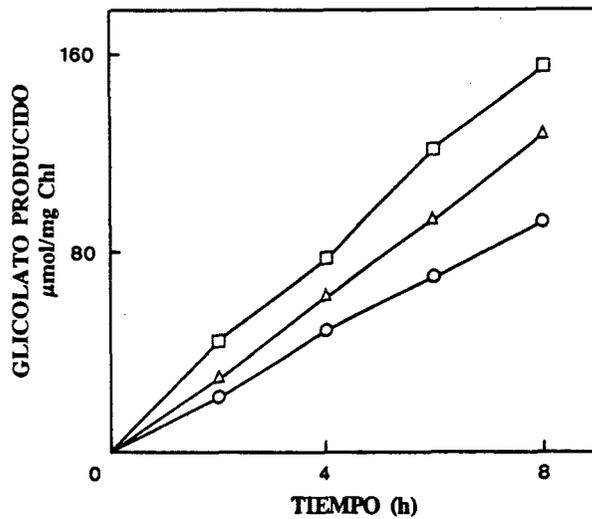


Fig. 22. Efecto de la concentración de AOA sobre la producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, y a los tiempos indicados se cuantificó dicha producción en presencia de AOA 1 mM (O), 5 mM (Δ) y 10 mM (□).

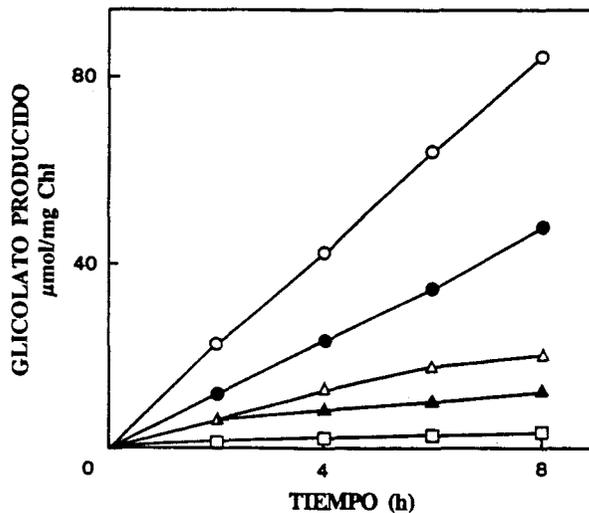


Fig. 23. Efecto de distintos inhibidores fotorrespiratorios sobre la producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, pero utilizando AOA 1 mM (O), MSX 1 mM (●), HPMS 1 mM (Δ) ó INH 1 mM (▲) y un control sin inhibidor (□). A los tiempos indicados se cuantificó dicha producción.

2.2. Influencia de las condiciones de inmovilización

Efecto de la edad del cultivo

Un factor determinante para optimizar la producción de glicolato es el estadio de crecimiento en que se encuentran las células cuando se recogen, así como el tiempo transcurrido hasta su utilización. En la Figura 24 puede observarse que la velocidad de producción de glicolato es máxima, $12 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl}\cdot\text{h})$ cuando se utilizan células que están en los primeros momentos de la fase exponencial de crecimiento (en torno a $10 \mu\text{g Chl}/\text{ml}$), disminuyendo dicha velocidad en función de la edad del cultivo utilizado, hasta alcanzar un valor mínimo y constante en torno a $4 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl}\cdot\text{h})$, que supone un 30% del valor máximo alcanzado, cuando se utilizan células en fase estacionaria de crecimiento (en torno a $80 \mu\text{g Chl}/\text{ml}$).

Por otra parte, las células escogidas para los experimentos de producción de glicolato se utilizaban siempre antes de transcurrida 1 h desde su recolección, habiéndose encontrado que si se espera más tiempo la eficacia del proceso comenzaba a decrecer (resultados no mostrados).

Efecto de la carga celular

Los procesos de producción o consumo que implican la participación de microorganismos fotosintéticos resultan especialmente influenciados por la densidad de células utilizada, debido fundamentalmente al efecto pantalla que éstas presentan a la luz, lo que se traduce en una disminución de la actividad fotosintética del sistema, como habíamos visto en la Figura 12.

La velocidad de producción de glicolato por células libremente suspendidas de *C. reinhardtii* presenta un nivel constante para cualquier densidad celular cuya clorofila esté comprendida entre 30 y $90 \mu\text{g Chl}/\text{ml}$, según se observa en la Figura 25, apreciándose los valores más bajos para concentraciones de clorofila inferiores a 30 y superiores a 120 (datos no mostrados). También puede observarse en dicha figura que la concentración



de glicolato acumulado en el medio resulta lineal en función de la carga celular utilizada.

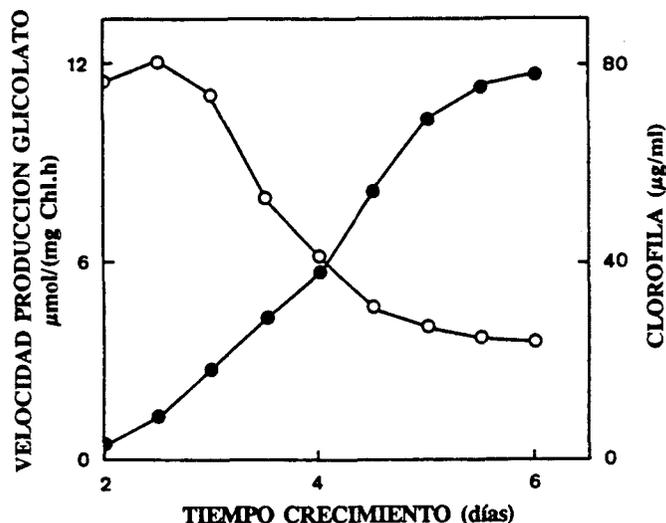


Fig. 24. Efecto de la edad del cultivo sobre la velocidad de producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células, tomadas a los tiempos indicados de un cultivo estándar, cuya concentración de clorofila se indica (●), se incubaron para la producción de glicolato (○), según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

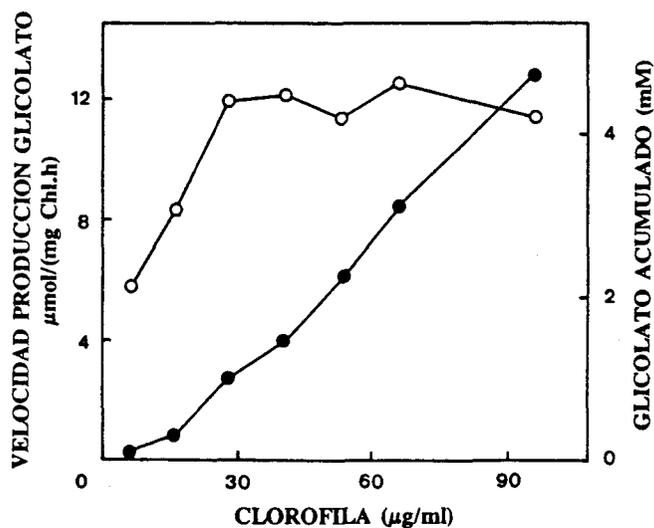


Fig. 25. Efecto de la concentración de clorofila sobre la velocidad de producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, empleando distintas densidades celulares iniciales. En cada caso se determinó la velocidad de dicha producción (○) y la concentración del mismo en el medio (●), al cabo de 8 h.

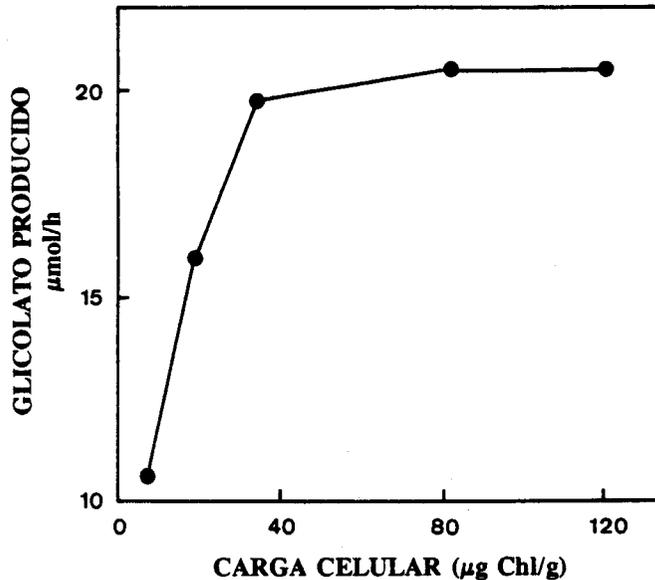


Fig. 26. Efecto de la carga celular sobre la producción de glicolato por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. Células inmovilizadas en alginato cálcico y conteniendo la carga celular indicada, se incubaron para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

Cuando utilizamos microorganismos inmovilizados, el efecto pantalla que sobre la luz presenta la carga celular es bastante significativo, y siendo la producción de glicolato un proceso directamente dependiente de la luz, es por lo que la carga celular inmovilizada puede condicionar notablemente la eficacia productiva. En la Figura 26 se muestra la variación que experimenta la producción de glicolato al aumentar la carga celular inmovilizada en alginato. Dicha producción se incrementa linealmente hasta cargas próximas a 40 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte, haciéndolo entonces más lentamente hasta estabilizarse para cargas celulares mayores de 120 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte. Esta observación sugiere que la actividad celular se concentra en una capa distribuida en la zona periférica de la perla de

alginato, que actúa de pantalla para la entrada de la luz hacia las células más internas. De esta forma, a partir de un cierto valor de carga celular (40-50 $\mu\text{g/g}$) la mayor parte de la producción de glicolato podría deberse a dicha capa de células, siendo poco significativo el incremento de la producción para aumentos de carga celular que sólo aportan pequeñas cantidades de las mismas a esta capa, saturada a valores altos de clorofila.

Efecto de la viscosidad de la suspensión de alginato

El rendimiento de un proceso productivo utilizando células inmovilizadas también depende de parámetros específicos de la técnica de inmovilización como naturaleza de la matriz-soporte, contraión utilizado en el proceso de gelificación, tamaño de la perla empleada y viscosidad o concentración de la solución de soporte, entre otros. Encontrar valores óptimos para cada uno de dichos parámetros constituye una tarea fundamental para el diseño de un sistema productivo eficaz.

Una medida de la concentración de alginato puede determinarse por la viscosidad de la solución del mismo. En los estudios de producción de glicolato con células inmovilizadas hemos visto que la velocidad del proceso decrece linealmente desde un valor inicial de 20 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$, utilizando una solución de alginato con una viscosidad de 3.000 cps, hasta 14 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ correspondiente a una de 24.000 cps (Fig. 27). A partir de este último valor de viscosidad, el descenso en la velocidad de producción resulta más evidente cayendo hasta 5 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ para 32.000 cps (dato no mostrado). Por otra parte, en esta figura también se observa que para valores superiores a 7.000 cps no existe pérdida detectable de células de las perlas, mostrándose en cambio una baja retención celular para viscosidades más bajas. Estas observaciones nos permiten concluir la necesidad de trabajar con disoluciones de alginato de baja viscosidad para la preparación de sistemas de células inmovilizadas, pero nunca por debajo de 7.000 cps y, en cualquier caso, realizando medidas de pérdida celular durante el proceso productivo.

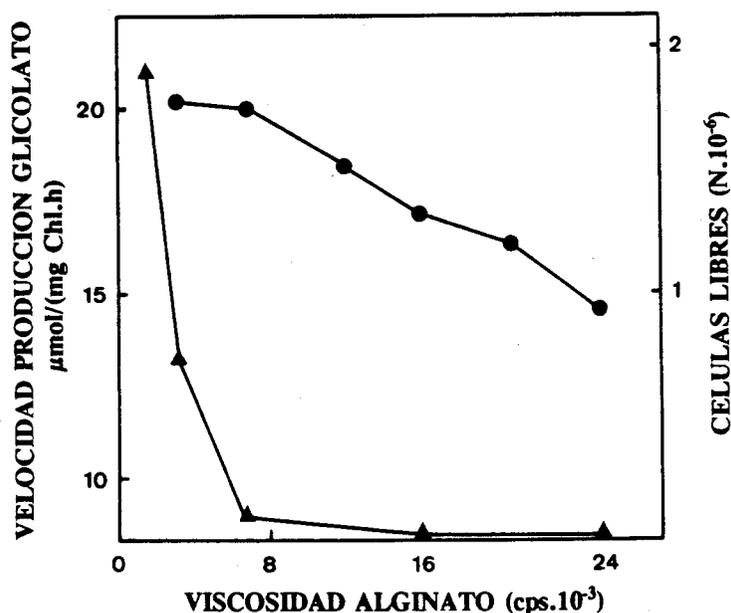


Fig. 27. Efecto de la viscosidad de la disolución de alginato sobre la producción de glicolato por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. Las células se inmovilizaron utilizando distintas disoluciones de alginato, cuya viscosidad se indica, y posteriormente se incubaron para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. En cada caso se determinó la velocidad de dicha producción (●) y la tasa de células libres en el medio de cultivo (▲).

2.3. Influencia de las condiciones ambientales y nutricionales

Efecto de la luz

Tal y como comentábamos al referirnos a la carga celular, la Figura 28 muestra que la producción de glicolato depende de la intensidad de la luz con que se iluminan los cultivos, tanto en el caso de células libres como inmovilizadas en alginato. La curva obtenida para las primeras muestra que se alcanza un máximo en la producción cuando la irradiación de las mismas se hace con luz blanca de una intensidad de 40 W/m², y se mantiene constante para intensidades superiores. Por el contrario, las células inmovilizadas presentan una velocidad máxima de producción de glicolato

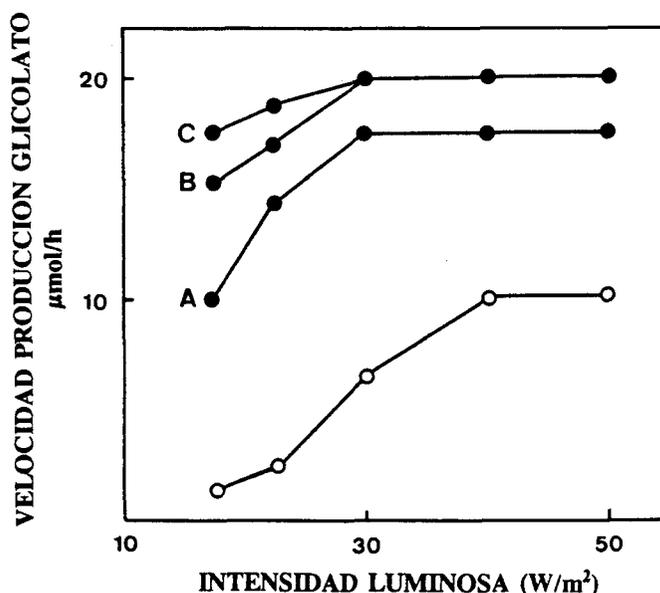


Fig. 28. Efecto de la intensidad luminosa sobre la producción de glicolato por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libres (○) o inmovilizadas en alginato cálcico (●, A=40, B=140, C=200 µg/g de soporte), para la producción de glicolato según se indica en Materiales y Métodos. A las intensidades luminosas indicadas se determinó la velocidad de dicha producción.

de 20 µmol/h cuando se irradian con una intensidad de luz de 30 W/m², manteniéndose igualmente constante para valores superiores de ésta. Estos resultados apoyan, en contra de lo que inicialmente podría pensarse, que la intensidad de luz que satura el proceso productivo es la misma independientemente de la carga celular utilizada, que en este estudio está entre 40 y 200 µg Chl/g de soporte. La figura que comentamos también muestra que el aumento en la velocidad de producción de glicolato dependiente de la luz es menos significativo a medida que aumenta la carga celular del sistema inmovilizado. Esta observación es coherente con los datos anteriormente mostrados sobre la producción de glicolato en relación

con la carga celular del sistema inmovilizado, donde existía un importante efecto pantalla por parte de las células más externas sobre aquellas en el interior del soporte, lo que limita la capacidad fotosintética de dicha población celular.

La Figura 29 muestra que la producción de glicolato es lineal durante al menos 8 h para los diferentes tipos de luz utilizada (blanca, azul, amarilla y roja). La luz blanca resultó ser la más eficaz, obteniéndose con luz azul un rendimiento 3 veces inferior al conseguido con la primera. Esta observación coincide con los datos de otros investigadores en *Euglena* (Lord et al. 1970) y *Chlorella* (Becker et al. 1968).

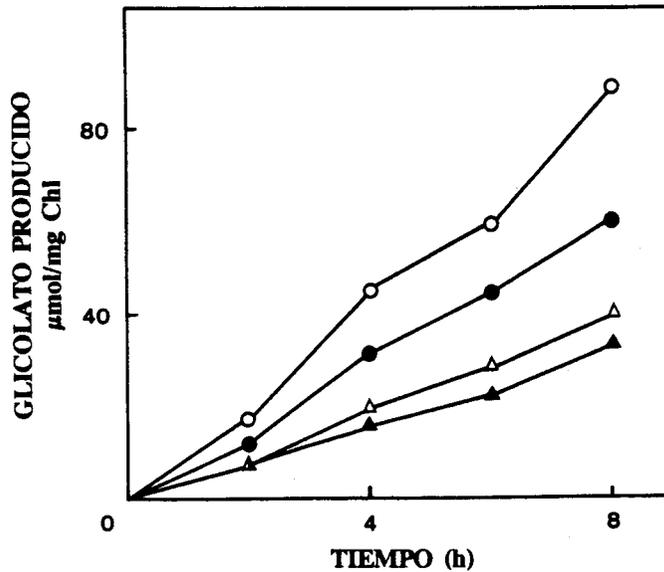


Fig. 29. Efecto de la calidad de la luz sobre la producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto que se iluminaron con luz blanca (○), azul (▲), amarilla (△) o roja (●). A los tiempos indicados se determinó en cada caso el glicolato producido. En todos los casos la intensidad luminosa fue de 40 W/m².

Efecto de la temperatura

La temperatura es un parámetro importante a la hora de considerar las condiciones óptimas de producción de glicolato por células libres o inmovilizadas de *C. reinhardtii*. La velocidad de producción es máxima, en el caso de células libremente suspendidas, a 30 °C, y decrece hasta un 20% de ese valor a temperaturas extremas de 15 ó 50 °C (Fig. 30). En el intervalo comprendido entre 25 y 35 °C las células pueden producir glicolato en cantidades próximas al 90% del valor máximo, y teniendo en cuenta que a 25 °C los cultivos de *C. reinhardtii* son más estables y se mantienen operativos durante periodos más largos de tiempo, es por lo que hemos seleccionado esta temperatura como la más adecuada para los experimentos de fotoproducción de glicolato.

Cuando se utilizaron células inmovilizadas se observa una dependencia análoga con la temperatura si bien las peculiares características que la inmovilización confiere al entorno celular ocasionan variaciones en la velocidad de producción de glicolato menos bruscas que las observadas para células libres, a valores extremos de temperatura.

Efecto del pH

El efecto del pH en la producción de glicolato, tanto en células libres como inmovilizadas de *C. reinhardtii*, se muestra en la Figura 31, que permite afirmar que dicha producción es máxima a pH 8,0, para ambos tipos de células, observándose una disminución de la actividad a otros valores de pH, que resulta más pronunciada en el caso de las células libremente suspendidas. Entre pH 6,5 y 8,5 el sistema de células inmovilizadas puede producir glicolato con una velocidad no inferior al 80% de la máxima obtenida a pH 8,0, lo que amplía las posibilidades de las células inmovilizadas.

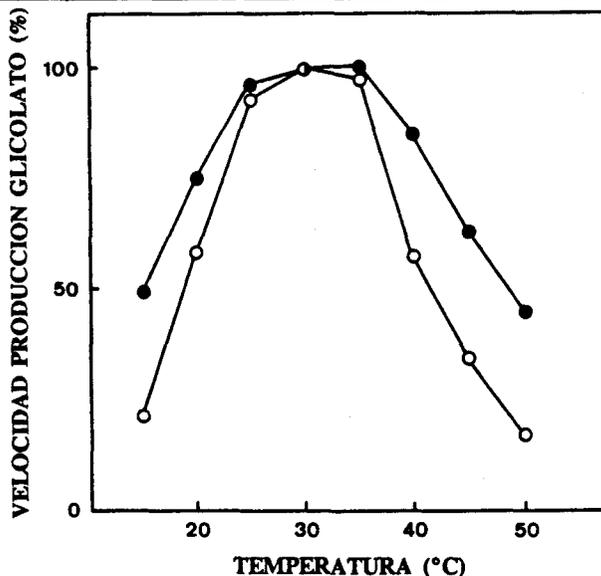


Fig. 30. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de producción de glicolato por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libres (○) o inmobilizadas en alginato cálcico (●), para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A las temperaturas indicadas se determinó la producción en unas u otras, siendo el 100% = 12 y 22 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$, respectivamente.

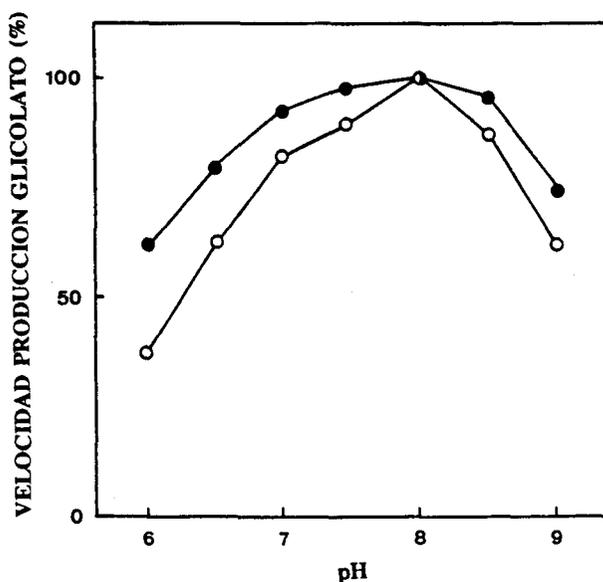


Fig. 31. Efecto del pH sobre la producción de glicolato por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libres (○) o inmobilizadas en alginato cálcico (●), para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto que en cada caso el pH se fijó con los siguientes tampones: 20 mM MES, entre pH 6 y 7, y 20 mM Tricina entre pH 7 y 9. El 100% de velocidad de producción fué: 12 y 22 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ para los sistemas libre e inmobilizado, respectivamente.

Efecto de la fuerza iónica

En la Figura 32 puede observarse que no existe influencia significativa de la fuerza iónica del medio sobre la tasa de producción de glicolato por células libres. Nosotros hemos utilizado en nuestros estudios de producción, tanto con células libres como inmovilizadas, 20 mM de tampón Tricina, pH 8,0, ya que el tampón fosfato disgregaba las perlas de alginato haciendo inviable su uso para el caso de células inmovilizadas. Algunos autores (Tolbert et al. 1983) basan el empleo de fuerzas iónicas más bajas en la interferencia que presentan otros iones al realizar análisis cromatográficos del producto excretado, pero no en relación con el rendimiento del proceso, lo que es coherente con nuestras observaciones.

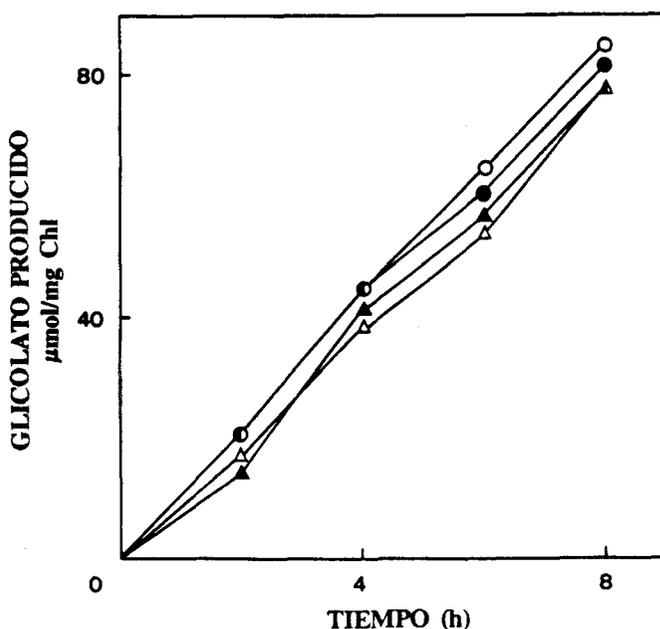


Fig. 32. Efecto de la fuerza iónica sobre la producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, utilizando en cada caso las concentraciones de tampón Tricina indicadas a continuación: 5 mM (▲), 10 mM (△), 15 mM (○) y 20 mM (●).

Efecto de la fuente de nitrógeno

En la Figura 33 podemos observar que la fotoproducción de glicolato en un periodo de tiempo relativamente largo (8 h) es independiente de la fuente de nitrógeno utilizada en el cultivo. Resultados análogos se obtuvieron con urea como única fuente de nitrógeno, si bien estos datos no se muestran. No obstante, la producción de glicolato fue más baja durante las primeras horas cuando se utilizó amonio, alcanzando los valores normales al adicionar AOA 5 mM al medio de cultivo, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Krampitz y Yarris (1983) en *Chlorella*.

