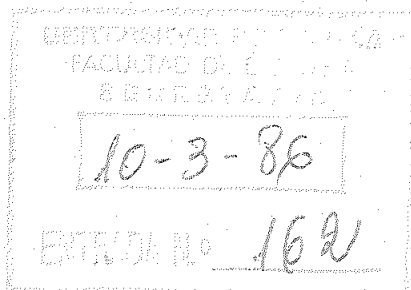
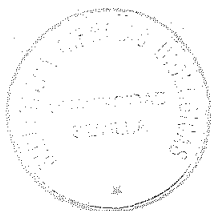


R. 4493



TB
633

CULTIVO DE MICROALGAS FIJADORAS DE NITROGENO ATMOSFERICO

Trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas pre
sentado por el Licenciado AGUSTIN I. GONZALEZ FONTES DE ALBORNOZ

Sevilla, Marzo de 1986

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Prof. Miguel García Guerrero
Catedrático de Bioquímica

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

PONENTE

Prof. Manuel Losada Villasante

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de los Profesores Miguel García Guerrero y Manuel Losada Villasante, a quienes expreso mi más sincero agradecimiento por haberme iniciado en el cultivo de las cianobacterias y por la dirección de estas investigaciones.

Asimismo agradezco profundamente a la Dra. M.^a Angeles Vargas y a D. José Moreno la ayuda humana, científica y técnica que me han prestado en todo momento y que ha sido fundamental en la realización de esta tesis.

Igualmente quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Joaquín Rivas por la catalogación de los artículos relativos a la Biotecnología de microalgas, que ha facilitado significativamente la labor bibliográfica, así como a D.^a Herminia Rodríguez, por compartir su interés en los temas objeto de esta tesis. Al Dr. Manuel Hervás y a todos los demás miembros de este Departamento con los que he convivido durante estos años les agradezco su compañerismo, y a mi hermana Lola su esmerada y desinteresada labor al mecanografiar este trabajo. A D.^a Antonia Friend, a D.^a M.^a José Pérez de León y a D. Joaquín Lospitao les estoy muy agradecido tanto por su ayuda técnica como por la amabilidad con que me han distinguido.

Por último, quiero manifestar mi gratitud a las siguientes instituciones y entidades por su apoyo económico y material: Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Dragados y Construcciones, S.A. y Fundación Ramón Areces.

A mis padres

A Carmen

INDICE

Abreviaturas y símbolos	1
I. <u>INTRODUCCION</u>	2
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	19
A. CULTIVO DE MICROALGAS	20
A.1. Material biológico	20
A.2. Cultivo en cámara	20
A.3. Cultivo al aire libre	24
A.4. Composición de los medios de cultivos. Características generales	30
A.5. Mantenimiento de las estirpes	36
B. ENSAYO DE ACTIVIDADES	38
B.1. Ensayo de la actividad nitrogenasa	38
B.2. Determinación polarográfica del desprendimiento de oxígeno	38
C. METODOS Y DETERMINACIONES ANALITICAS	40
C.1. Determinación de peso seco	40
C.2. Determinación de clorofila	40
C.3. Análisis elemental de la biomasa: contenido en C, N, H y O	40
C.4. Determinación de cenizas	41
C.5. Preparación para la determinación secuencial de componentes moleculares	42
C.6. Determinación de proteína	43
C.7. Determinación de carbohidratos	44
C.8. Determinación de lípidos	44
C.9. Determinación de ARN	45
C.10. Determinación de ADN	46
C.11. Determinación de ficobiliproteínas	47
C.12. Determinación de carotenoides	48

C.13.	Determinación de etileno	48
C.14.	Determinación de fructosa en el medio de cultivo..	49
C.15.	Determinación del carbono inorgánico en el medio de cultivo	49
C.16.	Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación	49
C.17.	Determinación de la productividad en cultivos semi continuos	50
C.18.	Determinación del grado de reducción de la biomasa	50
C.19.	Estimación del calor de combustión de la biomasa..	51
C.20.	Medidas del pH	52
C.21.	Medidas de irradiancia	52
C.22.	Medidas gravimétricas	52
C.23.	Medidas espectrofotométricas	52
C.24.	Medidas de temperaturas ambientales y de las suspensiones celulares al aire libre	53
C.25.	Recolección de células en los cultivos al aire libre	53
D.	<u>REACTIVOS</u>	55
III.	<u>RESULTADOS</u>	56
A.	<u>CRECIMIENTO Y COMPOSICION DE DISTINTAS ESTIRPES DE CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS FIJADORAS DE NITROGENO ATMOSFERICO</u>	57
A.1.	CINETICA DEL CRECIMIENTO	57
A.2.	COMPOSICION MOLECULAR DE LAS CELULAS	60
A.3.	PRODUCTIVIDAD	62
A.4.	EVOLUCION DE LA COMPOSICION ELEMENTAL Y MOLECULAR DE LAS CELULAS A LO LARGO DEL CRECIMIENTO	62
B.	<u>EFFECTO DE DISTINTOS FACTORES SOBRE EL CRECIMIENTO, ACTIVIDAD FIJADORA DE NITROGENO Y COMPOSICION DE Anabaena variabilis</u>	68
B.1.	EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICA Y DE FIJACION DE N ₂ A LO LARGO DEL CRECIMIENTO	68
B.2.	EFFECTO DE LA NUTRICION CARBONADA	71