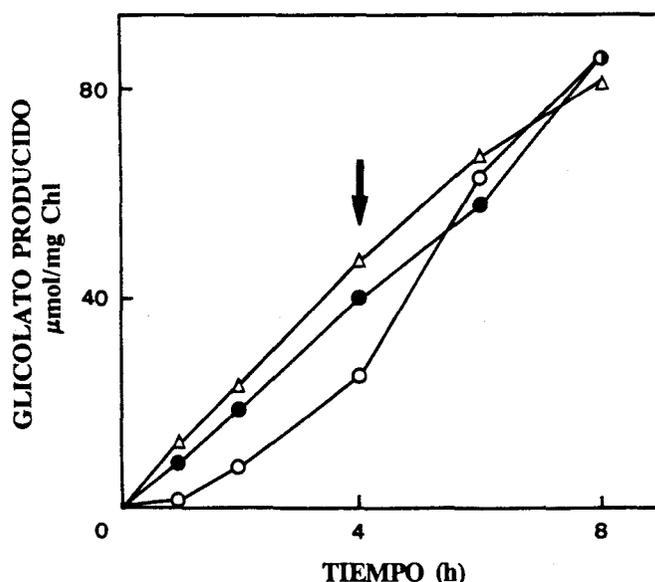


Fig. 33. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, adicionando a $t=0$ las siguientes fuentes nitrogenadas: NH_4^+ 5 mM (○), NO_2^- 5 mM (●) y NO_3^- 5 mM (△). La flecha indica el momento en que se añadió a cada cultivo AOA 5 mM. A los tiempos indicados se determinó el glicolato producido en cada caso.

3. SISTEMAS DE PRODUCCION DE GLICOLATO A LARGO PLAZO POR CELULAS DE *C. reinhardtii*

Una vez caracterizados los parámetros que condicionan la producción de glicolato por células de *C. reinhardtii* libres e inmovilizadas en alginato cálcico, nos proponemos diseñar estrategias que sostengan dicha producción, durante el mayor tiempo posible, en ambos tipos de células. En un primer estadio hemos determinado cuánto tiempo y en qué cuantía puede mantenerse la fotoproducción continua de glicolato. En una segunda fase y mediante el tratamiento de las células en alto CO₂ después de cada periodo de fotoproducción, conseguimos obtener un sistema de fotoproducción discontinua de glicolato, que puede sostenerse durante varios días.

3.1. Producción continua por células libres

Cuando células de *C. reinhardtii* se cultivan e incuban para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, se puede mantener una producción continua durante 12 h, como se observa en la Figura 34. La producción es lineal en el tiempo y alcanza un máximo de 152 $\mu\text{mol/mg Chl}$ para una concentración de clorofila en el cultivo de 30 $\mu\text{g/ml}$. Transcurrido dicho periodo el glicolato se consume por las células hasta que desaparece completamente del medio tras 36 h de proceso. El consumo de glicolato es igualmente lineal entre las 14 y las 36 h, permaneciendo la clorofila constante a lo largo de dicho proceso. El control realizado adicionando más AOA al cultivo demostró que el fenómeno no es consecuencia de la metabolización y desaparición de este inhibidor del medio de cultivo (Fig. 35).

El punto de inflexión en la producción de glicolato debe ser considerado y es importante determinar qué factores lo controlan y, sobre todo, si la producción puede prolongarse en el tiempo. Los datos vistos anteriormente apuntan a una posible influencia del mecanismo concentrador de CO₂ que algas y cianobacterias inducen cuando crecen a bajas concentraciones de

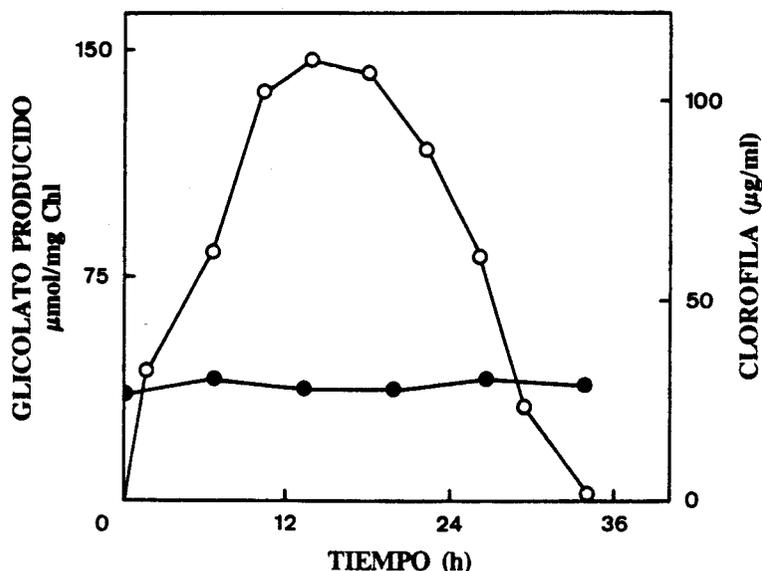


Fig. 34. Cinética de la producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó el glicolato producido (○) y la clorofila del medio (●).

CO₂ (Badger et al. 1980; Kaplan et al. 1980). La participación decisiva de la enzima anhidrasa carbónica en el mecanismo antes mencionado (Shiraiwa y Miyachi 1985) concentra CO₂ en el microambiente de la Rubisco, disminuyendo la relación O₂/CO₂, y por tanto la tasa de fotorrespiración (biosíntesis de glicolato), y activando consecuentemente el ciclo de Calvin para la fijación del CO₂. La adición al cultivo de 0,1 mM de acetazolamida, inhibidor de la actividad anhidrasa carbónica, con el objeto de estudiar la posible activación de esta enzima, condujo a los resultados mostrados en la Figura 35. De los mismos se deduce que en el momento en que la producción de glicolato comienza a decaer, la acetazolamida provocó un incremento de un 25% en dicha producción durante un periodo adicional de

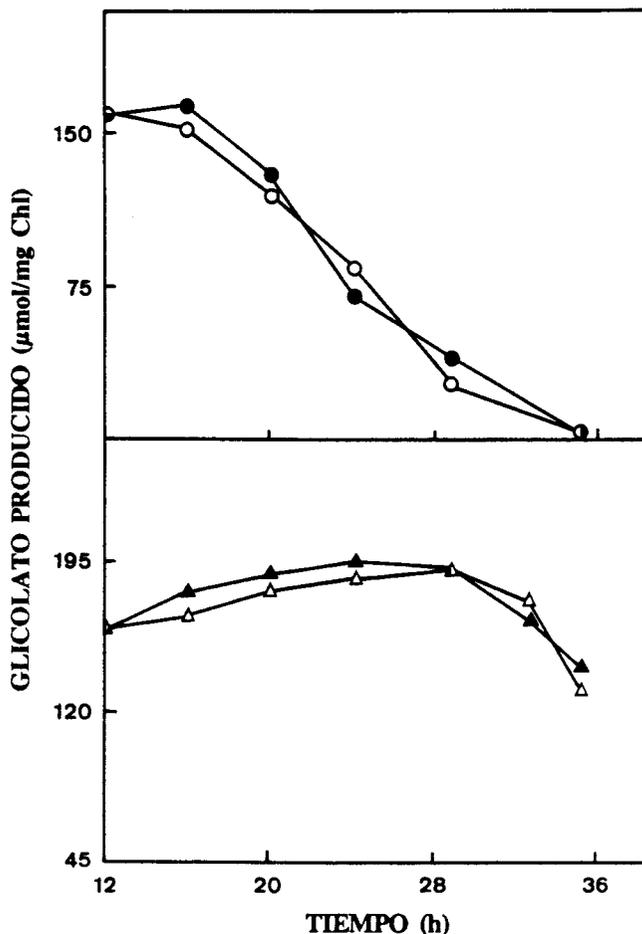


Fig. 35. Efecto de aminooxiacetato y acetazolamida sobre el consumo de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Tras 12 h de producción continua, el cultivo se dividió en cuatro alícuotas iguales, una de las cuales se dejó como control (O), y las restantes se sometieron a distintos tratamientos, según se indica a continuación: acetazolamida 0,1 mM (▲), acetazolamida 0,1 mM + aminooxiacetato 1 mM (Δ), y aminooxiacetato 1 mM (●). A los tiempos indicados se determinó en cada caso el glicolato en el medio de cultivo.

12 h, comenzando a decrecer posteriormente, incluso después de adicionar nuevamente acetazolamida. No se ha observado efecto sinérgico alguno sobre la producción de glicolato al añadir simultáneamente AOA y acetazolamida al cultivo de *C. reinhardtii*.

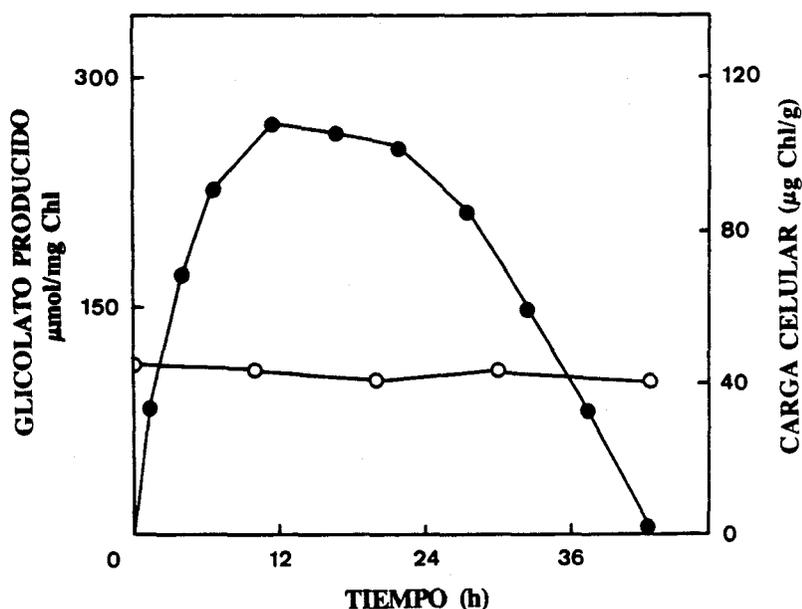


Fig. 36. Cinética de la producción de glicolato por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. Las células se inmovilizaron en alginato cálcico y posteriormente se incubaron para la producción de glicolato según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó el glicolato producido (●) y la carga celular inmovilizada (○).

3.2. Producción continua por células inmovilizadas

Cuando utilizamos células inmovilizadas en alginato se excreta glicolato al medio continuamente durante las primeras 12 h, según se observa en la Figura 36. Esta excreción se realiza de forma lineal con el tiempo hasta alcanzar un valor máximo de $270 \mu\text{mol/mg Chl}$, para una carga celular de $40 \mu\text{g/g}$ de soporte. A partir de entonces se aprecia un descenso continuo del glicolato acumulado en el medio hasta su práctica desaparición 42 h después de iniciado el proceso. La duración de la excreción de glicolato al medio es análoga a la observada cuando se utilizan células libremente suspendidas, indicando ésto que la inmovilización celular no afecta significativamente al declive observado. Sin embargo dicho tratamiento es beneficioso, ya que la velocidad de producción de glicolato por células

inmovilizadas resulta ser el doble de la observada para células libremente suspendidas. La carga celular permanece constante, 40 $\mu\text{g/g}$ de soporte, a lo largo del experimento.

3.3. Producción discontinua por células libres o inmovilizadas

Con objeto de prolongar el proceso productivo de glicolato estimamos que sería interesante recuperar las células resuspendiéndolas en medio fresco de cultivo con alto CO_2 y sin inhibidores. La Figura 37 muestra la producción de glicolato por células de *C. reinhardtii* en libre suspensión que han sido previamente sometidas a un periodo de 12 h de producción y un tiempo variable de recuperación en alto CO_2 . Las células que residieron 2 y 4 h en alto CO_2 alcanzaron un valor máximo de producción en torno a 20 $\mu\text{mol/mg Chl}$ en 8 h.

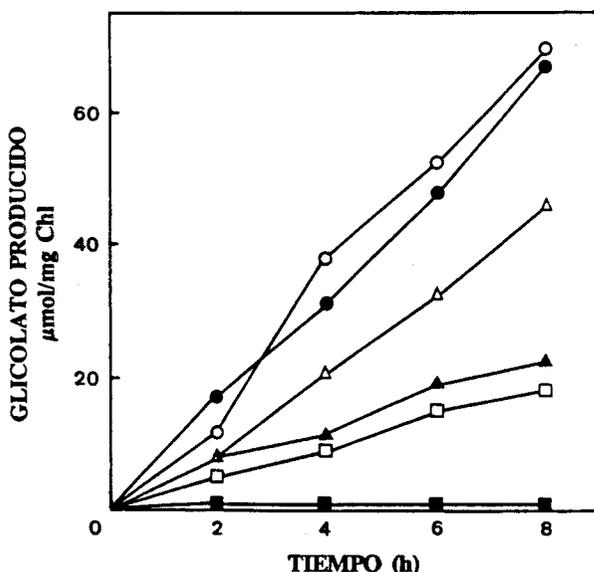


Fig. 37. Recuperación por CO_2 de la capacidad de producción de glicolato por células libres de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron para la producción de glicolato según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, y después de 12 h de producción continua, se repartieron en alícuotas iguales y los correspondientes cultivos se gasearon con aire enriquecido (5% CO_2) durante los siguientes tiempos: control (■), 2 h (□), 4 h (▲), 7 h (△), 9 h (●) y 12 h (○). Posteriormente se retornaron a las condiciones de producción de glicolato, cuya velocidad se determinó en cada caso.

Por su parte cuando el tiempo de residencia de las células en alto CO_2 se eleva más de 9 h se alcanza un máximo en el segundo periodo de producción en torno a $70 \mu\text{mol}/\text{mg Chl}$. El valor de producción de glicolato obtenido en el segundo ciclo es inferior en un 15% al mostrado en el primer ciclo por las mismas células, descenso que se vuelve a observar en ciclos posteriores, aplicando tiempos de residencia en alto CO_2 de 12 h.

A partir de estos datos se diseñó un sistema discontinuo de producción de glicolato por células de *C. reinhardtii*, que se recoge en la Figura 38, y donde se alternan sucesivamente periodos de 12 h de producción con otros de recuperación en alto CO_2 .

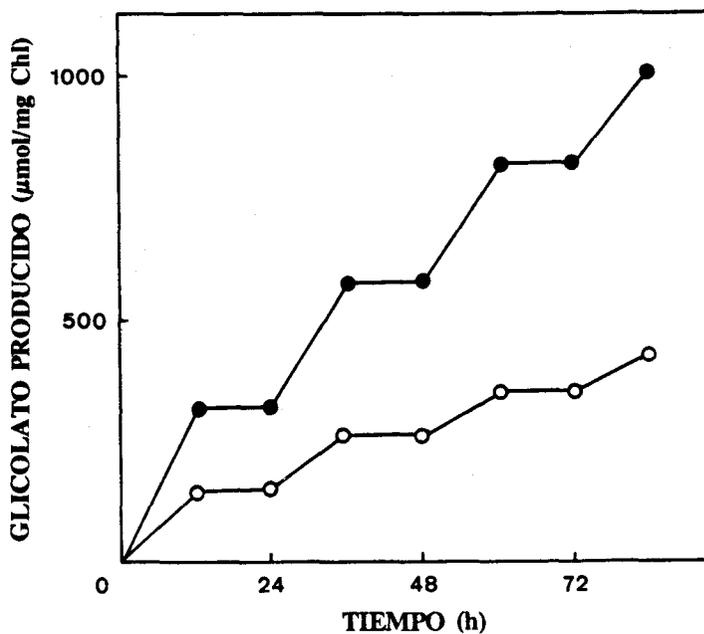


Fig. 38. Fotoproducción discontinua de glicolato por células de *C. reinhardtii*. Sistemas de células libres (○) o inmobilizadas en alginato cálcico (●) se incubaron durante 12 h para la producción de glicolato y posteriormente se recogieron, lavaron y resuspendieron en medio fresco de cultivo sin inhibidor y se gasearon durante otras 12 h con aire enriquecido con CO_2 al 5% (platos característicos). Se alternaron sucesivamente dichos cambios durante las 84 h que duró el experimento. La clorofila total utilizada en cada caso fue de 2.500 y 1100 μg , respectivamente.

Como se observa en la mencionada figura los valores productivos en el caso de células inmobilizadas son aproximadamente el doble que para las células libres, manteniéndose en cada caso los sistemas produciendo glicolato durante 84 h de forma discontinua.

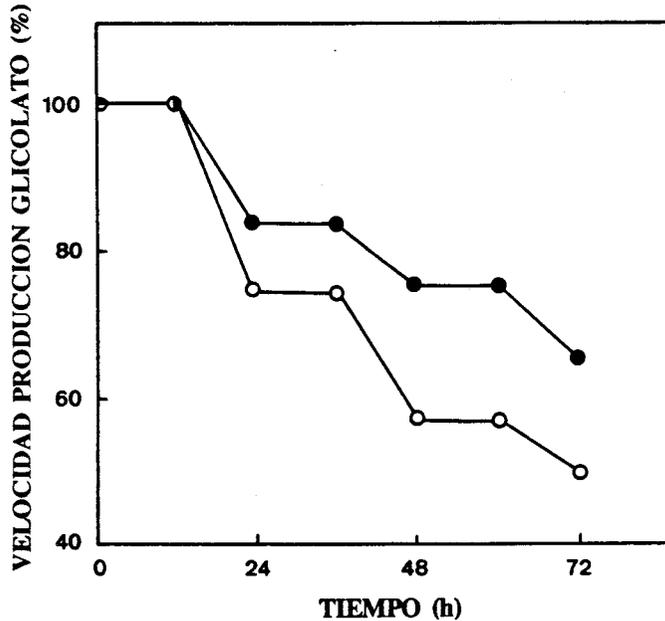


Fig. 39. Evolución de las velocidades de producción de glicolato por células de *C. reinhardtii* durante los periodos de fotoproducción discontinua. Las células se incubaron libres (○) o inmobilizadas en alginato cálcico (●) para la producción de glicolato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó en cada caso la velocidad de producción, 100% = 10 y 22 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$, respectivamente.

En la Figura 39 vemos cómo se afectan las velocidades de producción de glicolato con los periodos de recuperación celular en alto CO_2 . También aquí se observa que las velocidades obtenidas para el sistema de células inmobilizadas se mantienen proporcionalmente más elevadas que aquellas obtenidas para el sistema de células libremente suspendidas, en cada periodo de producción. Después de 4 periodos de fotoproducción discontinua, las células inmobilizadas retienen un 65% de su capacidad inicial de producción de glicolato, acumulando en el medio una

concentración del mismo (Fig. 41) prácticamente igual que en el caso de las células libremente suspendidas (Fig. 40), con la mitad de biomasa que éstas, lo que supone un rendimiento doble en la fotoproducción de glicolato. Por su parte, las células libres sólo mantienen un 55% de su capacidad inicial de producción de glicolato tras los 4 periodos productivos desarrollados. En términos de velocidad media, a lo largo de 72 h las células inmovilizadas producen $14 \mu\text{mol glicolato}/(\text{mg Chl.h})$ por 5 las libremente suspendidas.

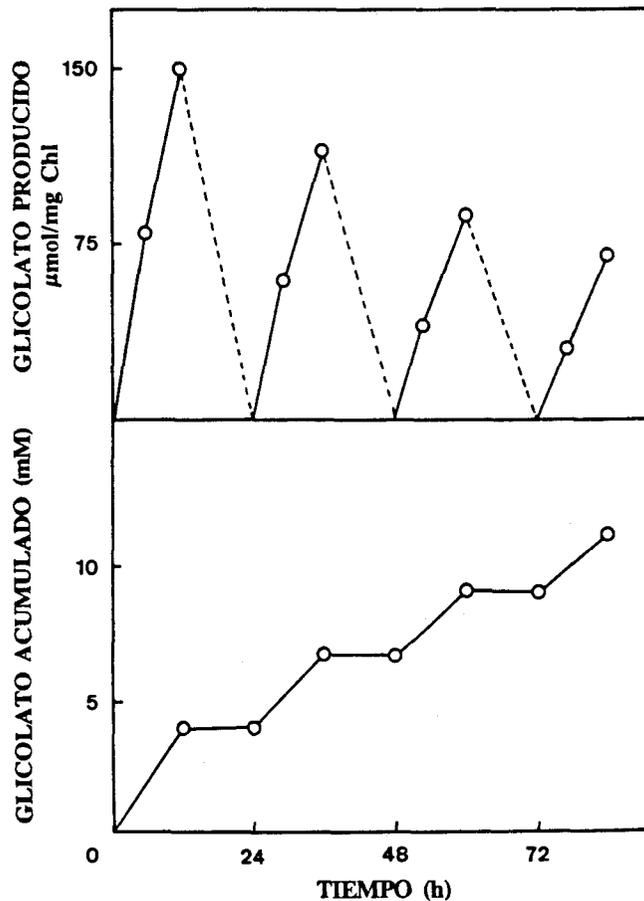


Fig. 40. Evolución de la producción y acumulación de glicolato en el medio durante la fotoproducción discontinua por células libres de *C. reinhardtii*. Se procedió de forma análoga a la descrita en la Figura 38, utilizando la misma densidad celular, y a los tiempos indicados se determinó el glicolato producido y acumulado en el medio de cultivo.

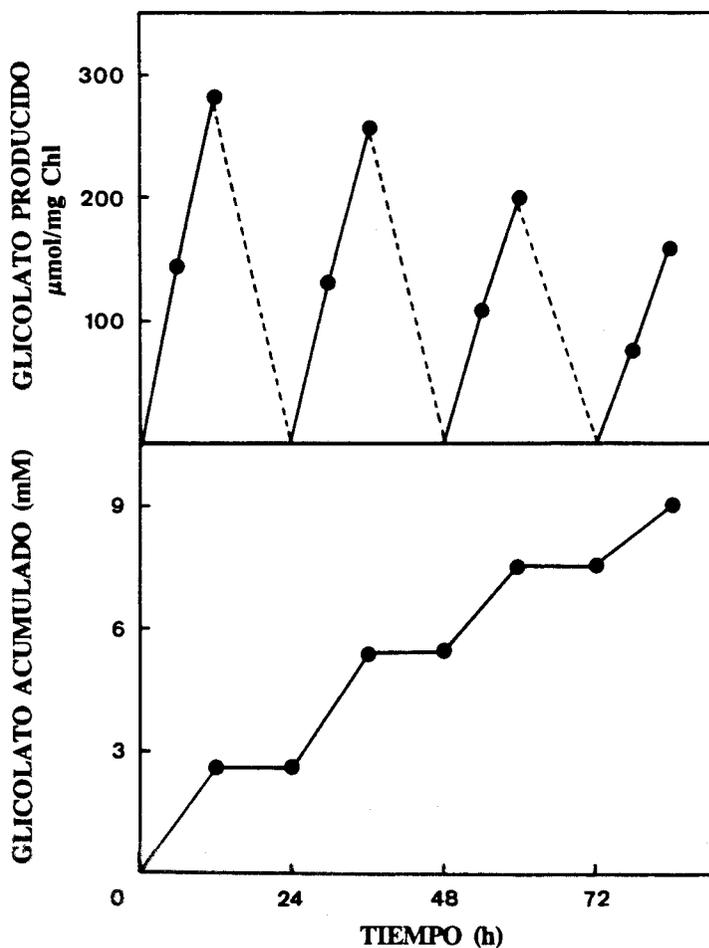


Fig. 41. Evolución de la producción y acumulación de glicolato en el medio durante la fotoproducción discontinua por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. Se procedió de forma análoga a la descrita en la Figura 38, utilizando la misma carga celular, y a los tiempos indicados se determinó el glicolato producido y acumulado en el medio de cultivo.

Finalmente, en la Tabla 4 se comparan las velocidades obtenidas en la producción de glicolato por células libres o inmovilizadas en alginato, así como su estabilidad durante el almacenamiento a 4°C. El sistema inmovilizado fotoproduce glicolato a una velocidad dos veces superior a la mostrada por las células libremente suspendidas, mostrándose más eficaz el sistema cálcico que el bórico, que presenta una velocidad de fotoproducción de 17 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$. Como se deduce de los datos mostrados en dicha Tabla, el sistema de células inmovilizadas en alginato cálcico retuvo prácticamente en su totalidad la capacidad de producción de glicolato, transcurridos dos meses desde el proceso de inmovilización.

Tabla 4. Fotoproducción de glicolato por células libres e inmovilizadas de *C. reinhardtii*

SISTEMA CELULAR	GLICOLATO PRODUCIDO ($\mu\text{mol}/\text{mg Chl.h}$)
Libre	12
Inmovilizado	
Alginato-Ba	17
Alginato-Ca	23
Alginato-Ca (tras 2 meses)	20

El glicolato se determinó en suspensiones conteniendo células libres (25-30 $\mu\text{g Chl/ml}$) o perlas de alginato (40 $\mu\text{g Chl/g soporte}$)

4. CARACTERIZACION DEL CONSUMO DE NITRITO POR CELULAS DE *C. reinhardtii*

Una parte importante de este trabajo se ha centrado en el estudio del comportamiento de las células de *C. reinhardtii* de cara al consumo de nitrito, cuando se encuentran inmovilizadas por atrapamiento en alginato cálcico. Con ello se pretende caracterizar los parámetros que influyen de forma más relevante en dicho consumo, desde los factores medioambientales hasta los nutricionales, así como las propias condiciones de inmovilización. De esta forma podremos definir un sistema que nos permita, con ayuda de biorreactores de lecho fluidizado y como comentaremos en el apartado 5 de Resultados, sondear las posibles aplicaciones que esta microalga inmovilizada pueda tener en el campo de la bioeliminación de contaminantes químicos en aguas, y más concretamente, N-contaminantes como el nitrito.

4.1. Influencia de las condiciones de inmovilización

Efecto de la carga celular

Al igual que se mostró en apartados anteriores para oxígeno y glicolato, la carga celular resulta determinante en la tasa de consumo de nitrito por células inmovilizadas en alginato.

En la Figura 42 se muestra la variación de la velocidad de consumo observada para distintas cargas celulares inmovilizadas en alginato cálcico. De los resultados obtenidos se deduce que el aumento de la carga celular inicialmente inmovilizada origina una disminución en la velocidad de consumo de nitrito, que se hace más moderada a partir de 60 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte y apenas apreciable cuando se superan los 100 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte en la carga (resultados no mostrados). En general, el descenso de la velocidad de consumo de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii* va acompañado paralelamente de una disminución en la actividad fotosintética mostrada por las células en estas condiciones, hecho que se ha

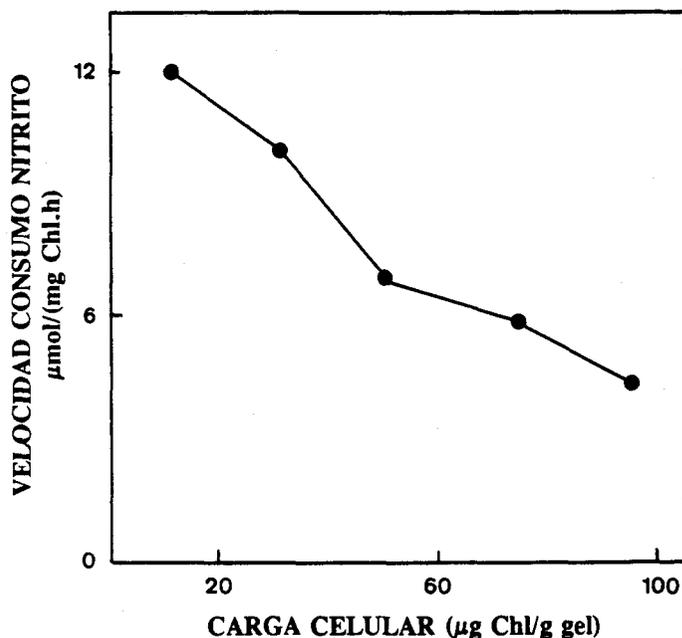


Fig. 42. Efecto de la carga celular sobre la velocidad de consumo de nitrato por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. Sistemas de células inmovilizadas en alginato cálcico, conteniendo las cargas indicadas, se utilizaron para el consumo de nitrato, según se indica en Materiales y Métodos, y cuya velocidad se determinó en cada caso.

detallado anteriormente (ver Fig. 12). Nuestros datos indican que una carga celular inmovilizada equivalente a $15 \mu\text{g Chl/g}$ de soporte permite una velocidad de consumo de nitrato en torno a $12 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl}\cdot\text{h})$, mientras que, inmovilizando inicialmente una carga de $100 \mu\text{g Chl/g}$ de soporte, dicha velocidad puede disminuir hasta $4 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl}\cdot\text{h})$, lo que supone un 30 % del valor obtenido para la carga celular más baja de las estudiadas. Por otra parte, puede observarse que para una carga celular de $30\text{-}40 \mu\text{g Chl/g}$ de soporte, adecuada en el estudio de otras actividades biológicas, la velocidad de consumo de nitrato es razonablemente buena y permite disponer de un sistema con buen rendimiento y rápido crecimiento celular. Por ello sería conveniente no sobrepasar las cargas iniciales mencionadas,

ya que de lo contrario se presentarían los problemas de:

a) efecto de pantalla, para la luz, de las células más externas sobre las más internas de las perlas de alginato.

b) efecto de pantalla, para la difusión del nitrito, de las células más externas sobre las más internas.

c) restricciones difusionales del nitrito en el soporte.

Efecto de la concentración de la suspensión de alginato

La difusión del nitrito hasta las células inmovilizadas en los poros de la matriz empleada estará condicionada por la concentración que de ésta se haya empleado en la preparación de las perlas.

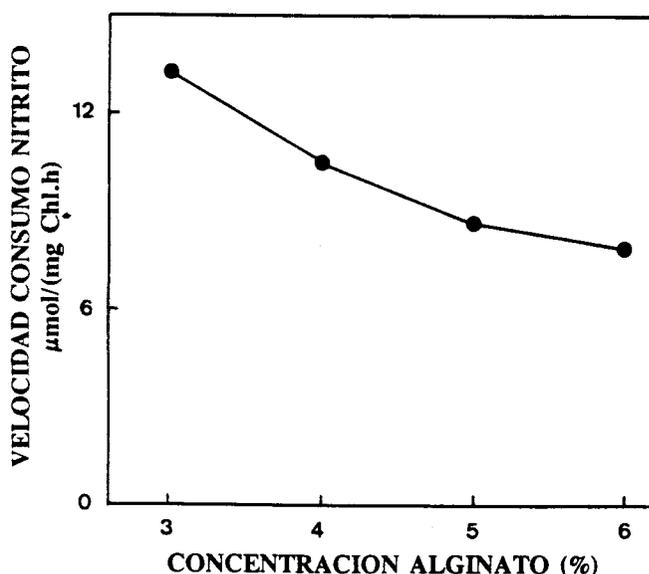


Fig. 43. Efecto de la concentración de la disolución de alginato sobre el consumo de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*. Sistemas de células inmovilizadas con disoluciones de alginato de las concentraciones indicadas se utilizaron para el consumo de nitrito, cuya velocidad se determinó en cada caso. Más detalles se especifican en Materiales y Métodos.

La Figura 43 muestra que la velocidad de consumo de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii* disminuye significativamente a medida que se aumenta la concentración de la disolución de alginato utilizada en el proceso de inmovilización. Dicha velocidad es de $13 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ para una concentración de alginato del 3 % (p/v), y cae hasta $8 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ cuando la concentración de alginato es de un 6 %. Un comportamiento semejante mostraron las actividades respiratoria y fotosintéticas cuando se determinaron en células inmovilizadas de este alga (ver Fig. 13).

4.2. Influencia de las condiciones ambientales y nutricionales en células libres e inmovilizadas

Efecto de la intensidad luminosa

En la Figura 44 se muestra el efecto de la intensidad de luz con que se irradian los cultivos de células libremente suspendidas o inmovilizadas sobre la velocidad de consumo de nitrito por las mismas. Esta aumenta linealmente con la intensidad de luz, observándose en el intervalo estudiado, para las células libremente suspendidas, unos valores extremos de $9,5 \mu\text{mol nitrito}/(\text{mg Chl.h})$, irradiando los cultivos con $50 \text{ W}/\text{m}^2$ de luz blanca, y de $6,5 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ para $15 \text{ W}/\text{m}^2$. Este descenso en la velocidad de consumo de nitrito es más pronunciado para las células inmovilizadas, que presentan un valor de $14 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a $50 \text{ W}/\text{m}^2$ y de $7,5 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a $15 \text{ W}/\text{m}^2$, lo que supone un descenso de un 50% respecto a la velocidad máxima de consumo, frente al 30% mostrado por el sistema de células libres.

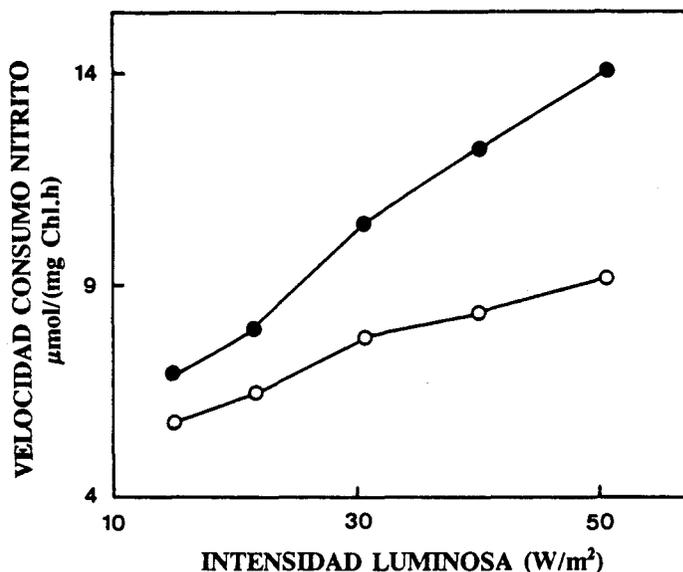


Fig. 44. Efecto de la intensidad luminosa sobre el consumo de nitrato por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libremente suspendidas (○) o inmobilizadas en alginato cálcico (●), para determinar la velocidad de consumo de nitrato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, a los distintos valores de intensidad luminosa indicados.

Efecto de la carencia de CO_2

Las células de *C. reinhardtii* requieren CO_2 para consumir nitrato, de tal forma que al cabo de 1,5 h en ausencia de fuente carbonada, pierden la capacidad de consumirlo. En este contexto hemos estudiado la cinética con que las células así tratadas recuperan su capacidad de consumir nitrato en presencia de CO_2 . La Figura 45 muestra cómo, al suministrar nuevamente carbono a las células (tiempo cero), la velocidad de consumo de nitrato aumenta progresivamente hasta alcanzar valores máximos transcurridos unos 40 min desde la reposición del CO_2 . El fenómeno se observa tanto en células libres como inmobilizadas, sin embargo las formas de las curvas son diferentes. En el caso de las células libres, se produce, después de un

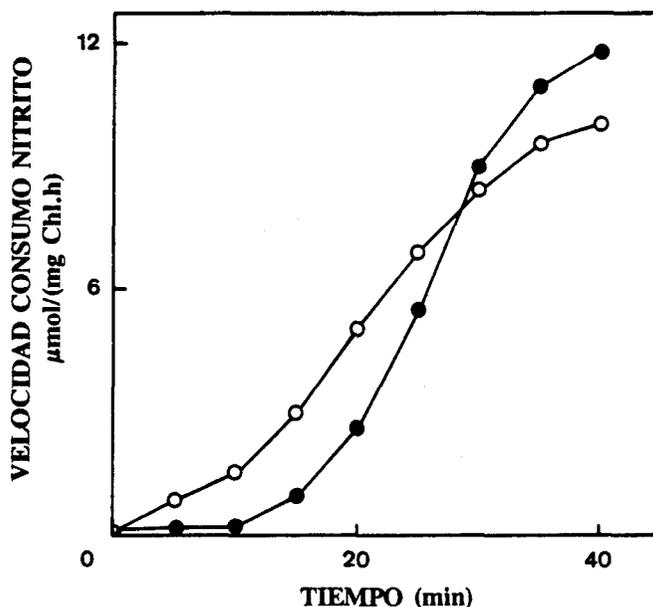


Fig. 45. Efecto de la carencia de carbono sobre el consumo de nitrato por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libremente suspendidas (○) o inmovilizadas en alginato cálcico (●), durante 1,5 h en ausencia de CO₂, que se conseguía burbujeándolas con aire libre de CO₂. Posteriormente (tiempo cero) se repuso el CO₂ al cultivo y a los tiempos indicados se determinó la velocidad de consumo de nitrato. Más detalles en Materiales y Métodos.

periodo de retardo de unos 10 min, un incremento aproximadamente lineal en la velocidad de consumo de nitrato, alcanzando a los 40 min un máximo de 10 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$, que se estabiliza para periodos de tiempo más prolongados. Por el contrario, en las células inmovilizadas se observa que no existe consumo de nitrato durante los 10 primeros min que siguen a la reposición de la fuente de carbono, incrementándose la velocidad de consumo desde entonces hasta alcanzar un máximo en torno a 12 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a los 40 min, el cuál se mantiene aproximadamente constante durante periodos de tiempo superiores. Este retardo en la respuesta de las células inmovilizadas está intrínsecamente relacionado con el cambio de situación física que soportan respecto a las células libremente suspendidas, como consecuencia de su atrapamiento en el soporte.

Efecto de la temperatura

En la Figura 46 se muestra la variación de la velocidad de consumo de nitrito por células libres o inmovilizadas de *C. reinhardtii* en función de la temperatura a la que se incuban los cultivos. El consumo por células libres presenta un máximo de $11,5 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a 30°C , descendiendo hasta $3,5 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a 45°C y 15°C . Una variación de 10°C por encima o debajo de la temperatura óptima provoca un descenso en la velocidad de consumo de nitrito hasta un 50% de su valor máximo. El consumo de nitrito por células inmovilizadas presenta un máximo de $14 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a 30°C , descendiendo hasta $7,5 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a 45°C y $8,5 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a 15°C . Dicho máximo desciende hasta un 75% de su valor al medir el consumo 10°C por encima o por debajo de la temperatura óptima.

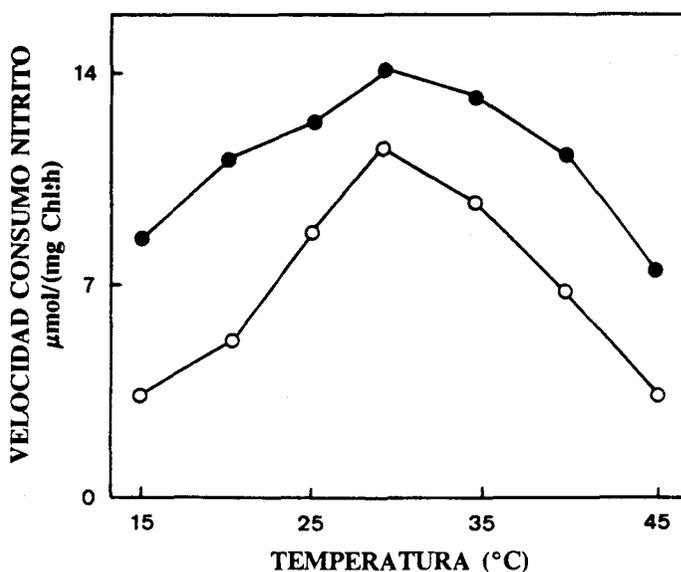


Fig. 46. Efecto de la temperatura sobre el consumo de nitrito por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libremente suspendidas (○) o inmovilizadas en alginato cálcico (●), para determinar la velocidad de consumo de nitrito a las distintas temperaturas indicadas. Más detalles experimentales en Materiales y Métodos.

Tres hechos pueden deducirse de los datos obtenidos:

a) el máximo consumo de nitrito por células inmovilizadas se produce a la misma temperatura que la mostrada por las células libres.

b) el sistema de células inmovilizadas puede operar, en un amplio intervalo de temperatura (20-40°C), con rendimientos en el consumo de nitrito superiores al 75% de la velocidad máxima observada, apreciándose para las células libres en dicho intervalo descensos de hasta un 50% en la velocidad máxima de consumo.

c) los valores de velocidad de consumo de nitrito obtenidos con las células inmovilizadas son superiores a los mostrados por las células libres en todo el intervalo de temperatura estudiado (15-45°C). La forma de la curva es más ancha para las primeras que para las segundas, es decir, las variaciones del consumo de nitrito son menos bruscas en el sistema de células inmovilizadas, a medida que nos alejamos del valor óptimo de temperatura, indicándonos un sistema con más posibilidades.

Efecto del pH

En la Figura 47 se muestra la variación de la velocidad de consumo de nitrito por células libres o inmovilizadas de *C. reinhardtii* a distintos valores de pH. Para las células libremente suspendidas se observa una velocidad máxima a pH 6,0 de 10 $\mu\text{mol nitrito}/(\text{mg Chl.h})$, que decrece significativamente para valores superiores o inferiores de pH, alcanzando un consumo de 2 $\mu\text{mol nitrito}/(\text{mg Chl.h})$ a pH 9,0 y de 6 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a pH 5,0. El descenso en la velocidad de consumo de nitrito producido en una unidad de pH anterior o posterior al máximo para las células libres, se encuentra en torno a un 40% del valor máximo mostrado por las células a pH 6,0. El sistema de células inmovilizadas en alginato cálcico presenta un máximo en la velocidad de consumo de nitrito de 12 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a pH 6,5, que disminuye hasta 5 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a pH 9,0 y 8,5 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ a pH 5,0. Dicha velocidad de consumo no es inferior a un 80% de la máxima cuando se observa en una unidad de pH mayor o menor que el

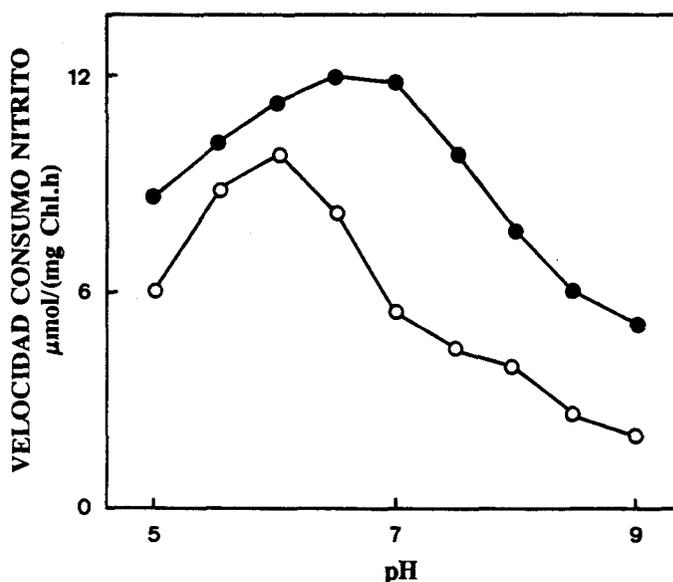


Fig. 47. Efecto del pH sobre el consumo de nitrato por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libremente suspendidas (○) o inmobilizadas en alginato cálcico (●), para determinar la velocidad de consumo de nitrato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, pero a los distintos valores de pH indicados que se fijaron con los tampones MES 20 mM, entre pH 6 y 7, y Tricina 20 mM, entre pH 7 y 9.

pH óptimo (6,5). De los resultados observados en la figura, puede deducirse que:

a) existe un desplazamiento del máximo consumo de nitrato por células inmobilizadas hacia valores de pH más básicos que en el caso de las libremente suspendidas

b) el sistema de células inmobilizadas puede operar, con rendimientos en el consumo de nitrato por encima del 80% de la velocidad máxima observada, en un amplio intervalo de pH (5,5-7,5), mientras que en el caso de las células libres, la velocidad disminuye apreciablemente cuando nos desviamos del pH óptimo.

c) los valores de velocidad de consumo de nitrato observados a los distintos pH empleados, son en todos los casos superiores para las células inmobilizadas respecto a las libremente suspendidas.

4.3. Estudios cinéticos del consumo de nitrito por células libres e inmobilizadas

Estimación de la K_s para el nitrito por células inmobilizadas

En la Figura 48 se recogen los resultados obtenidos al determinar el valor de la K_s para el nitrito por células inmobilizadas en alginato cálcico, realizando la representación de dobles inversos de Lineweaver-Burk, obteniéndose un valor aproximado de la K_s en torno a $80 \mu\text{M}$, bastante mayor que $1,5 \mu\text{M}$, estimado para células libremente suspendidas (Córdoba et al. 1986). Los datos de velocidad se obtuvieron empleando una carga de células inmobilizadas de $40 \mu\text{g Chl/g}$ de soporte, preparando una disolución de alginato del 3 % para realizar la inmobilización celular.

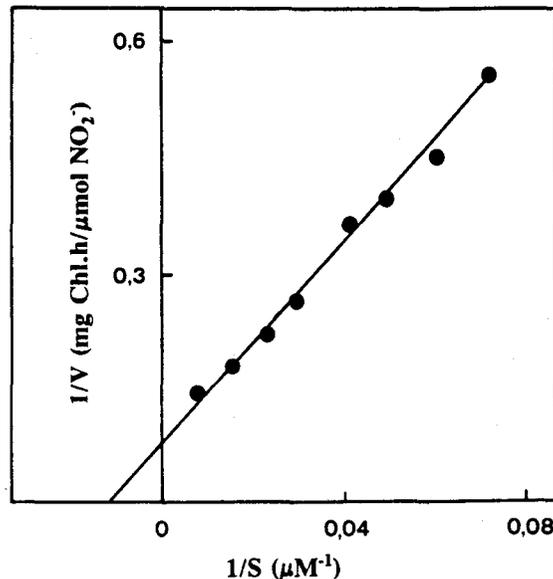


Fig. 48. Estimación del valor de K_s para el nitrito en células inmobilizadas de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron inmobilizadas en alginato cálcico, para determinar la velocidad de consumo de nitrito, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, pero utilizando distintas concentraciones de nitrito. Para determinar la K_s correspondiente los datos se procesaron según el modelo gráfico de Lineweaver-Burk.

Inhibición por amonio

La Figura 49 muestra las velocidades de consumo de nitrito en células de *C. reinhardtii*, libres e inmovilizadas, en presencia de distintas concentraciones de amonio. El sistema de células libres muestra un descenso lineal en dicha velocidad ante un aumento de la concentración de amonio en el medio de cultivo. Para una densidad celular equivalente a 30 $\mu\text{g Chl/ml}$ en el medio de incubación, el consumo de nitrito no es detectable empleando una concentración de amonio de 200 μM , siendo la concentración inicial de nitrito utilizada de 300 μM .

En el sistema de células inmovilizadas pueden apreciarse dos efectos significativos:

a) la inhibición por amonio del consumo de nitrito es siempre mucho más baja en el sistema de células inmovilizadas, independientemente de la carga, que en el de células libres.

b) cuanto más alta es la carga celular inmovilizada, la inhibición del consumo de nitrito por amonio es más baja.

Efecto del tiempo de almacenamiento de las células

En la Figura 50 se observan los resultados obtenidos al determinar la velocidad de consumo de nitrito en células de *C. reinhardtii*, libres o inmovilizadas en alginato cálcico, tras someterlas a distintos periodos de almacenamiento a 4°C. Mientras que las células libres sufren un fuerte descenso en dicho consumo, haciéndose prácticamente nulo al cabo de tres días, las células inmovilizadas podían reutilizarse cinco días después mostrando una velocidad de consumo de nitrito en torno al 90 % de la inicialmente observada tras el proceso de inmovilización.

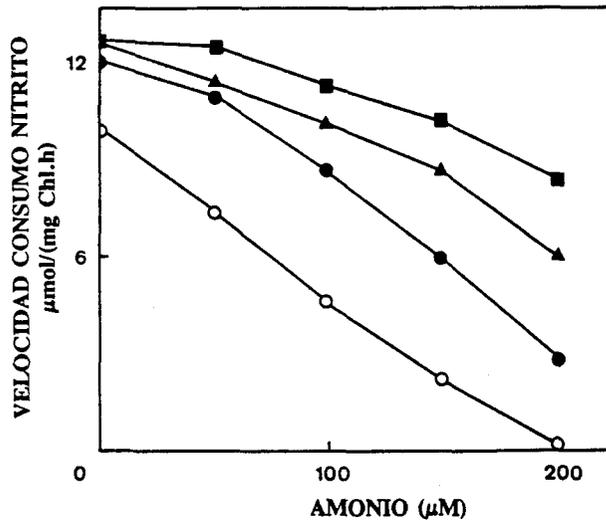


Fig. 49. Efecto de la concentración de amonio en el medio sobre el consumo de nitrito por células de *C. reinhardtii*. Las células se incubaron, libremente suspendidas (○) o inmobilizadas en alginato cálcico, para determinar la velocidad de consumo de nitrito, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, pero en presencia de las distintas concentraciones de amonio indicadas. En los sistemas inmobilizados, las cargas celulares fueron: 15 (●), 60 (▲), y 100 (■) $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte.

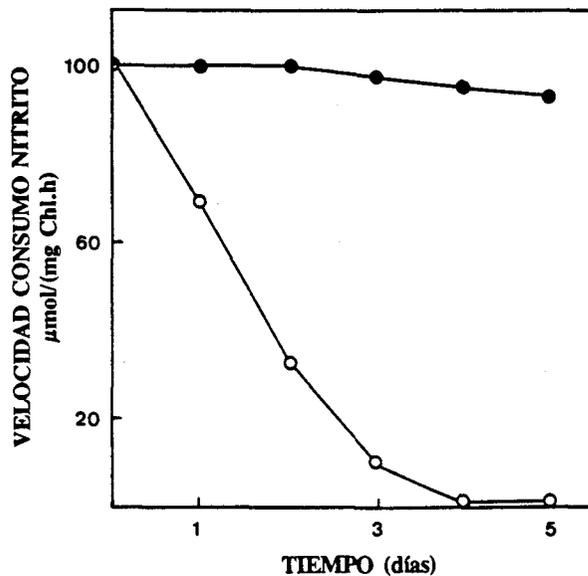


Fig. 50. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre el consumo de nitrito por células de *C. reinhardtii*. Las células, libremente suspendidas (○) o inmobilizadas en alginato cálcico (●), se almacenaron a 4°C los días indicados en cada caso, y posteriormente se utilizaron para determinar la velocidad de consumo de nitrito, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

5. DESARROLLO DE BIORREACTORES PARA LA ELIMINACION DE NITRITO EN AGUAS DOMESTICAS MEDIANTE EL USO DE CELULAS INMOVILIZADAS

Una vez caracterizado el consumo de nitrito por las células inmovilizadas, se pretende estudiar su comportamiento cuando se utilizan en diversos tipos de biorreactores, que recogen a escala de laboratorio la idea de sistemas de potencial aplicación en la eliminación de compuestos nitrogenados en el agua de uso doméstico. Para ello, se han caracterizado las distintas etapas del crecimiento de las células inmovilizadas en los distintos sistemas empleados (tipo airlift discontinuo y continuo, y airlift loop continuo) bajo la alimentación de un medio no estéril que contenía el compuesto nitrogenado a eliminar, en nuestro caso el nitrito. Se han cuantificado igualmente las distintas tasas de consumo del mismo y los niveles que para la actividad biológica correspondiente presentaban las células empleadas (*C. reinhardtii* y *N. agilis*). Estos resultados, en su conjunto, intentan además apoyar la tesis de la ventajas existentes en el empleo de sistemas combinados de células que demandan oxígeno y aquellas que lo producen, mediante el análisis cuantitativo de los resultados obtenidos.

5.1. Eliminación de nitrito por células de *C. reinhardtii* inmovilizadas en alginato y situadas en un reactor tipo airlift

El primer sistema utilizado fue un biorreactor tipo airlift, diseñado con las características indicadas en la Tabla 5, que trabajaba en modo discontinuo (RAD). Las células inmovilizadas se utilizaron en dicho reactor según las condiciones que se han descrito en Materiales y Métodos. Los resultados correspondientes a la caracterización del crecimiento celular en el soporte, en las condiciones empleadas en el reactor, se recogen en la Figura 51, donde se observa que, partiendo de una concentración de clorofila inmovilizada en torno a 20 $\mu\text{g/g}$ de soporte, se puede alcanzar un máximo cercano a los 100 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte, valor que permanece

Tabla 5. Características básicas del reactor discontinuo tipo airlift (RAD)

CARACTERISTICAS	RAD
Tipo de proceso	Discontinuo (lote o carga)
Dimensiones	Longitud total: 68,5 cms Diámetro interno: 6,5 cms
Material	Vidrio transparente
Capacidad útil	1270 ml
Iluminación	Fluorescente y continua, 50 W/m ² en superficie reactor
Temperatura	25°C
Fluidización del lecho	Gaseo 5 % CO ₂ en aire, 2 l/min
Control gaseo	Flujómetros de precisión

Descripción del reactor RAD empleado en la eliminación de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*

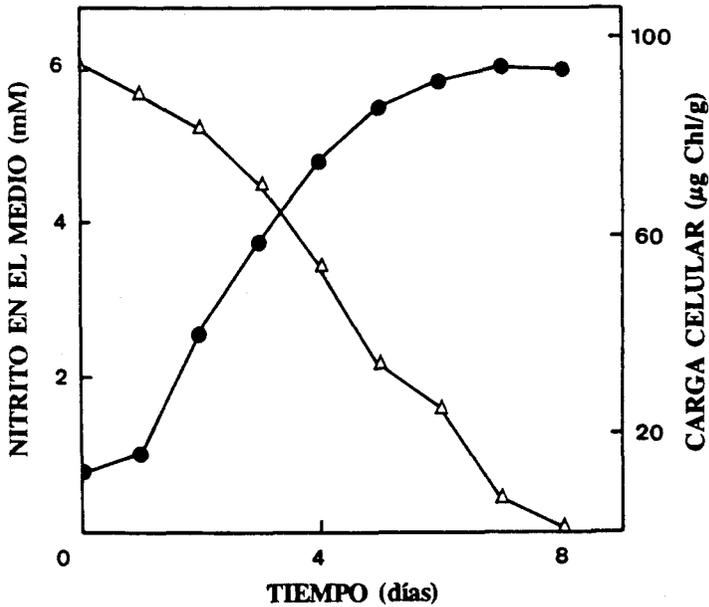
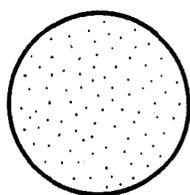


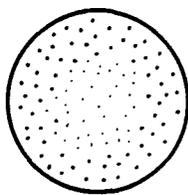
Fig. 51. Crecimiento de células inmovilizadas de *C. reinhardtii* y consumo de nitrito en un reactor discontinuo tipo airlift. Las células se inmovilizaron en alginato cálcico y se incubaron para el consumo de nitrito en un RAD, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó el contenido en clorofila de las perlas (●) y la concentración de nitrito en el medio de cultivo (Δ).

constante durante los días posteriores hasta que se consume todo el nitrito del medio de cultivo. La curva de crecimiento muestra tres etapas claramente diferenciadas que vamos a analizar paralelamente al desarrollo de las colonias en las perlas, observadas al microscopio óptico, y mostradas en la Fig. 52. Durante las primeras 24 h se presenta una *fase de latencia* que se caracteriza por una concentración de biomasa prácticamente constante, apreciándose un ligero incremento en el contenido de clorofila de las células inmovilizadas y no detectándose, por el contrario, un aumento en el número de las mismas. Entre los días segundo y sexto, se produce un aumento en el contenido de clorofila, correspondiente a la *fase exponencial* de crecimiento celular, comenzando a observarse la formación

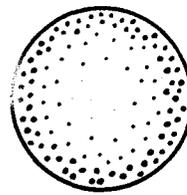
de colonias celulares de mayor tamaño en la periferia de las perlas de gel que en el interior de las mismas (Fig. 52). La *fase estacionaria* se caracteriza porque se detiene el crecimiento celular, estabilizándose el contenido de clorofila en el soporte y estableciéndose un equilibrio dinámico entre las células inmovilizadas y las liberadas al medio externo como consecuencia del crecimiento de las colonias más cercanas a la superficie de las perlas. En esta situación y como se observa en la Figura 52 (Fotos), la distribución de colonias en el soporte se caracteriza por la formación de una densa capa de las mismas, cercana a la periferia de las perlas, y una disminución de aquellas que inicialmente se encontraban situadas en las zonas más internas, de difícil acceso para la luz y los sustratos en las fases terminales del crecimiento celular.



FASE DE LATENCIA

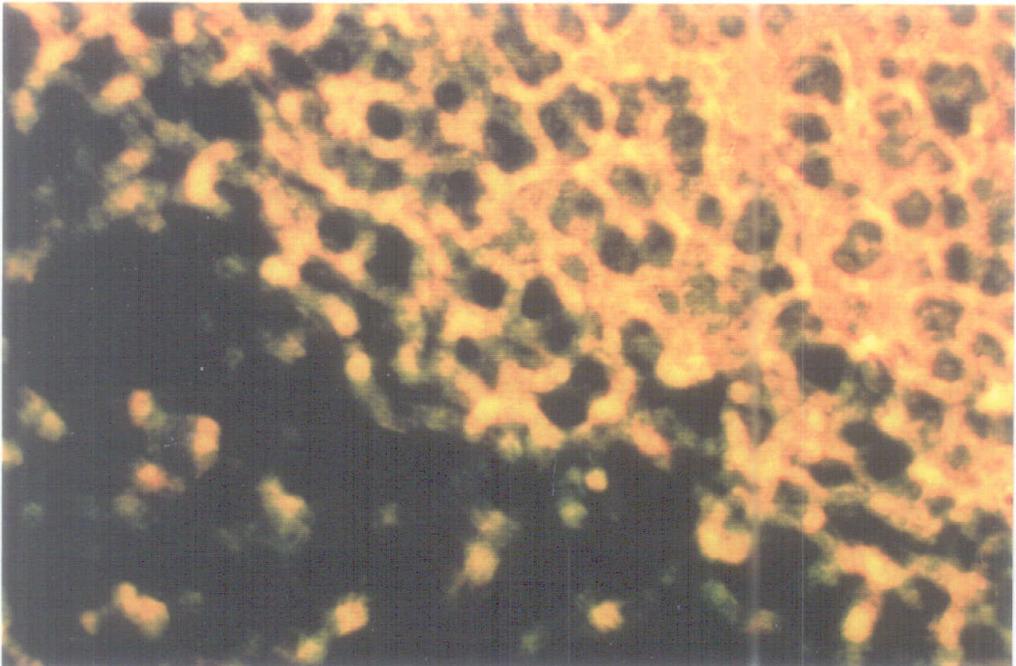
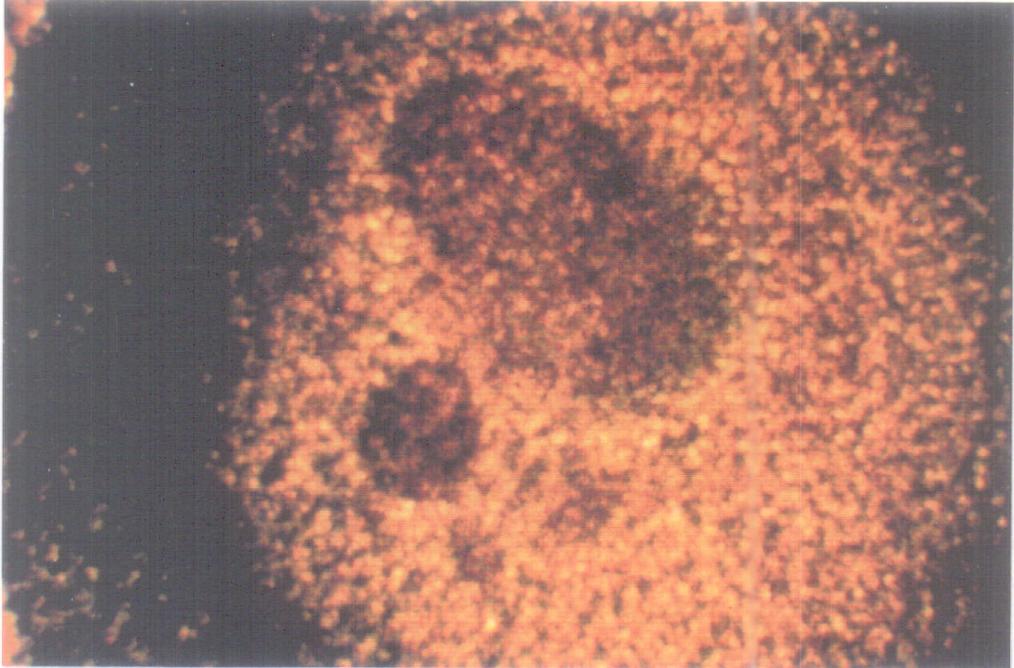


FASE EXPONENCIAL



FASE ESTACIONARIA

Fig. 52. Distribución de las colonias de *C. reinhardtii* en la matriz de inmovilización durante el crecimiento celular en un reactor tipo airlift. En la parte superior se muestra un esquema de una sección de perlas de alginato escogidas en distintas fases de crecimiento y examinadas al microscopio óptico (10 aumentos): a) Fase de latencia, sin incremento significativo en la densidad celular. b) Fase de crecimiento exponencial, con aparición de numerosas colonias de células. c) Fase estacionaria, con una distribución periférica de la mayor parte de la biomasa inmovilizada. En la siguiente página, la parte superior muestra una fotografía correspondiente al esquema c) (fase estacionaria); y la foto inferior muestra el detalle de la interfase en la densidad de colonias, correspondiente a la misma perla.



La Figura 53 muestra cómo, a medida que se consume el nitrito por las células inmovilizadas en el reactor, existe una liberación continua de células al medio, con mayor énfasis en el estadio final de la fase exponencial, y que presenta unos valores medios en esta etapa de $2,5 \times 10^5$ células/día. Como se deduce de dicha figura, la tasa de consumo de nitrito se incrementa durante la fase exponencial de crecimiento, hasta alcanzar un máximo al final de la misma que, dependiendo de las fluctuaciones de las condiciones utilizadas en cada experimento, se halla en torno a los $90 \mu\text{mol/h}$, y permanece constante durante los días posteriores.

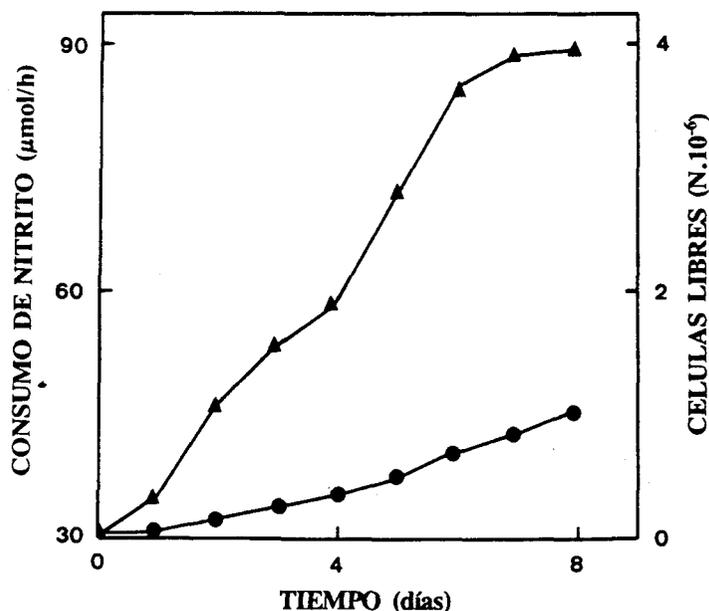


Fig. 53. Consumo de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii* en un reactor discontinuo tipo airlift. Las células se inmovilizaron en alginato cálcico y se incubaron para el consumo de nitrito en un RAD, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó el consumo de nitrito (▲) y el número de células libres (●) en el medio de cultivo.

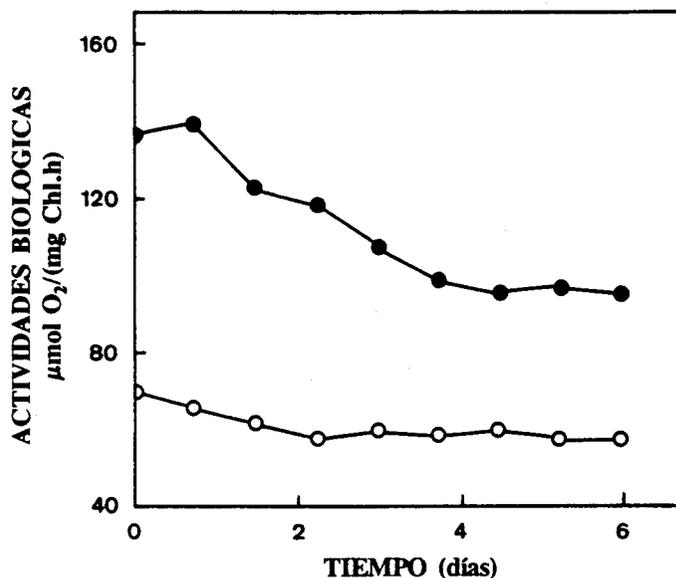


Fig. 54. Evolución de las actividades fotosintética y respiratoria de células inmovilizadas de *C. reinhardtii* durante su crecimiento en un reactor discontinuo tipo airlift. Células inmovilizadas en alginato cálcico se incubaron en el RAD para el consumo de nitrito, según las condiciones establecidas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinaron las actividades fotosintética (●) y respiratoria (○) de las células.

El perfil de la evolución de las actividades fotosintética y respiratoria, así como los valores de la actividad nitrito reductasa, directamente implicada en la reducción del nitrito hasta amonio, hasta alcanzar la fase estacionaria en el crecimiento celular, son críticos a la hora de evaluar la viabilidad de un proceso en un sistema de estas características. En la Figura 54 se observa como la actividad fotosintética desciende desde 135 hasta 100 $\mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ en el transcurso de los cuatro primeros días de crecimiento celular, indicando una posible y directa influencia del incremento celular en la difusión del oxígeno, como ya se comentó anteriormente, y en la consecución del efecto pantalla para la luz, como consecuencia de la distribución de colonias en las perlas del soporte, de las

células más externas sobre las situadas en el seno del mismo. La actividad respiratoria permanece prácticamente constante, entre otros factores como consecuencia de que los valores que presenta son bastante inferiores a los mostrados por la actividad fotosintética.

Considerando que el sistema utilizado trabaja de forma discontinua, por lo que debe alimentarse con nueva carga cuando el nitrito de la primera es consumido, es esencial estudiar como varía la tasa de consumo de nitrito en función de su concentración en el medio presente en el reactor. En la Figura 55 se muestran los resultados obtenidos en dicho estudio, donde es interesante observar cómo la velocidad de consumo es máxima cuando la concentración de nitrito en el cultivo de entrada es superior a $600 \mu\text{M}$, y desciende desde 8 hasta $5 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ para concentraciones igualmente decrecientes entre 600 y $200 \mu\text{M}$.

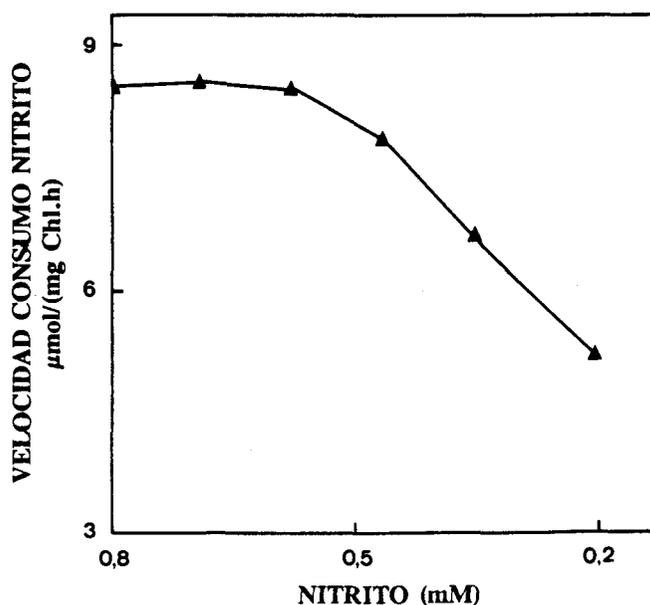


Fig. 55. Efecto de la concentración de nitrito en el medio de cultivo sobre la velocidad de consumo por células inmovilizadas de *C. reinhardtii* en un reactor discontinuo tipo airlift. Células inmovilizadas en alginato cálcico se incubaron en un RAD para el consumo de nitrito, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto que se utilizaron en cada caso las concentraciones de nitrito indicadas.

También se ha estudiado el consumo de nitrito cuando el reactor tipo airlift, que operaba en modo discontinuo, se modificó para mantener un flujo continuo de medio en el sistema (RAC). Dicho reactor forma parte de un sistema diseñado con las características que se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Características básicas del reactor de flujo continuo tipo airlift (RAC)

CARACTERISTICAS	RAC
Tipo de proceso	Flujo continuo
Dimensiones	Longitud total: 68,5 cms Diámetro interno: 6,5 cms
Material	Vidrio transparente
Capacidad útil	1270 ml
Iluminación	Fluorescente y continua, 50 W/m ² en superficie reactor
Temperatura	25°C
Tipo de flujo	Continuo, 90 ml/h
Tasa de dilución	$D = \mu$
Alimentación medio	Continua, bomba peristáltica
Tiempo de residencia	14,1 h
Fluidización del lecho	Gaseo 5 % CO ₂ en aire, 2 l/min
Control gaseo	Flujómetros de precisión

Descripción del reactor RAC empleado para la eliminación de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*

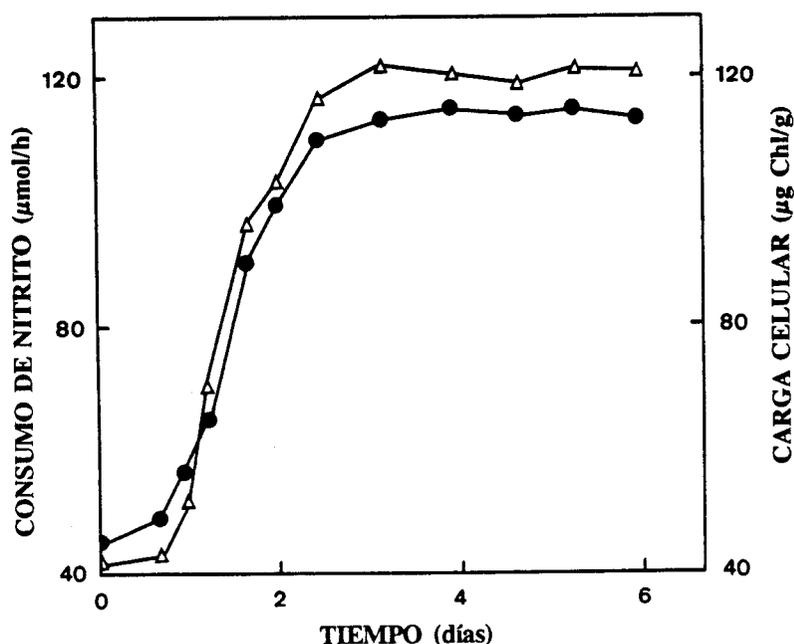


Fig. 56. Crecimiento de células inmovilizadas de *C. reinhardtii* consumiendo nitrato en un reactor continuo tipo airlift. Células inmovilizadas en alginato cálcico se incubaron en un RAC para el consumo de nitrato, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó la clorofila de las perlas (\bullet) y el consumo de nitrato por las células (Δ).

Las células inmovilizadas se emplearon en el biorreactor según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La alimentación de medio al biorreactor se realizó mediante una bomba peristáltica a un flujo de 90 ml/h, y la colonización del soporte tuvo lugar en idéntica forma a la descrita anteriormente, aunque la fase exponencial se desarrolló en 24 h menos que en el RAD. La Figura 56 recoge los datos correspondientes a la variación de clorofila inmovilizada durante el crecimiento celular y la tasa de consumo de nitrato hasta la fase estacionaria. Puede observarse que, partiendo de una carga celular equivalente a unos 40 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte, se alcanza un máximo en torno a 110 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte, aunque dependiendo de la carga celular inicialmente inmovilizada, este valor podría incrementarse hasta unos 200 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte. Dicho máximo

permanece constante durante unos días, pudiendo prolongarse hasta incluso tres semanas (datos no mostrados). La tasa de consumo de nitrito, por su parte, alcanza un máximo valor de $120 \mu\text{mol/h}$ al final de la fase de crecimiento celular, que permanece igualmente estable durante el periodo de tiempo controlado.

Los estudios realizados encaminados a definir la estabilidad y viabilidad del sistema comienzan con la obtención del perfil de la evolución de las actividades fotosintética y respiratoria a lo largo del periodo de crecimiento. En la Figura 57 se observa un descenso de la actividad fotosintética desde 150 hasta $90 \mu\text{mol O}_2/(\text{mg Chl.h})$ durante los tres primeros días del proceso, para estabilizarse posteriormente. La actividad respiratoria, como puede comprobarse en la mencionada figura, permanece prácticamente constante y en el orden de magnitud observada en el RAD.

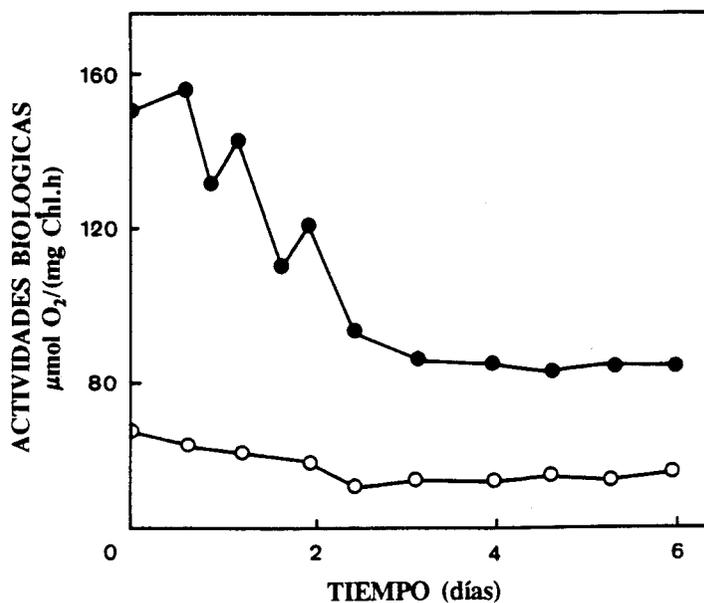


Fig. 57. Evolución de las actividades fotosintética y respiratoria de células inmovilizadas de *C. reinhardtii* durante su crecimiento en un reactor continuo tipo airlift. Células inmovilizadas en alginato cálcico se incubaron para el consumo de nitrito en un RAC, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinaron las actividades fotosintética (●) y respiratoria (○) de las células.

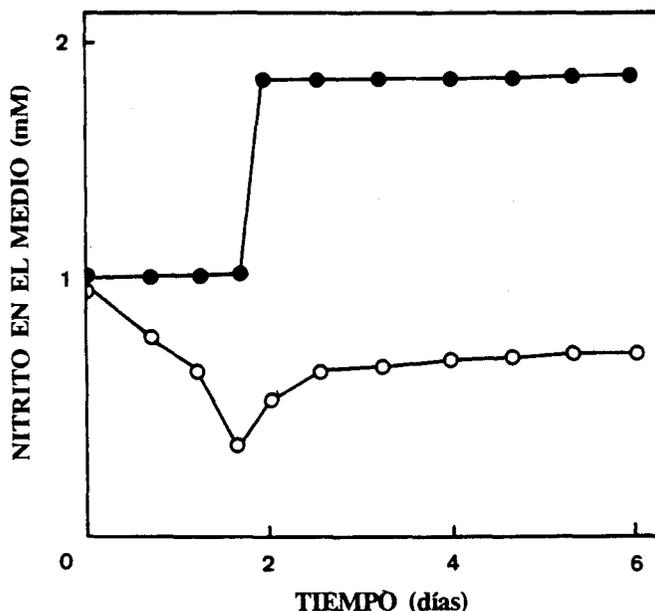


Fig. 58. Efecto de la concentración de nitrito en el cultivo de alimentación del reactor sobre su eliminación por células inmobilizadas de *C. reinhardtii*. Células inmobilizadas en alginato cálcico se incubaron para el consumo de nitrito en un RAC, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, pero utilizando distintas concentraciones de nitrito en el influente (●). A los tiempos señalados se determinó la concentración de nitrito en el efluente (○) del reactor.

En los sistemas continuos es interesante determinar la estabilidad operativa, en las condiciones definidas para obtener su máximo rendimiento. En la Figura 58 se recoge la evolución de la concentración de nitrito en el medio que sale del reactor en función de la concentración de nitrito del medio que entra. Inicialmente se alimentó al reactor con nitrito, 1 mM, en el medio tamponado con Tricina 10 mM (pH 7,5) utilizado como influente. Al cabo de dos días de residencia de las células inmobilizadas en el biorreactor, la concentración de nitrito determinada en el efluente descendió hasta 400 μ M, indicio evidente del incremento de biomasa en el biorreactor. Posteriormente, se incrementó la concentración de nitrito en el influente hasta 1,9 mM, lo que produjo un aumento del nitrito en el efluente, que se estabilizó al final de la fase exponencial de crecimiento celular en torno a 0,7 mM.

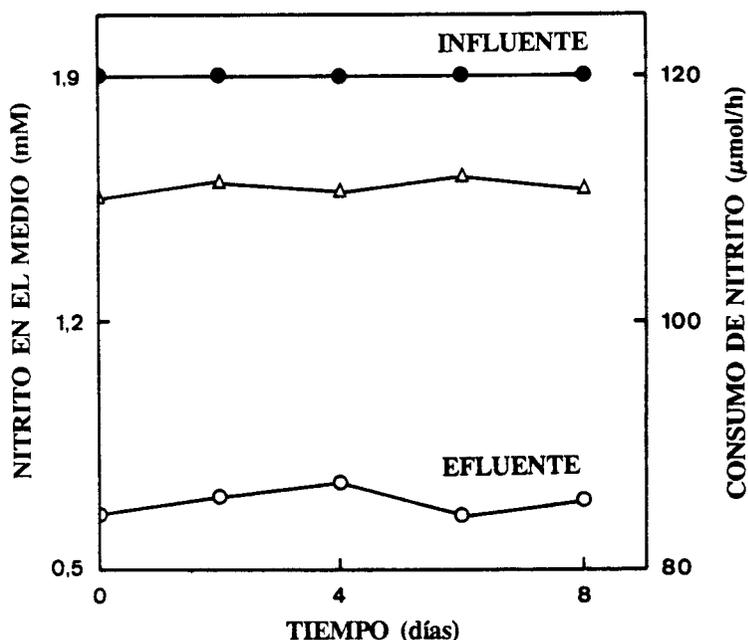


Fig. 59. Estabilidad operativa del sistema de eliminación de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii* en un reactor continuo tipo airlift. Células inmovilizadas en alginato cálcico se crecieron hasta alcanzar la fase estacionaria en un RAC y se mantuvieron en las condiciones óptimas de consumo de nitrito, descritas en Resultados con una concentración en el influente de 1,9 mM ●. A los tiempos indicados se determinó la concentración de nitrito en el efluente ○ del reactor, así como el consumo (Δ) del mismo por las células.

En la Figura 59 se muestra la evolución del consumo de nitrito en la fase estacionaria por las células inmovilizadas, en el RAC y durante un periodo de 8 días. Dicho consumo resulta constante y en torno a 110 $\mu\text{mol/h}$ durante todo el periodo de tiempo estudiado. La alimentación al biorreactor mantenía una concentración de nitrito constante e igual a 1,9 mM, midiendo en el efluente una concentración residual igualmente constante de 0,6 mM, que garantiza el mantenimiento de la velocidad máxima de consumo de nitrito en el biorreactor.

En la Tabla 7 se recogen los datos más relevantes obtenidos en el estudio del consumo de nitrito por *C. reinhardtii* en ambos tipos de reactores, RAD y RAC.

Tabla 7. Comparación de los principales parámetros obtenidos en el consumo de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii* en los reactores RAD y RAC

PARAMETRO	RAD	RAC
Volumen reactor (ml)	1400	1400
Peso soporte (g)	130	130
Biomasa máxima ($\mu\text{g Chl/g gel}$)	90	110
Actividad reactor ($\mu\text{mol NO}_2/\text{ml.h}$)	0,07	0,08
Consumo específico ($\mu\text{mol NO}_2/\text{mgChl.h}$)	7,5	8,0
Rendimiento inmovilización (%)	71	76
Estabilidad operacional (h)	504	504
Rendimiento fotosintético (%)	70	60
Periodo operación continua (h)	192	504

De los parámetros presentados, se han definido los siguientes:

1. Actividad reactor: concentración de nitrito consumido por unidad de tiempo
2. Consumo específico: cantidad de nitrito consumido por unidad de biomasa y tiempo
3. Rendimiento inmovilización: consumo específico en reactor (fase estacionaria) respecto al consumo específico antes de la inmovilización
4. Estabilidad operacional: tiempo que el sistema operó en condiciones estacionarias y sin alteración en los parámetros estudiados
5. Rendimiento fotosintético: actividad fotosintética fase estacionaria respecto a la actividad fotosintética en el arranque del sistema

5.2. Eliminación de nitrito por células de *N. agilis* inmovilizadas en carragenato y situadas en un reactor tipo airlift loop

El último sistema utilizado ha sido un biorreactor de flujo continuo tipo airlift loop, cuyas principales características están indicadas en la Tabla 8, para estudiar la oxidación de nitrito a nitrato mediante células inmovilizadas de *N. agilis*.

Tabla 8. Características básicas del reactor de flujo continuo tipo airlift loop (RAL)

CARACTERISTICAS	RAL
Tipo de proceso	Flujo continuo
Diseño	Dos brazos, con loop interno
Material	Vidrio transparente
Capacidad útil	2700 ml
Temperatura	25°C
Tipo de flujo	Continuo, 215 ml/h
Tasa de dilución	$D = 2\mu$
Alimentación medio	Continua, bomba peristáltica
Tiempo de residencia	12,5 h
Fluidización del lecho	Gaseo oxígeno, en ascensión
Control gaseo	Sonda O ₂ , PLC

Descripción del reactor RAL empleado para la eliminación de nitrito por células inmovilizadas de *N. agilis*

Los resultados obtenidos de la caracterización del crecimiento celular en el soporte, según las condiciones empleadas en el biorreactor se muestran en la Figura 60. Inicialmente se suministró al sistema, mediante la alimentación continua a un flujo de 200 ml/h, medio tamponado que contenía una concentración de nitrito de 10 mM, la misma que se midió en el efluente durante los diez primeros días de proceso continuo. Transcurrido este tiempo, comenzó a producirse un descenso en la concentración de nitrito medida en el efluente del biorreactor. De forma paralela a dicho descenso, se aprecia también la formación significativa de nitrato, como consecuencia de la actividad nitrificante de las células inmovilizadas.

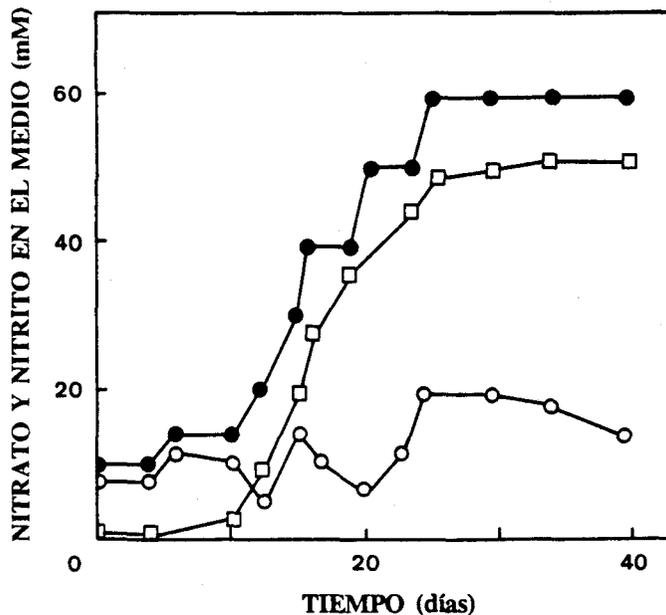


Fig. 60. Efecto de la concentración de nitrito del influente sobre la actividad nitrificante de células inmovilizadas de *N. agilis* en un reactor continuo tipo airlift loop. Células inmovilizadas en carragenato se incubaron para el consumo de nitrito en un RAL, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto que las concentraciones iniciales de nitrito son las indicadas (●). Cuando se especifica se determinaron las concentraciones de nitrito (○) y nitrato (□) en el efluente.

Sin embargo, una disminución de la concentración de nitrito en el biorreactor puede limitar la capacidad nitrificante del sistema, por lo que se ha procurado, aumentando la concentración de nitrito en el influente, asegurar la presencia de este compuesto a la salida, siempre en torno a 10 mM, lo que proporciona el máximo rendimiento de la actividad nitrificante. Paralelamente, la concentración de nitrato en el efluente aumentó hasta hacerse prácticamente constante a los 30 días desde el inicio del proceso.

En la Figura 61 se muestran los datos correspondientes al crecimiento celular referidos a proteína en las perlas de carragenato, así como la actividad nitrificante del sistema, resultante de la conversión de nitrito a nitrato y evaluada mediante el consumo de oxígeno realizado por las células inmovilizadas. Se observa como al cabo de 30 días se inicia la fase estacionaria, a la que se llega con una actividad máxima observada en el sistema en torno a $0,006 \mu\text{mol}/(\text{ml gel.s})$.

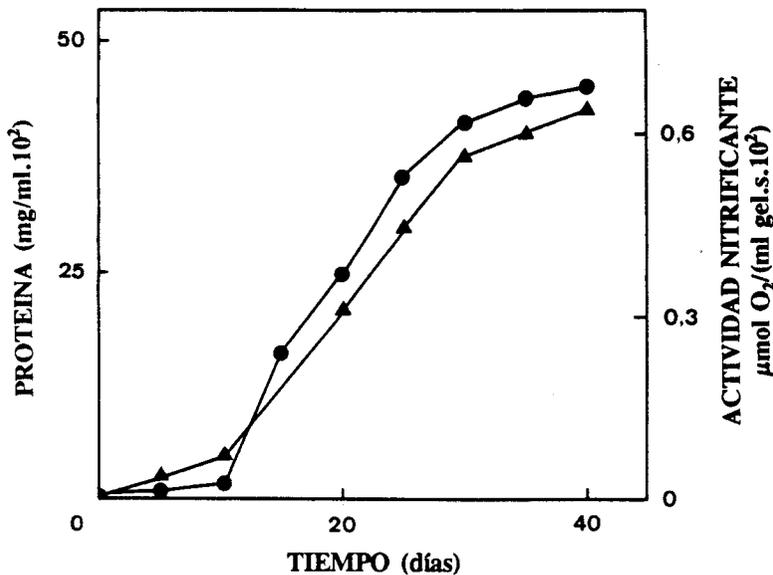


Fig. 61. Crecimiento y actividad nitrificante de células de *N. agilis* en un reactor continuo tipo airlift loop. Células inmovilizadas en carragenato potásico se incubaron para el consumo de nitrito en un RAL, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó la concentración de proteína (▲) y actividad nitrificante (●) de las perlas de carragenato.

La estabilidad operativa del sistema se muestra en la Figura 62, observándose que durante, al menos, un mes, se mantienen los niveles máximos de actividad, no detectándose incremento alguno en la concentración de nitrito medida en el efluente del biorreactor, lo que sería una señal evidente de una disminución en la eficiencia del mismo.

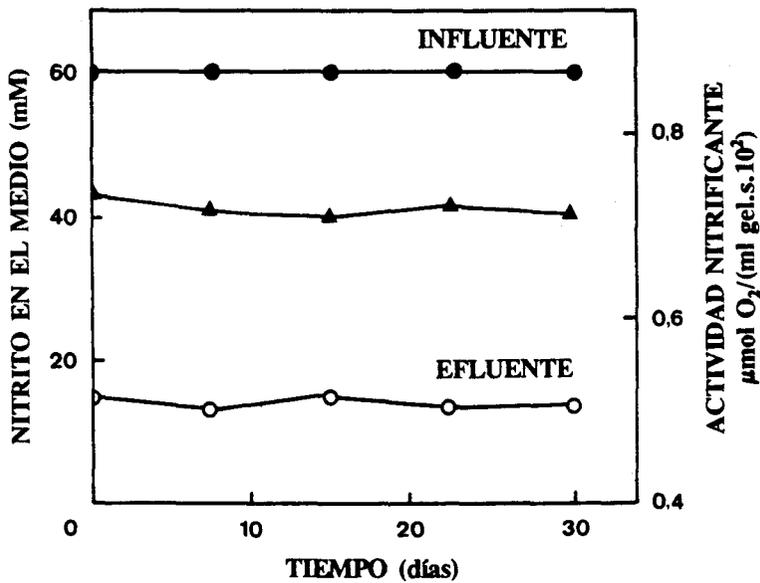


Fig. 62. Estabilidad operativa del sistema de eliminación nitrito por células inmovilizadas de *N. agilis* en un reactor continuo tipo airlift loop. Células inmovilizadas en carragenato se crecieron en un RAL hasta alcanzar la fase estacionaria y se mantuvieron en las condiciones óptimas de consumo de nitrito, descritas en Resultados, con una concentración en el influente de 60 mM (●). A los tiempos indicados se determinó la concentración de nitrito en el efluente (○), y la actividad nitrificante de las perlas de carragenato (▲).

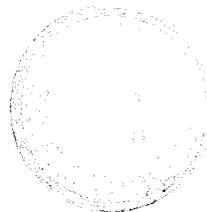
La Tabla 9 recoge actividades biológicas de *C. reinhardtii* y de *N. agilis* durante la fase estacionaria. Particularmente interesantes son los valores de nitrito reductasa obtenidos con *C. reinhardtii* inmovilizadas (RAD y RAC), en torno a 2,5 mU/ μ g Chl, lo que supone duplicar el valor de esta actividad mostrado por las células libremente suspendidas en las mismas condiciones. Ello no implica que se duplique la velocidad de consumo de nitrito.

Tabla 9. Niveles de las distintas actividades biológicas de las células inmovilizadas determinadas en la fase estacionaria de crecimiento en los reactores RAD, RAC y RAL

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	RAD	RAC	RAL
Nitrito reductasa (mU/ μ g Chl)	2,6	2,3	-
Nitrificante (μ mol O ₂ /ml gel.s)	-	-	0,006
Fotosintética (μ mol O ₂ /mg Chl.h)	100	90	-

Para la determinación de la actividad nitrito reductasa en las perlas de alginato, 0,2 g de las mismas conteniendo unos 20 μ g de clorofila se disgregaron en fosfato potásico 50 mM. Las células se centrifugaron y resuspendieron en tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0), realizando el ensayo de actividad según se indicó en Materiales y Métodos.

IV Discusión



Cada vez son más numerosas las publicaciones sobre el uso de células de microorganismos inmovilizados, ya sea en sistemas en crecimiento, como son las fermentaciones, o bien en sistemas en reposo, cuando se usan como biocatalizadores (Chibata y Tosa 1981). Más concretamente, se ha extendido de forma amplia el uso de microalgas en la industria biotecnológica, ya sean libremente suspendidas o inmovilizadas en un soporte sólido, debido a la facilidad que ofrecen para su manejo, al abaratamiento de costes que proporcionan y, sobre todo, a las enormes posibilidades que presentan para la obtención de ciertos productos de interés comercial, así como su empleo directo en procesos de descontaminación de aguas o producción de biomasa. Los compuestos químicos obtenidos de las microalgas van desde simples metabolitos hasta complejos antibióticos, toxinas, y una amplia variedad de inhibidores enzimáticos, de mucha utilidad para la investigación básica o aplicada (Trevan y Mak 1988). La utilización de microalgas inmovilizadas para la producción de biomoléculas útiles está progresando de forma creciente, y su uso en la producción de compuestos químicos, como hidrocarburos (Bailliez et al. 1985) o amonio e hidrógeno (Brouers y Hall 1986; Santos-Rosa et al. 1989) está bien documentado.

Ballesteros et al. (1983) determinaron los criterios básicos para realizar caracterizaciones de biocatalizadores inmovilizados, definiendo una serie de parámetros que, con carácter general, deberían tomarse en consideración para ofrecer una descripción correcta y con vistas a una potencial aplicación del biocatalizador en cuestión. En esta guía se sugiere como modelo a

seguir el trabajo realizado por van Ginkel et al. (1983), que caracteriza el consumo de amonio por células de *Nitrosomonas europaea* inmovilizadas en alginato cálcico. En dicho trabajo se estudia el efecto de parámetros tales como el pH, la temperatura, la carga celular inmovilizada, el diámetro de las perlas de polímero formadas, así como la posible inhibición del consumo de amonio por el producto de la oxidación (nitrito), la estabilidad durante el almacenamiento en frío y la estabilidad operativa, que determina la eficacia del sistema de células tras un prolongado periodo de tiempo bajo las condiciones empleadas.

Nuestros objetivos en el presente trabajo se han centrado en determinar el comportamiento de células inmovilizadas de *C. reinhardtii* cuando se utilizan en dos procesos claramente diferenciados: la producción de un metabolito (glicolato) procedente de la microalga y, por otra parte, la aplicación de ésta al tratamiento biológico de aguas contaminadas con nitrógeno inorgánico.

1. ACTIVIDADES FOTOSINTETICA Y RESPIRATORIA DE CELULAS INMOVILIZADAS DE *C. reinhardtii*

Para ello y en una primera aproximación, determinamos la influencia que la inmovilización ejerce sobre las actividades biológicas primordiales en células de microalgas: la producción fotosintética de oxígeno y su consumo como consecuencia de la respiración endógena, las cuales nos proporcionan una idea válida sobre la viabilidad celular. En este sentido, observamos la evolución de dichas actividades al variar los principales parámetros directamente implicados en la inmovilización, como nutrición y medioambiente celular, anteriormente indicados.

En general, las condiciones de inmovilización (carga celular en el soporte, concentración de la disolución de alginato) pueden ejercer una influencia importante sobre la actividad biológica de las células, por lo que hay que estudiarlas detalladamente a la hora de definir un sistema eficaz.

El empleo de CaCl_2 o BaCl_2 100 mM en el proceso de gelificación ionotrópica suministra perlas igualmente estables, independientemente del

ión utilizado, como ya se ha demostrado (Dainty et al. 1986). Por su parte, la determinación de las actividades fotosintética y respiratoria, que van a afectar significativamente la relación O_2/CO_2 del microambiente celular, puede darnos una información determinante del tipo de ión a utilizar durante el proceso de inmovilización de células de *C. reinhartii*. La similitud de los resultados obtenidos (Fig. 10 y 11) evidencia la escasa influencia del ión empleado en la gelificación sobre la difusión de oxígeno dentro de las perlas que contienen las células inmovilizadas, por lo que hemos utilizado Ca^{2+} como contraión, con la lógica limitación de no usar simultáneamente tampón fosfato.

La *carga celular* es un parámetro crítico para el rendimiento del proceso, pues debe tenerse en cuenta que, al superar un determinado valor de carga considerado como óptimo, se acentúan dos tipos de efectos distintos que disminuyen la eficacia del sistema:

a) Efecto de pantalla para la luz. Cuando se inmovilizan elevadas cargas celulares en el soporte, se produce un efecto de pantallamiento de las células de las capas más externas del soporte sobre las que ocupan las zonas más internas del mismo, impidiendo el paso de la máxima intensidad de luz empleada. En organismos fotosintéticos este fenómeno conduce a un descenso de la actividad fotosintética especialmente (Fig. 12) y de la actividad metabólica en general, lo que provoca rendimientos más bajos de los procesos productivos.

b) Efecto de barrera para la difusión de sustratos en el soporte, provocado por la ocupación celular. Inmediatamente después de su inmovilización, las células se encuentran homogéneamente distribuidas a lo largo de la sección de las perlas de soporte, y las primeras capas de células absorberán mayoritariamente las moléculas de sustrato que acceden a aquel, impidiendo de esta forma su difusión al seno de la perla. A este hecho puede unirse la excreción de polisacáridos por parte de las células, los cuales pueden conformar una película sobre la superficie de éstas gracias a la protección del soporte, impidiendo así el acceso de sustratos (Garbisu et al. 1991). Cuantas más células se encuentren inmovilizadas, menor será la proporción de poros libres en el soporte para la difusión de

moléculas, disminuyendo la tasa de consumo de sustrato.

Como consecuencia y de los resultados mostrados en la Figura 12, se deduce la necesidad de trabajar con cargas celulares no demasiado altas, lo que permitirá obtener el máximo provecho de toda la biomasa inmovilizada.

Por su parte el aumento en la *concentración de alginato* puede suministrar una barrera física a la difusión de cualquier molécula y disminuir considerablemente el rendimiento del sistema. En este sentido, hemos observado que la actividad fotosintética disminuye al incrementarse la concentración de alginato en la suspensión utilizada para la inmovilización celular (Fig. 13) lo que, a igualdad de los demás parámetros, indica claramente la limitación que el soporte crea a la difusión del oxígeno al medio exterior. Nuestros datos son consistentes con los diversos modelos estudiados sobre la difusión en geles conteniendo células inmovilizadas (Westrin 1990; Westrin y Axelsson 1991; Wijffels et al. 1991), que han mostrado que el coeficiente efectivo de difusión de una molécula en un gel es más bajo que el correspondiente en agua, existiendo principalmente dos razones para ello:

a) por una parte, el polímero reduce su volumen útil a una fracción del volumen total. Esto se denomina *efecto de exclusión*

b) las partes impermeables del polímero incrementan el recorrido para la difusión de las moléculas. Esto se denomina *efecto de obstrucción*.

En este contexto, el oxígeno es un elemento clave, ya que las células lo requieren para realizar las actividades respiratoria y oxigenasas, y en el caso de organismos fotosintéticos, el oxígeno se produce además como consecuencia de esta actividad. Hay estudios detallados acerca de los problemas difusionales del oxígeno cuando se tiene una alta densidad celular dentro del gel empleado como matriz de inmovilización (Nguyen y Luong 1986; Venkatasubramanian et al. 1983).

La naturaleza del soporte puede ser considerada como un factor de influencia importante, aunque en nuestros estudios realizados con células inmovilizadas en gel de agar (atrapamiento) la evolución de las actividades fotosintética y respiratoria tras someter a las células inmovilizadas a distintos periodos de almacenamiento a 4°C, es similar a la observada en

las células en alginato (Fig. 14 y 15). Este control nos permite observar que el comportamiento y los valores de ambas actividades son análogos en dos soportes que se basan en idéntico principio para la inmovilización celular, el atrapamiento. Por otra parte y como principal resultado, es evidente la estabilidad que la inmovilización proporciona en el tiempo a las células fotosintéticas.

Factores ambientales como la temperatura o el pH, entre otros, condicionarán igualmente la transferencia de oxígeno al medio o la entrada de éste en las células inmovilizadas, aunque los valores mostrados en nuestro caso por las actividades fotosintética y respiratoria en función de ambos parámetros no indican variaciones significativas en la respuesta generada por las células ante el cambio que la inmovilización supone respecto a su relación de intercambio con el medio externo (Fig. 16, 17, 18 y 19). Aunque el comportamiento de la actividad fotosintética en función de la temperatura y el pH es análogo en células libres e inmovilizadas, se deduce de las Figuras 16 y 18 que la inmovilización celular permite trabajar en un margen de temperatura y pH más amplio que el mostrado por las células libremente suspendidas. Esta es una importante ventaja operativa de cara a procesos de larga duración y sometidos a condiciones ambientales cambiantes. Por otra parte, los valores de actividad respiratoria mostrados por células de *C. reinhardtii* inmovilizadas en alginato cálcico son ligeramente inferiores respecto a los mostrados por células libremente suspendidas (Fig. 17 y 19). Ello puede deberse a que la tasa de difusión externa de oxígeno desde el medio hacia las perlas, junto con la tasa de difusión en el interior de las mismas, no son lo bastante altas como para proporcionar la concentración de oxígeno que permita obtener los máximos valores de actividad respiratoria mostrados por las células libres (Scott et al. 1988). Por otro lado, parte del oxígeno generado en la actividad fotosintética de las células más internas del soporte, sería empleado en la respiración endógena por las más periféricas, debido a las consideraciones difusionales antes discutidas. Este hecho se traduciría, por tanto, en un descenso en el consumo de oxígeno del medio externo.

Estas consideraciones, apuntadas por Westrin y Axelsson (1991),

justifican también los resultados obtenidos al incrementar la concentración de alginato en la suspensión celular preparada previamente al proceso de inmovilización, observándose en las perlas una disminución de la actividad respiratoria (Fig. 13) debido a los efectos combinados de *exclusión* y *obstrucción*, los cuales aumentan con la concentración de soporte, incrementando las zonas impermeables y haciendo más complejo el camino para la difusión de sustratos y moléculas disueltas, en general. Los trabajos de Kuo-Cheng y Chang-Tze (1988) con *Trichosporon cutaneum* ponen de manifiesto las limitaciones al consumo de oxígeno por células inmovilizadas cuando se aumenta la concentración de alginato o la carga celular, la cual actúa de barrera para la difusión de aquel. Los resultados obtenidos al aumentar dicha carga celular son similares a los reportados por Tramper y de Man (1986) para el consumo de oxígeno por *Nitrobacter agilis* en función de la carga celular inmovilizada, y por Scott et al. (1988) para *Streptomyces clavuligerus*. Dichos datos responden al análisis de Westrin (1990) y De Gooijer et al. (1991) que demostraron, mediante el desarrollo de un modelo que, en un gel que contiene células inmovilizadas, disminuye el coeficiente de difusión de cualquier sustrato puesto que las células ocupan una fracción de volumen del gel, y actúan de barrera para la difusión de solutos al interior del mismo.

Es importante establecer las diferencias entre la difusión de oxígeno desde el medio externo hacia las células inmovilizadas, y desde éstas al exterior de las perlas de gel. El acceso del oxígeno disuelto hasta las células inmovilizadas conllevaría varias etapas, descritas por De Gooijer et al. (1991), que serían: a) difusión desde el medio hasta la superficie del soporte; b) difusión, a través del soporte, desde dicha superficie hasta la membrana celular; y c) difusión al interior de la célula.

Según estas etapas, estudiadas experimentalmente, el acceso de una molécula desde el medio líquido a la posición de una célula inmovilizada en un gel poroso es más difícil que su acceso a una célula libremente suspendida. Por su parte, la difusión del oxígeno desde la célula inmovilizada hacia el medio externo comprendería las mismas fases en sentido inverso: a) difusión desde el interior de la células al seno del soporte; b) difusión desde el seno del soporte a la superficie de la perla; y

c) difusión desde dicha la superficie al medio exterior. Según esta secuencia, aumenta el tiempo de residencia de la molécula de oxígeno en el interior de la perla de gel, debido a la obstrucción que supone la barrera de células y la propia red del polímero que dicha molécula encuentra en su camino de salida al medio externo. Esto afecta en gran medida al comportamiento celular en determinados procesos, en los que la relación O_2/CO_2 influye de forma directa, como es el caso de la Fotorrespiración, proceso en el que tiene lugar una activa síntesis de glicolato. De este análisis se deducen dos consecuencias de indudable interés:

a) las células fotosintéticas inmovilizadas estarían sometidas a una presión parcial de oxígeno mayor que la soportada por las células libres, al aumentar el tiempo de residencia del oxígeno en la perla.

b) la actividad fotosintética mostrada por dichas células estaría, salvo la influencia de otros factores, en los mismos valores que los obtenidos en células libremente suspendidas, pues la mayor parte del oxígeno producido sería al final evacuado al medio externo. Esto coincide con los datos de dicha actividad obtenidos para las células inmovilizadas (Fig. 16 y 18).

La conclusión más interesante que se deduciría de esta discusión radicaría en la existencia de un incremento de la relación de presiones parciales de O_2/CO_2 en el microambiente que rodea a las células inmovilizadas en alginato, lo que conllevaría un aumento de la actividad oxigenasa de la ribulosa bifosfato y, como consecuencia, un notable incremento en la formación de glicolato.

Para finalizar con este apartado y a modo de comentario general, es conveniente resaltar varios hechos de los aquí discutidos. Las células inmovilizadas presentan, en general, actividades fotosintética y respiratoria del orden de las observadas para las células libres. Su estabilidad en el tiempo es un factor determinante para la aplicación de sistemas inmovilizados en procesos de larga duración. En general, se ha observado igualmente que el soporte puede ejercer un efecto de protección celular frente a cambios en las condiciones del medio, manteniéndose valores elevados de dichas actividades biológicas en amplios márgenes de ciertos parámetros, como temperatura o pH, lo que resultaría de evidente interés

para el rendimiento del sistema. Finalmente, las peculiares características que la inmovilización confiere a la difusión de moléculas a través del gel poroso, nos ha permitido matizar en la discusión las limitaciones existentes en la difusión del oxígeno al exterior de las perlas, lo que podría justificar, por todo lo anteriormente comentado, un importante incremento en la relación O_2/CO_2 en el microambiente celular. Esto influiría de manera trascendental en procesos dependientes de la misma.

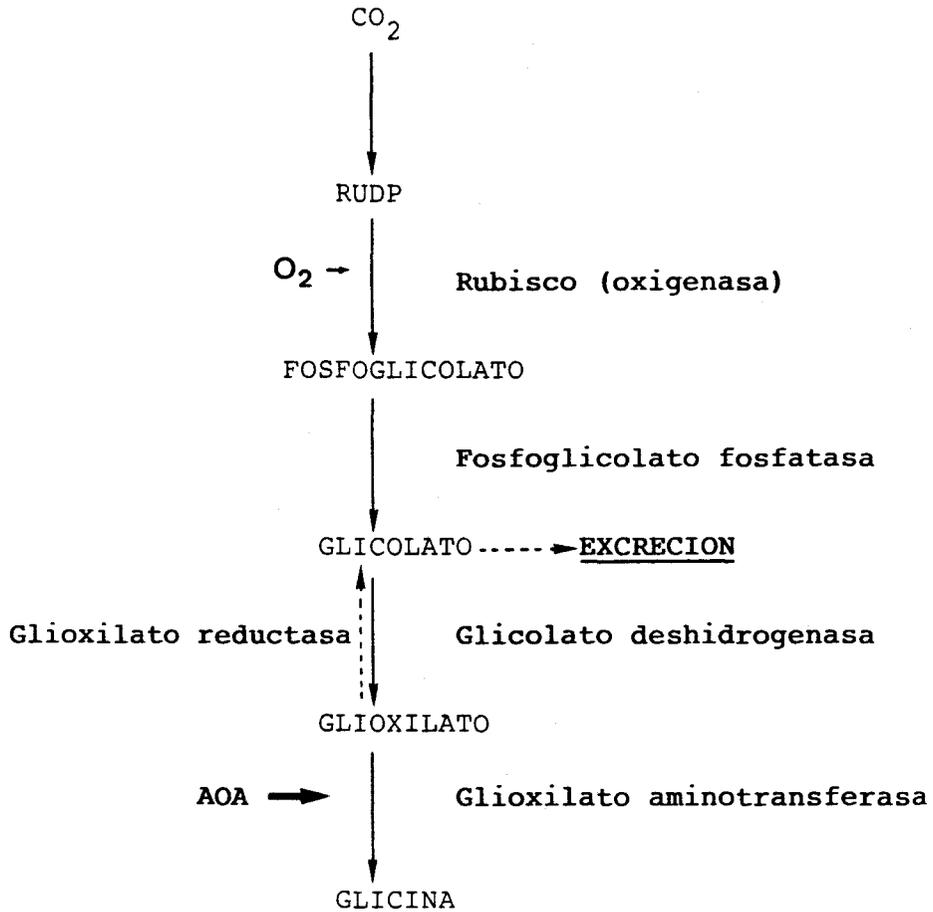
2. FOTOPRODUCCION DE GLICOLATO POR CELULAS DE *C. reinhardtii*

Hess y Tolbert (1967), Bruin et al. (1970) y Codd y Stewart (1973) documentaron la existencia del metabolismo del glicolato en *C. reinhardtii* y otras algas verdes al demostrar en células crecidas en aire la existencia de las enzimas participantes en esta ruta. Dicho metabolismo está regulado en *C. reinhardtii* por la relación O_2/CO_2 del medio circundante del microalga y también por el nivel intracelular de la actividad anhidrasa carbónica, que disminuye la mencionada relación y consecuentemente ralentiza la biosíntesis de glicolato (Tolbert et al. 1983), la cuál depende inicialmente de la actividad oxigenasa de la Rubisco, que actúa preferentemente cuando las microalgas están en condiciones de bajo CO_2 (Lorimer et al. 1973; Kaplan y Berry 1981). Posteriormente, la excreción de glicolato por las células también requiere la inhibición continua del proceso fotorrespiratorio, pero en un punto posterior a la biosíntesis de glicolato. Entre los inhibidores utilizados el que resulta más eficaz desde un punto de visto productivo es el aminooxiacetato (AOA), que inhibe específicamente las transaminasas, habiendo en la fotorrespiración dos actividades de este tipo que utilizan glutamato como donador de grupos amino, una es la glioxilato-glicina aminotransferasa, y otra la serina-hidroxi piruvato aminotransferasa. La excreción de glicolato, por tanto, se inicia al provocar una transición de alto CO_2 (5% en aire) a bajo CO_2 (0,4% ó menos en aire), empleando AOA 1 mM como inhibidor de transaminasas (Fig. 20 y 21). El empleo de concentraciones más elevadas de AOA

incrementa la excreción de glicolato (Fig. 22), pero provoca la degeneración del cultivo. Otros inhibidores de la Fotorrespiración se han utilizado (Kumar et al. 1984), aunque con menos eficacia que el AOA (Fig. 23). Sólo en presencia de MSX, inhibidor de la glutamina sintetasa, las células muestran una importante tasa de excreción, muy inferior a la obtenida con AOA. El INH estimula la excreción de glicolato en *Chlorella* (Findenegg 1977) inhibiendo la glicina descarboxilasa, y el HPMS, inhibidor de la glicolato deshidrogenasa, provoca dicha excreción en otras algas verdes (Jahnke 1981) y cianobacterias (Ingle y Colman 1976). El incremento de la actividad fosfoglicolato fosfatasa (Tabla 3), en presencia de AOA, estaría de acuerdo con el efecto estimulador de éste en la biosíntesis de glicolato (Tolbert et al. 1983).

Tanto en algas eucarióticas como cianobacterias, la supresión del sistema concentrador de carbono inorgánico por crecimiento de las células en alto CO₂ o por adición al medio de cultivo de acetazolamida, inhibidor de la anhidrasa carbónica, a células crecidas en aire, provoca un incremento de la excreción de glicolato a dicho medio (Ingle y Colman 1976; Tolbert et al. 1983; Moroney et al. 1985; Vílchez et al. 1991). Desde un punto de vista metabólico, por tanto, el esquema bioquímico de la fotoproducción de glicolato por microalgas en las condiciones indicadas se recoge en la siguiente página.

Tolbert et al. (1983) observaron la excreción de glicolato al medio por cultivos de *C. reinhardtii* en condiciones de bajo CO₂, durante 1 h, lo que se tradujo en una acumulación de 1 mM. Posteriormente, Moroney et al. (1986) realizaron experimentos de excreción de dicho metabolito, con este mismo alga, con objeto de estudiar el metabolismo de glicolato. Pudieron mantener la excreción durante periodos inferiores a 1 h y observaron la acumulación de glicolato en el medio en concentraciones de hasta 1 mM. Por su parte, Krampitz y Yarris (1983), utilizando suspensiones de *Chlorella pyrenoidosa* gaseadas con aire conteniendo un 0,2 % de CO₂, conseguían mantener una producción continua de glicolato durante un máximo de 4 h.



Esquema bioquímico de la fotoproducción de glicolato por microalgas en presencia de aminoacético, inhibidor de transaminasas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro primer objetivo fue optimizar los parámetros necesarios para mantener la excreción de glicolato durante largos periodos de tiempo (producción), tanto en células libres como inmovilizadas. Para ello, nos centramos en primer lugar en las condiciones de inmovilización y las ambientales y nutricionales, detalladas en Resultados.

La velocidad de producción de glicolato alcanza sus valores más altos cuando se utilizan células recogidas en los primeros estadios de la fase exponencial de crecimiento (Fig. 24). En el caso de células libres, la densidad celular no es un parámetro crítico para dicha producción (Fig. 25), aunque sí lo es la carga celular en el caso de las inmovilizadas (Fig. 26), debido al efecto pantalla para la luz de las células más externas sobre las que ocupan el seno del soporte. Cargas en torno a 40 μg Chl/g de soporte son las utilizadas en nuestro trabajo. La viscosidad de la suspensión de alginato utilizada en la inmovilización celular resultó tener una influencia importante en la producción de glicolato (Fig. 27), por su posible incidencia en la porosidad de las perlas obtenidas y, por tanto, en la difusión de sustratos y productos, así como en la liberación de células al medio. Estos efectos se discutieron de forma amplia anteriormente. Una viscosidad en torno a 6.000 cps (equivalente a una concentración del 3%, p/v) resultó ser la más adecuada para obtener los máximos valores de producción de glicolato, manteniendo la retención celular.

En un proceso que depende directamente de la luz, la intensidad y calidad de ésta son primordiales para obtener el máximo rendimiento. El hecho de que la máxima velocidad de producción de glicolato se alcance a la misma intensidad de luz para las células inmovilizadas, independientemente de la carga celular utilizada (Fig. 28), refuerza las tesis sobre el efecto pantalla que afecta a la población celular ubicada en el seno del soporte, la cual no resulta ser eficiente de cara a procesos directamente dependientes de la luz. En cuanto a la calidad de ésta, la blanca resultó ser la más efectiva (Fig. 29) para la producción de glicolato, en concordancia con los resultados de Becker et al. (1968) en *Chlorella* y Lord et al. (1970) en *Euglena*. Estos últimos han suministrado evidencias de una mayor implicación del fotosistema I, principalmente impulsado por luz roja,

durante la biosíntesis de glicolato en *Chlorella pyrenoidosa* y *Euglena gracilis*.

A diferencia de otros procesos, la fotosíntesis depende de la temperatura, en el intervalo comprendido entre 0-30°C, lo que afecta significativamente a los niveles intracelulares de los distintos metabolitos. El principal efecto que produce la temperatura consiste en una ralentización de reacciones enzimáticas concretas, conduciendo a la acumulación intracelular de determinados metabolitos (Leegood 1985). Existen evidencias de que cloroplastos aislados de espinacas acumulan relativamente más sustratos a bajas temperaturas (Leegood y Walker 1983; Machler et al. 1984), y mientras que algunos de estos metabolitos, como 3-fosfoglicerato, fructosa bifosfato, fructosa-6-fosfato o triosas fosfato, mantienen una relación inversa con la temperatura, la concentración intracelular de ribulosa difosfato experimenta un marcado incremento (hasta el triple) en el intervalo de temperatura anteriormente mencionado. Este hecho coincide con el incremento paralelo observado en la producción de glicolato al aumentar la temperatura hasta 30°C (Fig. 30).

Se ha encontrado un pH óptimo de 8,0 tanto para las células libres como para las inmovilizadas (Fig. 31), no observándose incidencia especial del tipo de tampón o la fuerza iónica usados (Fig. 32).

La utilización de distintas fuentes de nitrógeno tiene efectos diferentes en el metabolismo y excreción de glicolato al medio extracelular. Beudeker y Tabita (1983, 1984) propusieron que cuando *Chlorella sorokiniana* utiliza nitrato como única fuente de nitrógeno, el glicolato sintetizado se metaboliza a través de la ruta glicina-serina, mientras que cuando el amonio sirve de fuente de nitrógeno una parte significativa del glicolato se desvía a malato y piruvato. En este último caso, a medida que el amonio se consume aumenta la producción de glicolato hasta alcanzar niveles normales, como son los encontrados con nitrato o nitrito como fuente de nitrógeno. Por otra parte, el amonio estimula la actividad glioxilato aminotransferasa en contra de la acción del AOA, disminuyendo la producción de glicolato (Tolbert et al. 1983), pero un incremento en la concentración del inhibidor en el medio permitiría alcanzar los valores normales de dicha producción en largos periodos de tiempo. Nuestros datos

(Fig. 33) son coherentes con las observaciones anteriores y podrían explicarse análogamente.

Una vez caracterizados y optimizados los parámetros más importantes que condicionan la producción de glicolato por células libres e inmovilizadas de *C. reinhardtii*, nuestro objetivo fue diseñar un sistema que fotoprodujese la mayor cantidad posible de glicolato, tanto para células libres como inmovilizadas en alginato. El tiempo de proceso definiría, por tanto, la operatividad de dicho sistema. No se disponen de datos importantes en cuanto a la producción de glicolato utilizando células inmovilizadas. Day y Codd (1985) han reportado una velocidad de producción de glicolato inferior a $1 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ durante 6 h en células de *Chlorella emersonii* inmovilizadas en alginato cálcico. En nuestro trabajo hemos obtenido una producción lineal durante 12 h, a una velocidad en torno a $12 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ para las células libres (Fig. 34) y $22 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$ en el caso de las inmovilizadas (Fig. 36). En ambos casos y transcurrido este tiempo, el glicolato acumulado en el medio comienza a ser consumido por las células. Dos razones parecen provocar este fenómeno:

a) por una parte, la activación del mecanismo concentrador de CO_2 por la limitación de éste en el medio, cambia la relación O_2/CO_2 en torno a la RUBISCO, favoreciendo su actividad carboxilasa. La entrada en acción de dicho mecanismo se evidencia al mantenerse la producción de glicolato algunas horas más por adición de acetazolamida (Fig. 35), inhibidor de la actividad anhidrasa carbónica, directamente implicada en la concentración de carbono sobre la RUBISCO (Moroney et al. 1985). Una nueva adición de AOA demostró que no existía un problema de metabolización del mismo, según se observó en la misma figura. Por otra parte, el AOA y la acetazolamida no mostraron efecto sinérgico alguno en la producción de glicolato (Fig. 35).

b) la limitación de carbono que sufren las células, crecidas en alto CO_2 , después de 12 h en aire, justificaría el que éstas utilizarasen fuentes alternativas de carbono disponibles en el medio de cultivo, en este caso concentraciones elevadas de glicolato.

Es importante destacar que el sistema inmovilizado fotoproduce glicolato a una velocidad dos veces superior que la observada con células en libre suspensión, y podría explicarse en base a que en este sistema el rendimiento está favorecido por una permeabilidad adicional de la membrana celular debido a la interacción específica células-matriz (Santos-Rosa et al. 1989) y, sobre todo, por las limitaciones en la difusión, al exterior de las perlas de alginato, del O_2 producido fotosintéticamente (Venkatasubramanian et al. 1983; Nguyen y Luong 1986), lo que eleva la ratio O_2/CO_2 y, por tanto, la biosíntesis de glicolato. En este sentido se ha discutido en el apartado anterior que las células fotosintéticas inmovilizadas estarían sometidas a presiones parciales de O_2 mayores que las células libres, al aumentar el tiempo de residencia del mismo en las perlas de alginato. Scott et al. (1988) mostraron que la tasa de consumo externo de oxígeno por células de *Streptomyces* inmovilizadas en carragenato disminuía respecto a las libremente suspendidas, y similares resultados obtuvieron Sato y Toda (1983) con *Cándida*.

Con objeto de prolongar el proceso productivo de glicolato, se ha ideado un sistema para recuperar las células resuspendiéndolas en medio fresco con alto CO_2 y sin AOA. Después de 12 h, las células pueden producir nuevamente glicolato (Fig. 37), siendo sometidas a un nuevo periodo de 12 h en aire con AOA. Alternando dichos periodos de recuperación y producción, pueden conseguirse hasta 4 ciclos fotoproduktivos, lo que alarga el proceso completo hasta 84 h (Fig. 38), si bien la velocidad de fotoproducción decrece en cada ciclo (Fig. 39, 40 y 41). En términos de velocidad, después de 4 ciclos las células inmovilizadas producen glicolato hasta acumular en el medio una concentración en torno a 10 mM en ambos casos (Fig. 40 y 41), si bien se empleó una biomasa total de 2500 μg para las células libres, y de 1100 μg para las inmovilizadas, es decir, cuando las células están inmovilizadas en alginato cálcico conseguimos obtener la misma producción con la mitad de biomasa. Los datos de la Tabla 4 resumen el mejor rendimiento del sistema inmovilizado, así como la retención de su capacidad de fotoproducción transcurridos dos meses desde el proceso de inmovilización.

Desde el punto de vista biotecnológico y siempre a escala de laboratorio, se han obtenido rendimientos elevados que permitirían pensar en el diseño de sistemas que estableciesen de forma automática tanto los periodos de alto y bajo CO₂ como los cambios de medio de cultivo.

3. CONSUMO DE NITRITO POR CELULAS INMOVILIZADAS DE *C. reinhardtii*

El trabajo que hemos desarrollado al caracterizar el consumo de nitrato por células de *C. reinhardtii* inmovilizadas en alginato cálcico pretende alcanzar los siguientes objetivos:

a) definir el comportamiento de las células inmovilizadas de *C. reinhardtii* de cara a dicho consumo, comparándolo con el que muestran cuando se encuentran libremente suspendidas.

b) determinar los valores óptimos de diversos parámetros que influyen de forma directa sobre la capacidad de consumo de nitrato por las células inmovilizadas, lo que permitiría obtener de ellas el máximo rendimiento.

Hay parámetros característicos de la inmovilización celular cuya influencia en el consumo de nitrato por las células hay que estudiar a la hora de definir un sistema eficaz. La carga celular en las perlas de alginato es un parámetro crítico para obtener una buena tasa de consumo de nitrato, pero hay que tener en cuenta que cuando se supera una carga óptima se generan, como vimos anteriormente, distintos tipos de problemas que disminuyen la eficacia del sistema. De la Figura 42 se deduce la importancia de trabajar con cargas celulares en torno a 30-40 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte, pues mantiene el consumo en los valores de las células libremente suspendidas. Dicho consumo desciende drásticamente para cargas elevadas.

Las restricciones difusionales aumentan con la concentración de la disolución de alginato, disminuyendo la velocidad de consumo de nitrato, según se deduce de los resultados obtenidos (Fig. 43). Aunque dichos resultados no coinciden con los estudios sobre difusión de sustratos en gel

de alginato cálcico realizados por Tanaka et al. (1984), en los que se apuntan restricciones difusionales considerables sólo para moléculas de alto peso molecular (albúmina y mayores), sí son consistentes con los obtenidos por otros autores que han utilizado sustratos de bajo peso molecular, como nitrato, nitrito o amonio (Garbisu et al. 1991; van Ginkel et al. 1983; Bailliez et al. 1986).

Cuando se emplean distintas intensidades de luz para estudiar como evoluciona la velocidad máxima de consumo de nitrito en las células inmovilizadas, se observa un efecto similar al producido ante un aumento de carga celular, es decir, un descenso de la velocidad de consumo al disminuir la intensidad con que se irradian los inóculos (Fig. 44). Evidentemente, ambos resultados conducen a similares conclusiones, puesto que el efecto pantalla ejercido por las capas de células externas sobre las más internas en las perlas de soporte, supone en la práctica un descenso en la intensidad de luz que reciben estas últimas. En este sentido se manifiestan los trabajos realizados por Chevalier y de la Noüe (1985 a,b) así como los obtenidos por Jeanfils y Thomas (1986) y Facchini y DiCosmo (1991).

En los sistemas inmovilizados resulta especialmente interesante estudiar la capacidad de reacción ante una limitación de nutrientes básicos. Si se elimina el suministro de carbono a las células inmovilizadas, durante un periodo de tiempo suficientemente elevado como para que las células pierdan su capacidad de consumo de nitrito, la reposición posterior del nutriente carbonado permite a las células recuperar de nuevo la capacidad de consumir nitrito, si bien se observa en las inmovilizadas un retardo con respecto a las libres en dicha recuperación (Fig. 45). El citado retardo se presenta como consecuencia de la difusión del CO₂ desde el medio, a través de distintas fases, hasta la células inmovilizadas, tal y como se detalló anteriormente al discutir los estudios sobre actividades biológicas. En cualquier caso, la recuperación de la máxima velocidad de consumo de nitrito se produce finalmente y al mismo tiempo que para las células libremente suspendidas.

La inmovilización de células de *C. reinhardtii* por atrapamiento en alginato cálcico no altera significativamente su capacidad de consumir nitrito, pero sí se incrementan sus posibilidades en función de las

condiciones medioambientales, como son el pH y la temperatura de trabajo. Al igual que han descrito otros autores para células no fotosintéticas (Tramper y de Man 1986), en el caso de *C. reinhardtii* el consumo de nitrito es máximo a la misma temperatura para las células libres e inmovilizadas, siendo muy interesante el hecho de que en un amplio intervalo de temperatura (20-40°C) el sistema de células inmovilizadas consume nitrito a una velocidad que no es inferior a un 75 % de la máxima (Fig. 46). Este fenómeno, consecuencia directa del efecto estabilizador que el soporte ejerce sobre el microambiente de las células, proporciona amplias posibilidades para el uso de las mismas, permitiéndoles mantener gran parte de su actividad en condiciones de temperatura que serían adversas de ser empleadas libremente suspendidas (Vílchez y Vega 1992).

El efecto del pH sobre el consumo de nitrito por las células inmovilizadas se caracteriza igualmente por el mantenimiento de la actividad de las mismas en un intervalo de pH amplio, observándose también un desplazamiento característico del máximo consumo hacia valores más altos de pH (Fig. 47). Similares resultados fueron observados por Jeanfils y Collard (1983) utilizando células de *Scenedesmus obliquus*. Según Smidsrod y Skjak-Braek (1990) este fenómeno podría estar estrechamente relacionado con la interacción electrostática, más o menos fuerte, de la carga negativa de las moléculas de soporte (alginato) con ciertas especies cargadas positivamente que se encuentren en el medio empleado, entre ellas los protones. Dichas interacciones podrían generar, por tanto, un aumento en las concentraciones locales de protones en torno a las células inmovilizadas en los poros del soporte, provocando valores de pH locales más bajos que los medidos en el medio externo al mismo. En esta situación, un incremento del pH en el medio permitiría a las células inmovilizadas alcanzar los máximos valores en la velocidad de consumo de nitrito. Este fenómeno se conoce como *efecto de partición*, y ha sido ampliamente descrito en los trabajos sobre inmovilización de enzimas (Trevan, 1980).

Estudios cinéticos han permitido estimar un valor de la K, para el nitrito en torno a 80 μM para las células inmovilizadas (Fig. 48), lo que supone una variación notable respecto a la obtenida para las células libremente

suspendidas, cuyo valor está en torno a $1,5 \mu\text{M}$ (Córdoba et al. 1986). Estos resultados, que están de acuerdo con los presentados para otros microorganismos, como la bacteria *Nitrobacter agilis* (Tramper y de Man 1986) inmovilizada en alginato cálcico, o la cianobacteria *Phormidium laminosum* (Serra et al. 1990) inmovilizada en diversos tipos de espumas, ponen de manifiesto dos hechos fundamentales que dificultan la disponibilidad de nitrito por las células inmovilizadas:

a) el acceso del mismo, negativamente cargado, desde un medio líquido hasta la superficie de un gel, igualmente con carga negativa y, posteriormente, a las membranas de las células próximas.

b) su difusión entre las capas de células que ocupan la mayor parte de los poros del soporte.

Evidentemente y según confirman los trabajos anteriormente citados, la consecución de las máximas velocidades de consumo de nitrito por células inmovilizadas requerirá, por tanto, concentraciones más elevadas del mismo.

Nuestros resultados indican que los valores de K , para nitrito aumentan significativamente, entre 10 y 50 veces, cuando se utilizan células inmovilizadas, pero permanecen lo suficientemente bajos como para que no se vea afectada la eficiencia del sistema.

Cuando nitrito y amonio están simultáneamente presentes en el medio, las células inmovilizadas consumen preferentemente amonio (Vega y Menacho 1990). Sólomente concentraciones elevadas de amonio impiden el consumo de nitrito en una cuantía importante, acentuándose la inhibición al disminuir la carga celular (Fig. 49). Puede deducirse, por tanto, que la propia situación física de las células, confinadas en un soporte, dificulta en gran medida la inhibición del consumo de nitrito por la presencia de amonio a concentraciones inferiores a $100 \mu\text{M}$, y con cargas celulares elevadas, incluso concentraciones de amonio superiores a $200 \mu\text{M}$ pueden resultar ineficaces en la inhibición del consumo de nitrito, lo que es un dato relevante que aconseja el uso de las células inmovilizadas en procesos selectivos de bioeliminación de nitrógeno inorgánico. Por otra parte, la

estabilidad mostrada por las células inmovilizadas después de distintos periodos de almacenamiento a 4°C en función de la actividad retenida (capacidad para el consumo de nitrito) hacen de ellas un atractivo sistema para potenciales aplicaciones en la eliminación de nitrógeno inorgánico en aguas domésticas.

Por lo tanto, se han caracterizado aquellos parámetros que determinan el consumo de nitrito en células inmovilizadas, apreciándose que, aunque la inmovilización no ejerce especial influencia sobre las tasas de consumo, sí permite operar más tiempo con las células y trabajar con tasas de consumo muy altas en intervalos de temperatura y pH bastante amplios. En procesos selectivos de consumo de nitrito, la inmovilización disminuye drásticamente la competencia que el amonio supone para el consumo de aquél cuando se utilizan células libremente suspendidas.

4. DESARROLLO DE BIORREACTORES PARA LA ELIMINACION DE NITRITO EN AGUAS DOMESTICAS MEDIANTE EL USO DE CELULAS INMOVILIZADAS

Después de caracterizar el consumo de nitrito por células inmovilizadas de *C. reinhardtii*, estudiamos su comportamiento de cara a dicho consumo, cuando se utilizan en reactores bioquímicos (biorreactores), con la idea de diseñar sistemas potencialmente útiles en la bioeliminación de N-contaminantes de aguas. En este sentido, hemos estudiado el consumo de nitrito por *C. reinhardtii* inmovilizadas en alginato cálcico, utilizando biorreactores o reactores bioquímicos (RB) sencillos de lecho fluidizado, concretamente el tipo *airlift*, trabajando en discontinuo (RAD) o en flujo continuo (RAC) los cuales, profundizando en los principios básicos de ingeniería de biorreactores, podrían complicarse mucho más mediante el acoplamiento de circuitos de reciclado que faciliten la adición completa del sustrato, incluso cuando es necesario mantener flujos elevados (Cheetham, 1986). El rendimiento de un RB se define normalmente por su actividad, estabilidad y selectividad, así como por su capacidad en la obtención (o

eliminación) del producto, del nivel de conversión del sustrato en producto que se pueda alcanzar y la concentración de los reactivos que se deben utilizar. Estas ideas básicas son las que se han intentado aplicar en nuestros sistemas, como corolario práctico a la caracterización del consumo de nitrito por células inmovilizadas.

El crecimiento celular en el soporte, tanto en RAD como en RAC, está caracterizado por las etapas anteriormente descritas (ver Figuras 51 y 52) como de latencia, exponencial, y una última fase estacionaria, en la que existe un equilibrio entre la generación de nuevas células en el soporte y la liberación de otras al medio, como consecuencia del incremento en la densidad celular inmovilizada. No se han observado diferencias sustanciales entre los tiempos de duración de las fases de latencia y exponencial respecto a las mostradas por células libremente suspendidas, si bien el tiempo que se tarda en alcanzar una determinada concentración de biomasa inmovilizada depende, fundamentalmente, de la que inicialmente quede atrapada (Jeanfils y Thomas, 1986), y en general, existe un ligero retraso en el crecimiento de las células inmovilizadas. Kuo-Cheng y Chang-Tze (1988) ya pusieron de manifiesto en células de *Trichosporon cutaneum* inmovilizadas en alginato que, al final de la fase exponencial de crecimiento, comenzaba la liberación de células al medio, como consecuencia del crecimiento de las colonias más superficiales. En la Figura 53 se aprecia, en un RAD, cómo en la fase exponencial comienza la liberación de células al medio externo, manteniendo un incremento constante en su número cuando se alcanza la fase estacionaria, caracterizada por una tasa de consumo igualmente constante. Esta liberación se verá facilitada por la apertura de canales que las moléculas de gases liberadas por las células inmovilizadas originan en su salida al exterior. Esta manifiesta resistencia física del soporte apoya, además, las tesis discutidas en anteriores apartados sobre las limitaciones difusionales para la salida al medio de dichas moléculas. Este hecho nos permitirá posteriormente razonar las ventajas de la co-inmovilización de células fotosintéticas y nitrificantes.

La forma de crecimiento celular descrita origina una singular distribución de la biomasa en las perlas de soporte, fundamentalmente

repartida en colonias superficiales y dejando el seno de la perla despoblado de células, como se indicó en la Figura 52. Estas observaciones coinciden con el modelo mostrado por De Gooijer et al. (1991). Durante la fase de latencia, las células se encuentran homogéneamente distribuidas a lo ancho de toda la sección de la perla de gel, y la difusión de sustratos al interior de las perlas permite el incremento en la clorofila. Posteriormente, las células más periféricas comienzan a dividirse de forma que se van poblando los poros libres cercanos a la superficie, mientras las células más internas comienzan a sufrir las consecuencias de las limitaciones de difusión de sustratos debido a dos razones fundamentales:

a) las nuevas células ocupan poros vacíos del soporte, y los caminos existentes en la red del polímero para la difusión de sustratos al interior son cada vez menos y más tortuosos.

b) la cada vez más extensa capa de colonias celulares próxima a la superficie de la perla absorbe la mayor parte de moléculas de sustrato que acceden al soporte desde el medio, con lo cual provocan una situación límite de estrés en las células más internas.

En consecuencia se produce la muerte de las células atrapadas en el seno de las perlas de gel y se desarrolla una capa de colonias muy cercana a la superficie, que es la responsable de la casi totalidad de la actividad del sistema de células inmovilizadas. Debido a la influencia directa de la luz, esta distribución de biomasa tiene lugar de forma más rápida en sistemas de células fotosintéticas, pues la muerte de las que están atrapadas en las zonas más internas del soporte, se produce de forma más rápida y sinérgica con el efecto pantalla y los factores anteriormente citados, relativos a la difusión de sustratos. Este mismo análisis ha sido interpretado por Mattiasson (1983) como una interesante ventaja de los sistemas inmovilizados, que permite, al menos estadísticamente, mayores posibilidades de contacto del sustrato con las células así distribuidas, al tiempo que la inmovilización constituye una protección de cara a la acción directa de inhibidores o microorganismos existentes en el medio. Dicho contacto, como ya se discutió en apartados anteriores, está limitado por la difusión que las moléculas deben realizar desde el medio hasta la membrana

celular, encontrando entre ambos la red del polímero, que puede incrementar inicialmente las restricciones difusionales. Esta limitación se traduciría en niveles de consumo de nitrito ligeramente más bajos que en las células libremente suspendidas cuando se trabaja en un RAD o RAC, ya que además de considerar este fenómeno en el reactor (Garbisu et al. 1991), debe tenerse en cuenta que las perlas que en cada momento se encuentran en el centro del reactor, pueden recibir menos luz y, por tanto, disminuir el rendimiento (Jeanfils y Thomas 1986). Este problema puede soslayarse con una agitación adecuada.

Nuestros resultados indican que las actividades fotosintética y respiratoria mostradas por células inmovilizadas en el reactor son consistentes con lo observado en la distribución del perfil de biomasa durante las distintas etapas caracterizadas por el crecimiento de las células en el soporte, tanto si están trabajando en RAD como en RAC. Como la biomasa inicialmente utilizada para la inmovilización de células era baja nos permitió obtener durante los primeros momentos de funcionamiento del RAD o RAC unos valores de actividad fotosintética más o menos elevados (Fig 54 y 57), y en cualquier caso, algo superiores a los mostrados por las células libremente suspendidas, en iguales condiciones antes de la inmovilización. Al iniciarse la fase exponencial de crecimiento, la difusión de sustratos al seno de las perlas de gel es aceptable, ya que todavía no se ha formado la película de colonias periféricas. Sin embargo, a medida que progresa el crecimiento celular no sólo se dificulta la difusión de nitrito al interior de la perla, sino también la salida del oxígeno producido como consecuencia de la actividad fotosintética, parte del cual, probablemente, sea incluso consumido en la actividad respiratoria, por parte de las células más periféricas, en su camino de salida al medio. Este hecho se discutió en el punto primero. Simultáneamente, se produciría entonces un descenso en la actividad fotosintética y respiratoria, las cuales se irían concretando en la periferia de la perla, virtualmente ocupada por colonias de células y estando el interior del soporte ocupado por algunas células individuales.

En este contexto, los resultados obtenidos por otros autores son bastantes heterogéneos. Brouers et al. (1982, 1983) y Jeanfils y Collard (1983) obtuvieron rendimientos bajos en la producción de oxígeno por

microorganismos fotosintéticos inmovilizados en varias matrices. Por el contrario, Musgrave et al. (1982) obtuvieron rendimientos entre el 75 y 100 % en *Anabaena sp.* inmovilizada en alginato. Thepenier y Gudín (1985) encontraron similares tasas de evolución de oxígeno para células de *Porphyridium cruentum* libres e inmovilizadas en poliuretano (PU), y Largeau et al. (1988) observaron valores más altos en células de *Botryococcus braunii* libremente suspendidas que en las inmovilizadas en PU, mostrándose lo contrario en células de *Phormidium* inmovilizadas en PU y polivinilo (Garbisu et al. 1991). Bailliez et al. (1986) obtienen rendimientos en la actividad fotosintética del 137 % en *B. braunii* respecto a las células libremente suspendidas, aduciendo que el efecto pantalla ejercido por las células más externas en las perlas de gel actúa eliminando una posible fotoinhibición. Además sugiere la idea de un incremento en la actividad fotosintética por la presencia de ciertos iones presentes en los procesos de inmovilización, y más concretamente, el Ca^{+2} en el caso del alginato. Los resultados que hemos obtenido y que fueron anteriormente detallados no apoyan dicha hipótesis.

Se ha determinado una operatividad (*estabilidad*) del sistema de células inmovilizadas de *C. reinhardtii* en un RAD de al menos tres semanas (datos no mostrados), realizando cargas sucesivas de medio con nitrito 6 mM cuando el existente en el reactor había sido eliminado. Durante este tiempo se mantuvieron los niveles de consumo de nitrito (*actividad*) en el sistema, razonablemente elevados y bastante similares a los mostrados por células libremente suspendidas. Un factor determinante en el análisis de la actividad del sistema es la concentración de nitrito que se necesita para operar con el máximo rendimiento. En la Figura 55 se observa que ésto sucede para concentraciones superiores a 600 μM , en las condiciones utilizadas (ver Tabla 5). Esto no indica que el sistema elimine nitrito sólomente por encima de ésta concentración, sino que por debajo lo hace a menor velocidad de la máxima, si se usan las condiciones descritas. Obviamente, el diseño del sistema puede cambiarse en muchos parámetros que influirían decisivamente en su rendimiento (cantidad de biocatalizador, tamaño del reactor, tasa de dilución, etc.).

Cuando las células inmovilizadas se utilizaron en un RAC, cuyas características se describieron en la Tabla 6, se alcanzó la fase estacionaria en 3 días, con una tasa de consumo de $120 \mu\text{mol/h}$ para una biomasa de $110 \mu\text{g Chl/g}$ de soporte (Fig. 56). La cantidad empleada de soporte fue de unos 140 g . Como se muestra en la Tabla 7, esta configuración permite obtener una velocidad específica de consumo en torno a $8 \mu\text{mol}/(\text{mg Chl}\cdot\text{h})$, con un periodo de operación continuo de, al menos, 500 h (unas tres semanas), lo que le confiere interesantes posibilidades de aplicación en condiciones reales.

En este sistema, ya en fase estacionaria, se mantenía un flujo constante de alimentación de medio que contenía nitrito en torno a 2 mM , determinándose una concentración constante en el efluente de $600 \mu\text{M}$ (Fig. 58), no observándose alteraciones en el funcionamiento del reactor durante el periodo mostrado. Esto permitía, según discutimos anteriormente, mantener la máxima actividad en el reactor. En estas condiciones, ambos sistemas gozan de una buena capacidad para su potencial empleo en la eliminación de nitrito en aguas domésticas, teniendo en cuenta que las concentraciones permitidas, como se comentó en la Introducción, son muy inferiores a las que estos sistemas pueden asimilar. La *selectividad* del sistema habría que definirla en condiciones reales, en función de los productos que contenga el agua a tratar, y que puedan competir con el nitrito para su consumo por parte de las células inmovilizadas. Conviene recordar que, aunque el amonio inhibe el consumo de nitrito por *C. reinhardtii* y que es frecuente su presencia en aguas potencialmente tratables con sistemas biológicos, el alga también lo eliminaría del medio por asimilación fotosintética, por lo que en principio no debe suponer problema alguno.

Cuando un sistema inmovilizado de *C. reinhardtii* opera en un biorreactor de flujo continuo durante un tiempo relativamente largo resulta importante determinar la evolución que tiene el crecimiento celular y su efecto en la actividad del sistema. El perfil de biomasa caracterizado en las tres etapas del crecimiento antes observadas en un biorreactor de flujo continuo es acorde con los modelos de crecimiento celular y consumo de sustratos en estas condiciones, publicados por otros autores (De Gooijer et

al. 1991). El equilibrio dinámico que se establece en la fase estacionaria entre la biomasa inmovilizada y la liberación de células al medio coincide con lo observado al final de la fase exponencial de crecimiento en otros microorganismos inmovilizados (Kuo-Cheng y Chang-Tze 1988). La larga estabilidad del sistema en estas condiciones permite hablar de la existencia de una regeneración celular cíclica y estable, con la formación de células jóvenes en las colonias más cercanas a la superficie del soporte que desplazarían de los poros a las células más viejas, evacuándolas del sistema y manteniendo un equilibrio fluido con el exterior. Esta biomasa eliminada, a bajas diluciones, puede contribuir de forma significativa al rendimiento del biorreactor (Black 1987).

La velocidad específica del crecimiento celular en un reactor debe mantenerse en un valor óptimo por un periodo de tiempo prolongado. Tales condiciones se pueden alcanzar en un cultivo continuo (Cheetham 1986), que es el método preferido para la producción de proteína en microorganismos. En el diseño de la Fig. 8, el depósito de medio de cultivo y el reactor se llenan con un medio de crecimiento que contenga el sustrato correspondiente, y se opera como en un cultivo discontinuo, hasta que la concentración de sustrato desciende a un valor lo suficientemente bajo como para que limite significativamente la velocidad de crecimiento. Mediante la lenta adición de medio de cultivo desde el depósito y con la ayuda de una bomba peristáltica, se permite el crecimiento a la velocidad que determina la entrada de dicho sustrato. Simultáneamente se va sacando medio de cultivo usado de manera que se mantenga el nivel de volumen constante en el depósito del reactor, con lo que la velocidad de crecimiento del cultivo iguala exactamente la velocidad de entrada del medio, que es también igual a la velocidad de salida del efluente. La concentración de biomasa, utilizando células libres, se mantendría por tanto constante siempre que la velocidad de flujo de la bomba, que llamamos F (l/h), y el volumen de la vasija, denominado V (l), den lugar a una velocidad de flujo por unidad de volumen que será F/V . Este cociente se conoce como tasa de dilución, D (h^{-1}). Podemos deducir la relación existente entre D y la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}), describiendo un balance de masas de la

siguiente forma:

Aumento biomasa cultivo cont. = veloc. crecim. en reactor - veloc. salida reactor

Es decir:

$$dx/dt = \mu x - Dx$$

Puesto que la concentración de biomasa permanece constante en el estado estacionario, se cumplirá que:

$$dx/dt = 0 \quad \text{y por tanto,} \quad \mu = D$$

Evidentemente, si la velocidad de crecimiento es demasiado lenta, se tiene un suministro de sustrato limitante insuficiente para obtener un aumento significativo de la biomasa, así como para asegurar el mantenimiento celular. Si se aumenta el flujo (aumenta D) para incrementar la entrada de sustrato al reactor y, consecuentemente, su actividad, se producirá el denominado efecto *wash-out*, es decir, la velocidad de renovación de medio es mayor que la de crecimiento celular, con lo que se producirá la pérdida de biomasa del sistema, si se encuentra libremente suspendida. Por el contrario, este problema se puede soslayar utilizando células inmovilizadas, ya que en la práctica es evidente la existencia de un límite de biomasa en el reactor por el confinamiento en un soporte poroso, lo que permite deducir dos hechos fundamentales:

a) estados de consumo constantes durante elevados periodos de tiempo, no existiendo situaciones de limitación de sustratos por incremento de la biomasa, manteniendo una concentración de sustrato en el efluente que no sea limitante para la actividad del reactor, como se deduce de la Fig. 58.

b) utilización de flujos elevados, permitiendo una mayor actividad del reactor sin que se produzca *wash-out* en las células inmovilizadas, que quedan retenidas en el mismo. En estas condiciones no habrá, pues, crecimiento de células libres, como se mostró en Resultados (Rosevear et al. 1987).

Este análisis apunta la posibilidad clara de utilizar flujos elevados con sistemas de células inmovilizadas lo que en general, y determinando un óptimo al representar la productividad frente a la tasa de dilución (D), aumenta la actividad del reactor.

Nosotros hemos establecido en nuestros experimentos una tasa de dilución $\mu = D$, que nos permite prácticamente delimitar un grado de efectividad medio del reactor, que podría incrementarse muy poco al aumentar D, en vista de los resultados obtenidos en los efluentes a dicha dilución. En *C. reinhardtii* tenemos que:

$$\mu = 0,067 \text{ h}^{-1} = D$$

y por tanto, si

$$D = F/V \quad \text{entonces,} \quad F = 0,067 \text{ h}^{-1} \cdot 1400 \text{ ml} = 90 \text{ ml/h}$$

En estas condiciones, empleando una concentración de nitrito de 1,9 mM en el medio del depósito, se obtiene un efluente que contiene nitrito 0,7 mM, por encima de las condiciones de limitación de sustrato, según se dedujo de la Fig. 58. Actualmente se están desarrollando muchos sistemas que emplean microorganismos para la eliminación de la contaminación de aguas por nitrógeno inorgánico, y que van desde modelos a escala piloto (Coelhoso et al. 1992) hasta estudios en estanques de gran volumen con aguas residuales urbanas (Constable et al. 1989; de la Noüe et al. 1991). De cara a un futuro inmediato, sin duda será éste un campo muy potenciado dentro de la Biotecnología de microorganismos.

5. POSIBILIDADES DE CO-INMOVILIZACION DE CELULAS DE *C. reinhardtii* CON BACTERIAS NITRIFICANTES

El crecimiento celular de *N. agilis* inmovilizadas en carragenato se desarrolló según las mismas etapas anteriormente discutidas para el caso de

las células de *C. reinhardtii* inmovilizadas en alginato. Evidentemente y ateniéndonos a los resultados obtenidos (Fig. 61), la capacidad para transformar -que no eliminar- el nitrito del medio por dicha bacteria nitrificante es muy elevada, mostrando una actividad alta y constante al llegar a la fase estacionaria de crecimiento, lo que se refuerza en los estudios de estabilidad operativa del sistema, que puede trabajar al máximo rendimiento durante, al menos, 30 días, a un flujo equivalente a $\mu = 2D$ (Fig. 62). De cualquier forma, dicho sistema, al igual que los anteriormente estudiados, no presenta diferencias notables si se trabaja con una tasa de dilución igual a la de crecimiento específico, salvo en el hecho, más o menos crucial en la actividad del reactor (Black 1987) de la liberación de células que se produce y que origina crecimiento en el medio. En este sentido resulta interesante el estudio de la liberación de células desde el soporte al exterior al variar la tasa de dilución, pues se puede establecer en la práctica cual es el flujo al cual se produce *wash-out*.

Aunque existen diferencias evidentes entre las velocidades de colonización del soporte entre el alga fotosintética *C. reinhardtii* y la bacteria nitrificante en cuestión (Fig. 61), de los resultados obtenidos se desprende la atractiva posibilidad de co-inmovilizar microorganismos productores y demandantes de oxígeno con la idea de aprovechar las características de ambos en sistemas de tratamiento de aguas. Esta posibilidad, no muy desarrollada hasta el momento, ha sido abordada en algunas revisiones interesantes (Hahn-Hägerdahl 1983). De nuestros estudios se desprenden varias razones que inducen a apoyar la tesis de un sistema co-inmovilizado favorable:

a) teniendo la actividad observada en las células de *N. agilis* durante el consumo de nitrito en el reactor ($0,006 \mu\text{mol/ml gel.s}$, equivalentes a $22 \mu\text{mol/ml gel.h}$), y la actividad fotosintética mostrada por las células de *C. reinhardtii* en sistemas análogos (en torno a $100 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl.h}$, equivalentes a $20 \mu\text{mol/ml gel.h}$, para una carga de $100 \mu\text{g Chl/g gel}$), se deduce que el oxígeno liberado por estas últimas como consecuencia de su actividad fotosintética es del orden del demandado por las primeras para realizar su actividad nitrificante en la oxidación del nitrito, lo que en

términos cuantitativos es un factor importante que soporta la tesis de la co-inmovilización.

b) las limitaciones en la difusión de moléculas, extensamente discutidas durante el presente trabajo, desde y hacia el soporte en el cual se encuentran inmovilizadas las células, suponen en el caso del oxígeno un apoyo evidente a la idea de la co-inmovilización de ambos microorganismos. La generación de oxígeno en sistemas co-inmovilizados, siendo uno de ellos fotosintético, ha sido descrita en algunos trabajos (Aldercreutz y Mattiasson 1982), que han apoyado la idea, ya discutida a lo largo de nuestro trabajo, de que la retención que el soporte supone para la exclusión al medio de las moléculas de oxígeno, facilita en gran medida su acceso a las células co-inmovilizadas que lo demandan, al aumentar el tiempo de residencia en la red del polímero y provocar con ello concentraciones locales de oxígeno relativamente elevadas (Bailliez et al. 1986).

c) finalmente, un factor sinérgico con los anteriores y específico para el caso concreto que se discute, es la capacidad asimilatoria de nitrato que posee *C. reinhardtii* y que contribuiría igualmente al consumo del nitrato formado por *Nitrobacter*.

Por las razones expuestas, parece a todas luces interesante profundizar en las posibilidades de este sistema con estudios de co-inmovilización detallados, aplicados fundamentalmente a diseños de biorreactores, cuya potencial utilización para la resolución de problemas reales hace de ellos un instrumento fundamental en la tecnología del tratamiento de aguas a corto y medio plazo. Actualmente se están desarrollando algunos sistemas a base de enzimas asimilatorias, concretamente la NADH-nitrato reductasa de maíz, y denitrificante, como la nitrito reductasa y N_2O reductasa de *Rhodopseudomonas*, co-inmovilizadas en polímeros de vinilo para la eliminación de nitratos y nitritos en aguas (Mellor et al. 1992), que apoyan esta última idea de gran interés para su aplicación en este importante campo de la Biotecnología.

V Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo extraemos las siguientes conclusiones:

1. Las células del alga verde *C. reinhardtii* inmovilizadas por atrapamiento en matriz de alginato cálcico presentan una actividad fotosintética y fotorrespiratoria superior a la que muestran las correspondientes células en libre suspensión. En cambio, la actividad respiratoria no se altera significativamente a causa de la inmovilización. Cargas celulares superiores a 100 μg Chl/g de soporte y concentraciones de alginato por encima del 3% (p/v) son causa, respectivamente, de efecto pantalla y baja difusión de sustratos, que determinan en general actividades más bajas.
2. La inmovilización ejerce un efecto estabilizador sobre las células de *C. reinhardtii*, observándose para la actividad fotosintética variaciones más suaves que en las células libremente suspendidas, al trabajar en amplios márgenes de temperatura y pH.
3. Las células de *C. reinhardtii* fotoproducen glicolato cuando se transfieren desde unas condiciones de cultivo con alto CO_2 (5% v/v en aire) a otras con baja concentración de CO_2 (inferior al 0,4% v/v en aire) y en la presencia de 1 mM de aminoacetoacetato, inhibidor de transaminasas. Para sostener esta actividad productiva un tiempo superior a 12 h es necesario además añadir al cultivo 50 μM de acetazolamida, inhibidor de la anhidrasa carbónica. Las condiciones óptimas para el desarrollo de dicha producción

requieren que el cultivo se ilumine con luz blanca de 40-50 W/m², temperatura entre 25-30°C y pH 8,0.

4. Por su parte, las células inmobilizadas suministran un sistema más versátil y estable de fotoproducción de glicolato que los cultivos en libre suspensión, y para ellas se han determinado además otros parámetros óptimos, como son una carga celular de 30 a 40 $\mu\text{g Chl/g}$ de soporte y una viscosidad de la suspensión de alginato de 7,000 cps.

5. Bajo estas condiciones, las células atrapadas en perlas de alginato producen glicolato durante un periodo de 12 h, mostrando una velocidad de fotoproducción de 23 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$, que es aproximadamente el doble que la mostrada por las células en libre suspensión, 12 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$. Además, presentan una gran estabilidad en almacenamiento, recuperando el 90% de la capacidad de fotoproducción después de 2 meses a 4°C.

6. Se ha diseñado un sistema de fotoproducción discontinua de glicolato, consistente en la recuperación celular durante 12 h en alto CO₂ después de cada periodo productivo, resuspendiéndolas para ello en nuevo medio de cultivo sin inhibidores y agitándolas con aire enriquecido con CO₂ al 5% (v/v). De esta forma, la capacidad productiva del sistema inmobilizado puede alargarse hasta 4 días, si se alternan periodos de 12 h de fotoproducción con 12 h de dicha recuperación celular.

7. Los datos obtenidos de las actividades fotosintética, respiratoria y fotorrespiratoria (excreción de glicolato) en células inmobilizadas de *C. reinhardtii* permiten sugerir que el atrapamiento en alginato de células fotosintéticas influye de forma notoria en la relación O₂/CO₂ en el microambiente de las mismas, lo que afecta decisivamente a los procesos celulares que de dicha relación dependan.

8. El consumo de nitrito por células de *C. reinhardtii* inmobilizadas en alginato cálcico es máximo a pH 6,5-7,0 y una temperatura de 30°C. La inhibición por amonio de dicho consumo es siempre más baja en el caso de

las células inmovilizadas que en aquellas en libre suspensión. Por otra parte, el sistema inmovilizado es más estable ya que puede reutilizarse después de 5 días a 4°C, siendo la velocidad de consumo de nitrito en torno al 90% de la inicialmente mostrada.

9. El desarrollo de un sistema de eliminación de nitrito de aguas y eventualmente otros compuestos nitrogenados como amonio o nitrato, a base de células inmovilizadas en alginato e incubadas en un biorreactor de flujo continuo, permite alcanzar una situación estacionaria que se caracteriza, a los 8 días, por un valor de biomasa de 110 $\mu\text{g Chl/h}$ y un consumo máximo de nitrito de 8 $\mu\text{mol}/(\text{mg Chl.h})$, manteniendo una concentración de 1,9 mM de nitrito en el líquido de alimentación del biorreactor.

10. La capacidad de convertir nitrito en nitrato por bacterias nitrificantes del tipo *N. agilis* inmovilizadas en carragenato es muy alta y estable durante al menos 30 días. Dado que el nitrato es la mejor fuente de nitrógeno para *C. reinhardtii* y que no presenta la toxicidad que el nitrito, nuestros datos apuntan a que la co-inmovilización de células de bacteria y alga pueden suministrar un sistema operativo y estable, en un biorreactor de flujo continuo, para eliminar contaminantes nitrogenados de las aguas.

VI Bibliografía

Aaronson S, Berner T, Dubinsky Z (1980) Microalgae as a source of chemicals and natural products. En: Shelef G, Soeder CJ (eds) Algae biomass. pp 575-601. Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam

Adlercreutz P, Mattiasson B (1982) Oxygen supply to immobilized cells: 1. Oxygen production by immobilized *Chlorella pyrenoidosa*. Enzyme Microb Technol 4:332-336

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24:1-15

Aziz MA, Ng WJ (1992) Feasibility of wastewater treatment using the activated-algae process. Bioresour Technol 40:205-208

Badger MR, Kaplan A, Berry JA (1980) Internal inorganic carbon pool of *C. reinhardtii*. Evidence for a carbon dioxide concentrating mechanism. Plant Physiol 65:407-413

Bailliez C, Largeau C, Casadevall E (1985) Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. Appl Microbiol Biotechnol 23:99-105

Bailliez C, Largeau C, Berkaloff C, Casadevall E (1986) Immobilization of *Botriococcus braunii* in alginate: influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. Appl Microbiol Biotechnol 23:361-366

Ballesteros A et al. (1983) Working Party on Immobilized Biocatalysis of the European Federation on Biotechnology. Guidelines for the characterization of immobilized biocatalysts. *Enzyme Microb Technol* 5:304-307

Barkley NP (1991) Extraction of mercury from groundwater using immobilized algae. *J Air Waste Mgmt Assoc* 41:1387-1393

Becker JD, Dohler G, Egle K (1968) The effect of monochromatic light on the extracellular excretion of glycolate during photosynthesis of *Chlorella*. *Z Pflanzenphysiol* 58:212-221

Berry J, Boynton J, Kaplan A, Badger M (1976) Growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* as a function of CO₂ concentration. *Carnegie Inst Year Book* 75:423-432

Beudeker RF, Tabita FR (1983) Control of photorespiratory glycolate metabolism in an oxygen-resistant mutant of *Chlorella sorokiniana*. *J Bacteriol* 155:650-656

Beudeker RF, Tabita FR (1984) Glycolate metabolism is under nitrogen control in *Chlorella*. *Plant Physiol* 75:516-520

Black GM (1987) Characteristics and performance of immobilized cell reactors. En: Webb C, Black GM, Atkinson B (eds) *Process engineering aspects of immobilized cell systems*. pp 75-86. The Institution of Chemical Engineers, Warwickshire

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

Brouers M, Hall DO (1986) Ammonia and hydrogen production by immobilized cyanobacteria. *J Biotechnol* 23:99-105

Brouers M, Collard F, Jeanfils J, Jeanson A (1982) Immobilization and stabilization of green and blue green algae in crosslinked serumalbumin glutaraldehyde and in polyurethane matrices. *Solar Energy R and D in the European Community Series D1*:134-139

Brouers M, Collard F, Jeanfils J, Loudeche R (1983) Long term stabilization of photobiological activities of immobilized algae. Photoproduction of hydrogen by immobilized "adapted" *Scenedesmus* cells. *Solar Energy R and D in the European Community Series D2*:171-178

Bruin WJ, Nelson EB, Tolbert NE (1970) Glycolate pathway in green algae. *Plant Physiol* 46:386-391

Calkins VP (1943) Microdetermination of glycolic and oxalic acid. *Ind Eng Chem Anal Ed* 15:762-763

Cheetham, PSJ (1986) Utilización de enzimas y células inmovilizadas y reactores bioquímicos en biotecnología. Principios de ingeniería enzimática. En: Wiseman A (ed) Principios de Biotecnología. pp 200-242. Acribia, Zaragoza

Chevalier P, de la Noüe J (1985,a) Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microb Technol* 7:621-624

Chevalier P, de la Noüe J (1985,b) Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnol Lett* 7:395-400

Chevalier P, de la Noüe J (1988) Behavior of algae and bacteria co-immobilized in carrageenan, in a fluidized bed. *Enzyme Microb Technol* 10:19-23

Chibata I, Tosa T (1981) Use of immobilized cells. *Ann Rev Biophys Bioenerg* 10:197-216

Codd GA, Stewart WDP (1973) Pathways of glycolate metabolism in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch Microbiol* 94:11-28

Coelhoso I, Boaventura R, Rodrigues A (1992) Biofilm reactors: an experimental and modelling study of wastewater denitrification in fluidized-bed reactors of activated carbon particles. *Biotechnol Bioeng* 40:625-633

Coleman JR, Berry JA, Togasaki RK, Grossman AR (1984) Identification of extracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 76:472-477

Constable JD, Scott PH, Connor MA (1989) Fixed bed nitrification as a potential means of enhanced nitrogen removal rates in a lagoon. *Proc AWWA 13th Federal Convention*. pp 192-196. Canberra

Córdoba F, Cárdenas J, Fernández E (1986) Kinetic characterization of nitrite uptake and reduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 82:904-908

Dainty AL, Goulding KH, Robinson PK, Simpkins I, Trevan MD (1986) Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnol Bioeng* 28:210-216

Day JG, Codd GA (1985) Photosynthesis and glycolate excretion by immobilized *Chlorella emersoni*. *Biotechnol Lett* 7:573-576

De Gooijer CD, Wijffels RH, Tramper J (1991) Growth and substrate consumption of *Nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan: part 1. Dynamic modelling. *Biotech Bioeng* 38:224-231

de la Noüe J, Chevalier P, Proulx D (1990) Effluent treatment with immobilized microalgae and cyanobacteria. A critical assessment. En: Tyagi RD, Vembu K (eds). *Wastewater treatment by immobilized cells*. pp 143-153. CRC Press. Boston

de la Noüe J, de Pauw N (1988) The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotech Adv* 6:725-770

de la Noüe J, Proulx D (1991) Immobilized algal systems for wastewater treatment. En: Libro de ponencias del curso Biotecnología en el tratamiento de aguas. pp 354-387. Biotek, Bilbao

Dvorak DH, Hedin RS, Edenborn HM, McIntire PE (1992) Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: results from pilot-scale reactors. *Biotechnol Bioeng* 40:609-616

Facchini PJ, DiCosmo F (1991) Secondary metabolite biosynthesis in cultures cells of *Catharanthus roseus* (L.) immobilized by adhesion to glass fibres. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:382-392

Fernández L, López JA, Navarrete P, Ocaña L, Sánchez J (1989) Contaminación de las aguas subterráneas: la problemática de los nitratos y su incidencia en España. Instituto Tecnológico Geominero de España, Madrid

Findenegg GR (1977) Interaction of glycolate, bicarbonate, chloride and H⁺ balance of *Scenedesmus obliquus*. *Planta* 135:33-38

Galván F, Borrero JA, Vílchez C, Santos-Rosa F (1990) Photosynthetic, respiratory and photorespiratory activities in *Chlamydomonas reinhardtii* cells entrapped in alginate matrix. En: de Bont JAM, Visser J, Mattiasson B, Tramper J (eds). Physiology of immobilized cells. pp 421-426. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

Gauthier J, Talbot P, Lessard G, Pouliot Y, de la Noüe J (1985) Epuration du lisier de porc et production de spiruline. Centre de Recherche en Nutrition et Compagnie Lallemand, Quevec

Garbisu C, Gil JM, Bazin MJ, Hall DO, Serra JL (1991) Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. J Appl Phycol 3:221-234

Gilvery RW, Goldstein GW (1986) Bioquímica. Aplicaciones clínicas. pp 750. Interamericana, Mexico DF

Greenberg AE, Trussel RR, Clesceri LS (1985) Standard methods for the examination of water and waste water. 16th Ed. American public health association, Washington DC

Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Ann Rev Plant Physiol 32:169-204

Hahn-Hägerdahl B (1983) Co-immobilization involving cells, organelles, and enzymes. En: Mattiasson B (ed) Immobilized cells and organelles. pp 79-94. CRC Press, Boca Raton

Hall DO, Rao KK (1989) Immobilized photosynthetic membranes and cells for the production of fuels and chemicals. Chimicaoggi, March 40-47

Hall DO, Rao KK (1991) Use of immobilized cyanobacteria for the removal of nitrate and nitrite from water: theory and immobilization procedures. En: Libro de ponencias del curso Biotecnología en el tratamiento de aguas. pp 388-391. Biotek, Bilbao

Hess JL, Tolbert NE (1967) Glycolate pathway in algae. *Plant Physiol* 42:371-379

Høyem T (1974) Nitrate and nitrite contents in Norwegian food. *Proc IV Int Congr Food Sci Technol* 3:466-470

Husic HD, Tolbert NE (1984) Anion and divalent cation activation of phosphoglycolate phosphatase from leaves. *Arch Biochem Biophys* 229:64-72

Husic DW, Husic HD, Tolbert NE (1987) The oxydative photosynthetic carbon cycle or C₂ cycle. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 5:45-100

Hutner SH, Provosoli L, Schatz A, Haskins CP (1950) Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc Amer Phil Soc* 94:152-170

Ingle RK, Colman B (1976) The relationship between carbonic anhydrase activity and glycolate excretion in the blue green alga *Coccochloris peniocystis*. *Planta* 128:217-223

Jägerstad M, Nordén A (1976) Dietary intake of nitrate and nitrite using the duplicate sampling portion technique. *Ambio* 6:276-277

Jahnke LS (1981) Indirect effects of hydroxypyridinemethanesulfonate and cyanide on photosynthesis and glycolate excretion in *Chlorella*. *Z Pflanzenphysiol* 104:373-383

Jeanfils J, Collard F (1983) Effect of immobilizing *Scenedesmus obliquus* cells in a matrix on oxygen evolution and fluorescence properties. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 17:254-257

Jeanfils J, Thomas D (1986) Culture and nitrite uptake in immobilized *Scenedesmus obliquus*. Appl Microbiol Biotechnol 24:417-422

Kaplan A, Berry JA (1981) Glycolate excretion and the oxygen to carbon dioxide net exchange ratio during photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 67:229-232

Kaplan A, Badger MR, Berry JA (1980) Photosynthesis and the intracellular inorganic carbon pool in the blue green alga *Anabaena variabilis*: response to external CO₂ concentrations. Planta 149:219-226

Kayano H, Matsunaga T, Karube I, Suzuki S (1981) Hydrogen evolution by co-immobilized *Chlorella vulgaris* and *Clostridium butyricum* cells. Biochim Biophys Acta 638:80-85

Keevil CW, West AA, Walker JT, Lee JV, Dennis TLJ, Colbourne JS (1989) Biofilms: detections, implications and solutions. En: Wheeler D, Richardson ML, Bridges J (eds) Proceedings of the IAWPRC Vol II. pp 367-374. Pergamon Press, Oxford

Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ (1978) The photorespiratory nitrogen cycle. Nature 275:741-743

Kilani JS (1992) Studies on the treatment of dairy wastes in an algal pond. Water SA 18:57-62

Krampitz LO, Yarris CE (1983) Glycolate formation and excretion by *Chlorella pyrenoidosa* and *Netrium digitus*. Plant Physiol 72:1084-1087

Kumar PA, Nair TVR, Abrol YP (1984) Effect of photorespiratory metabolites inhibitors and methionine sulphoximine on the accumulation of ammonia in the leaves of mung bean and amaranthus. *Plant Sci Lett* 33:303-307

Kuo-Cheng C, Chang-Tze H (1988) Effects on the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. *Enzyme Microb Technol* 10:284-292

Laliberté G, Proulx D, de Pauw N, de la Noüe J (1992) Algal technology in wastewater treatment. En: Rai LC, Gaur SP (eds). *Phycological perspectives in water pollution*. Springer Verlag, New York (en prensa)

Largeau C, Bailliez C, Yang LW, Frenz J, Casadevall E (1988) Immobilization of the microalga *Botryococcus braunii* in calcium alginate gels and in polyurethane foams. Effect of immobilization on the alga metabolism-metabolite recovery by solvent extraction. En: Stadler T, Mollion J, Verdus Y, Karamanos H, Morvan H, Christiaen D (eds) *Algal Biotechnology*. pp 245-253. Elsevier Applied Science, London

Larsson M, Ingemarsson B, Larsson CM (1982) Photosynthetic energy supply for nitrate assimilation in *Scenedesmus*. *Physiol Plant* 55:301-308

Le Chevalier MW, Cawthorn CD, Lee RG (1988) Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environment Microbiol* 54:2492-2499

Leegood RC (1985) Regulation of photosynthetic CO₂-pathways enzymes by light and other factors. *Photosynthesis Res* 6:247-259

Leegood RC, Walker DA (1983) The role of transmembrane solute flux in regulation of CO₂ fixation in chloroplast. *Biochem Soc Trans* 11:74-76

- Lord JM, Codd GA, Merrett MJ (1970) The effect of light quality on glycolate formation and excretion in algae. *Plant Physiol* 46:855-856
- Lorimer GH, Andrews TJ, Tolbert NE (1973) Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction products and mechanism of action. *Biochemistry* 12:18-23
- Losada M, Guerrero MG, De la Rosa MA, Serrano A, Hervás M, Ortega JM (1990) Sequential transduction of light into redox and acid-base energy in photosynthesis. *Bioelectrochem Bioenerg* 23:105-128
- Machler F, Schnyder H, Nosberger J (1984) Influence of inorganic phosphate on photosynthesis of wheat chloroplasts. I. Photosynthesis and assimilate export at 5°C and 25°C. *J Exp Bot* 35:481-487
- Mackerness CW, Keevil CW (1991) Origin and significance of nitrite in water. En: Hill MJ (ed) *Nitrates and nitrites in food and water*. pp 77-92. Ellis Horwood, England
- Martínez-Molina E, Velázquez E (1992) Organismos fijadores de nitrógeno atmosférico. En: González-López J y Lluch C (eds). *Biología del nitrógeno*. pp. 57-70. Ed Rueda, Madrid
- Mattiasson B (1983) Immobilization methods. En: Mattiasson B (ed) *Immobilized cells and organelles (I)*. pp 3-25. CRC Press, Boca Raton
- Meeting B, Payne JW (1986) Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microbiol Technol* 8:386-394
- Mellor RB, Ronnenberg J, Campbell WH, Diekmann S (1992) Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature* 355:717-719

-
- Miller AG, Colman B (1980) Active transport and accumulation of bicarbonate by a unicellular cyanobacterium. *J Bacteriol* 143:1252-1259
- Moroney JV, Husic HD, Tolbert NE (1985) Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 79:177-183
- Moroney JV, Wilson BJ, Tolbert NE (1986) Glycolate metabolism and excretion by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 82:821-826
- Mücke I, Hartmeier W (1985). Basic trials to co-immobilize algae and yeasts for the production of ethanol. 3rd Int Conf Biomass. Venice. p 660. Elsevier Applied Science, New York
- Musgrave SC, Kerby NW, Codd GA, Stewart WDP (1982) Sustained ammonia production by immobilized filaments of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* 27893. *Biotechnol Lett* 4:647-652
- Nelson EB, Tolbert NE (1969) The regulation of glycolate metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 184:263-270
- Newsholme EA, Leech AR (1986) En: Arnold S, Relman MD (eds) *Bioquímica médica*. pp 138,570. Interamericana, Madrid
- Nguyen, AL, Luong JHT (1986) Diffusion in carrageenan gel beads. *Biotechnol Bioeng* 28:1261-1267
- Ogren WL (1984) Photorespiration: pathways, regulation, and modification. *Annu Rev Plant Physiol* 35:415-442
- Osmond CB (1981) Photorespiration and photoinhibition. *Biochim Biophys Acta* 639:77-83

Park IH, Rao KK, Hall DO (1991) Photoproduction of hydrogen, hydrogen peroxide and ammonia using immobilized cyanobacteria. *Int J Hydrogen Energy* 16:307-312

Peltier G, Thibault P (1985) Light-dependent oxygen uptake, glycolate, and ammonia release in L-methionine sulfoximine-treated *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 77:281-284

Proulx D, de la Noüe J (1988) Removal of macronutrients from wastewater by immobilized algae. En: Moo-Young M (ed). *Bioreactor immobilized enzymes and cells. Fundamentals and applications*. pp 301-310. Elsevier Applied Science, London

Rai LC, Mallick N (1992) Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. *World J Microbiol Biotechnol* 8:110-114

Ramakrishna SV, Sreedharan VP, Prema P (1988) Continuous ethanol production with immobilized yeast cells in a packed bed reactor. En: Moo-Young M (ed) *Bioreactor immobilized enzymes and cells. Fundamentals and applications*. pp 251-260. Elsevier, London

Rao KK, Hall DO (1990) Immobilized photosynthetic systems. Applications in Biotechnology. En: *Trends in Photosynthesis Research. Advanced Course*. pp 153-158. CSIC, Palma de Mallorca

Rideal EK, Roberts R (1951) The photochemistry of native proteins. *Proc R Soc Lond Ser A* 205:391-408

Rosevear A, Lambe CA (1983) En: Wiseman A (ed). *Topics in enzyme and fermentation biotechnology*. Vol 7. Ellis Horwood

Rosevear A, Kennedy JF, Cabral JMS (1987) Reactors. En: Rosevear A, Kennedy JF, Cabral JMS (eds) Immobilized enzymes and cells. pp 171-204. Adam Hilger, Bristol

Sander J (1971) Untersuchungen über die entstehung cancerogener nitrosenerbindung im magen von versuchstieren and ihre bedeutung für die menschen. *Arzneim-Forsch* 21:1572-1580

Santos-Rosa F, Galván F, Vega JM (1989) Biological viability of *Chlamydomonas reinhardtii* cells entrapped in alginate beads for ammonium photoproduction. *J Biotechnol* 9:209-220

Sato K, Toda KJ (1983) *Ferment Technol* 61:239-245

Scott CD (1987) Immobilized cells: a review of recent literature. *Enzyme Microb Technol* 9:66-73

Scott RI, Wills SJ, Bucke C (1988) Oxygen uptake by carrageenan entrapped *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme Microb Technol* 10:151-155

Serra JL, Arizmendi JM, Blanco F, Martínez-Bilbao M, Alaña A, Fresnedo O, Urkijo I, Llama MJ (1990) Nitrate assimilation in the non N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. En: Ullrich WR, Rigano C, Fuggi A, Aparicio PJ (eds). Inorganic nitrogen metabolism. pp 196-202. Springer Verlag, Berlin

Shiraiwa Y, Miyachi S (1985) Effects of temperature and CO₂ concentration on induction of carbonic anhydrase and changes in efficiency of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* 11h. *Plant Cell Physiol* 26:543-549

Smidsrod O, Skjak-Braek G (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotech* 8:71-78

Smith MR, de Haan A, Wijffels RH, Beuling EE, Vilchez C, de Bont JAM (1991) Analysis of growth and specific activities of immobilized microbial cells. *Biotechnol Tech* 5:323-326

Snell FD, Snell CT (1949) *Colorimetric methods of analysis*. Vol. 3. pp 804-805. Van Nostrand, New York

Soeder CJ, Binsack R (1978) *Microalgae for food and feed*. *Ergebnisse der Limnologie*. Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

Solorzano L (1969) Determination of ammonia in natural water by phenolhypochlorite method. *Limnol Oceanogr* 14:799-801

Spalding BJ (1991) A growth market for bioreactors?. *Biotechnology* 9:338-341

Spinks A (1980) *Biotechnology, report of a joint working party*. HMSO London (Joint working party-Advisory council for applied research and development, Advisory board for the research councils, and the Royal Society)

Stephany RW, Schuller PL (1978) The intake of nitrate, nitrite, volatile N-nitrosamines and the occurrence of volatile N-nitrosamines in human urine and veal calves. En: Walker EA, Castegnaro M, Griecute L, Lyle RE, Davis W (eds). *Environmental aspects of N-nitroso compounds*. Vol 19, pp 443-460. IARC Scientific Publication, Lyon

Sueoka N, Chiang KS, Kates JR (1967) Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J Mol Biol* 25:47-66

Sumino T, Ootake Y, Nakamura H (1987) Nitrogen removal with use of microorganisms immobilized in polyacrylamide. *J Water Waste* 29:735-741

Sumino T, Nakamura H, Mori N, Kawaguchi Y, Tada M (1992) Immobilization of nitrifying bacteria in porous pellets of urethane gel for removal of ammonium nitrogen from waste-water. *Appl Microbiol Biotechnol* 36:556-560

Talbot P, de la Noüe J (1988) Evaluation of *Phormidium bohneri* for solar biotechnology. En: Stadler T, Mollion J, Verdus MC, Karamanos Y, Morvan H, Christiaen D (eds) *Algal biotechnology*. pp 403-411. Elsevier, London

Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA (1984) Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 26:53-58

Thepenier C, Gudin C (1985) Immobilization of *Porphyridium cruentum* in polyurethane foams for the production of polysaccharide. *Biomass* 7:225-240

Tolbert NE (1980) Photorespiration. En: Davies DD (ed) *The biochemistry of plants*. Vol. 2, pp 487-523. Academic Press, New York

Tolbert NE, Harrison M, Selph N (1983) Aminooxyacetate stimulation of glycolate formation and excretion by *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 72:1075-1083

Tramper J, de Man AWA (1986) Characterization of *Nitrobacter agilis* immobilized in calcium alginate. *Enzyme Microb Technol* 8:472-476

Travieso L, Benítez F, Dupeiron R (1992) Sewage treatment using immobilized microalgae. *Bioresour Technol* 40:183-187

Trevan MD (1980) Immobilized enzymes: an introduction and applications in Biotechnology. John Wiley & Sons, New York

Trevan MD, Mak AL (1988) Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. Trends Biotech 6:68-73

van Ginkel CG, Tramper J, Luyben AM, Klapwijk A (1983) Characterization of *Nitrosomonas europaea* immobilized in calcium alginate. Enzyme Microb Technol 5:297-303

Vega JM, Cárdenas J, Losada M (1980) Ferredoxin-nitrite reductase. Methods Enzymol 69:255-270

Vega JM, Castillo F, Cárdenas J (1983) La bioconversión de la energía. pp 20. Editorial Pirámide, Madrid

Vega JM, Menacho A (1990) Regulation of inorganic nitrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. En: Ullrich WR, Rigano C, Fuggi A, Aparicio PJ (eds) Inorganic nitrogen in plants and microorganisms. pp 73-78. Springer Verlag, Berlin

Vega JM, Menacho A, León J (1991) Nitrate assimilation by microalgae. Trends Photochem Photobiol 2:69-111

Venkatasubramanian K, Karkare SB (1983) Process engineering considerations in the development of immobilized living cells systems. En: Mattiasson B (ed) Immobilized cells and organelles. pp 133-144. CRC Press, Boca Raton

Venkatasubramanian K, Karkare SB, Vieth WR (1983) Chemical engineering analysis of immobilized cell systems. Appl Biochem Bioeng 4:311-349.

Vílchez C, Vega JM (1992) Consumo de nitrito por células de *Chlamydomonas reinhardtii* inmovilizadas en alginato cálcico. En: Pineda M, Castillo F (eds). Metabolismo del nitrógeno. Sociedad Española de Bioquímica, Córdoba

Vílchez C, Galván F, Vega JM (1991) Glycolate photoproduction by free and alginate-entrapped cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. Appl Microbiol Biotechnol 35:716-719

Westrin BA (1990) Diffusion in immobilized-cell gels. Appl Microbiol Biotechnol 34:189-190

Westrin BA, Axelsson A (1991) Diffusion in gels containing immobilized cells: a critical review. Biotechnol Bioeng 38:439-446

White JW (1975) Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. J Agric Food Chem 23:886-891

Wijffels RH, Tramper J (1989) Performance of growing *Nitrosomonas europaea* cells immobilized in K-carrageenan. Appl Microbiol Biotechnol 32:108-112

Wijffels RH, Schukking GC, Tramper J (1990) Characterization of a denitrifying bacterium immobilized in carrageenan. Appl Microbiol Biotechnol 34:399-403

Wijffels RH, de Gooijer CD, Kortekaas S, Tramper J (1991) Growth and substrate consumption of *Nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan: part 2. Model evaluation. Biotechnol Bioeng 38:232-240

Windholz M, Budavari S, Stroumstos LY, Fertig MN (eds.) (1976) The Merck Index, 9th ed. p 4338. Merck & CO, Rahway

Zumft WG, Cárdenas J (1979) The inorganic biochemistry of nitrogen bioenergetic processes. *Naturwissenschaften* 66:81-88

Zumft WG, Vega JM (1979) Reduction of nitrite to nitrous oxide by a cytoplasmic membrane fraction from the marine denitrifier *Pseudomonas perfectomarinus*. *Biochim Biophys Acta* 548:484-499

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Junta de Tesis Doctorales de la Universidad de Sevilla
en virtud de la Comisión de Tesis Doctorales de

D. CARLOS VILCHEZ LOBATO
Tesis: BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS: FOTOPRODUCCION Y
ELIMINACION DE N-CONTAMINANTES POR CHLOMYDOMONAS
REINHARDTII

APTO "CUM LAUDE"

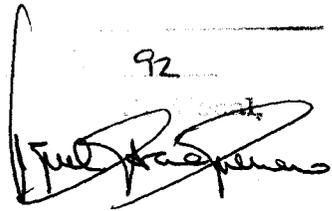
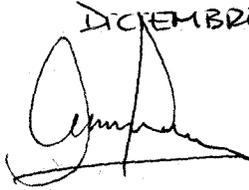
POR UNANIMIDAD

4

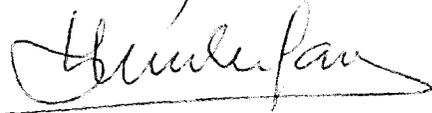
DICIEMBRE

92

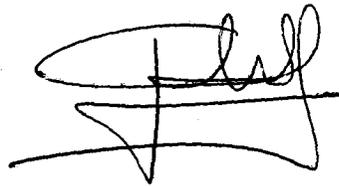
El Vocal



El Presidente



El Doctorado



500406489

FBI E TD-243

406489