B.2.1.	Efecto de diferentes fuentes de carbono	71
B.2.2.	Relación entre el contenido en carbohidratos y la actividad fijadora de N_2	74
B.2.3.	Composición molecular de células cultivadas con aire o aire enriquecido en CO_2	77
B.3.	EFFECTO DE LA ILUMINACION	79
B.3.1.	Efecto de la irradiancia sobre el crecimiento y la actividad fijadora de N_2	79
B.3.2.	Pérdida de la actividad fijadora de N_2 en la oscuridad y efecto de la fuente de carbono	82
B.4.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA	85
B.4.1.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la actividad fijadora de N_2	85
B.4.2.	Efecto de la temperatura sobre la composición elemental y molecular de las células	88
B.5.	EFFECTO DEL pH	92
B.5.1.	Efecto del pH del medio sobre el crecimiento	92
B.5.2.	Efecto de los ciclos luz-oscuridad sobre el pH del medio	92
B.5.3.	Efecto del pH sobre el contenido en clorofila y nitrógeno de las células	94
C.	<u>CULTIVO DE Anabaena variabilis A LA INTEMPERIE CON AGITACION MEDIANTE AIREACION FORZADA</u>	99
C.1.	CRECIMIENTO EN CULTIVOS ESTANCOS Y SEMICONTINUOS..	99
C.2.	EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD DE FIJACION DE NITROGENO EN CULTIVOS ESTANCOS Y SEMICONTINUOS	101
C.3.	EFFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA PRODUCTIVIDAD	105
C.4.	EFFECTO DE LA AIREACION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD	105
C.5.	EFFECTO DEL SUPLEMENTO DE ANHIDRIDO CARBONICO SOBRE LA COMPOSICION ELEMENTAL Y MOLECULAR DE LAS CELULAS	109
C.6.	EFFECTO DE LA DENSIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD	115
C.7.	EFFECTO DE LA PROFUNDIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD	115
C.8.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD ..	118

C.8.1.	Temperatura Óptima	118
C.8.2.	Crecimiento a temperatura ambiente	118
C.9.	EFFECTO DEL pH DEL MEDIO SOBRE LA PRODUCTIVIDAD..	122
C.10.	VARIACION DEL pH DEL MEDIO CON LA RADIACION SOLAR	122
C.11.	EFFECTO DE OTROS FACTORES SOBRE LA PRODUCTIVIDAD	127
C.11.1.	Efecto de la interrupción de la aireación durante la noche	127
C.11.2.	Efecto de la densidad inicial del cultivo	129
C.11.3.	Efecto del horario de recogida de las células ..	132
C.12.	EFFECTO DE LA IRRADIANCIA, PROFUNDIDAD Y DENSIDAD CELULAR SOBRE EL CONTENIDO EN CLOROFILA Y NITROGENO DE LAS CELULAS	132
C.13.	PRODUCTIVIDAD DE CULTIVOS SEMICONTINUOS EN ESTANQUES DE 10 m ²	139
D.	<u>CULTIVO DE Anabaena variabilis A LA INTEMPERIE CON AGITACION MEDIANTE PALETAS</u>	141
D.1.	PRODUCTIVIDAD EN CULTIVO SEMICONTINUO.EFFECTO DEL CO ₂	141
D.2.	COMPARACION ENTRE LOS SISTEMAS DE AGITACION CON PALETAS Y DE AIREACION FORZADA	141
E.	<u>CULTIVO DE Anabaena ATCC 33047 A LA INTEMPERIE</u>	146
E.1.	EFFECTO DE LA DENSIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD.....	146
E.2.	EFFECTO DE LA PROFUNDIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD	146
E.3.	CULTIVO EN ESTANQUE DE 10 m ² CON AGITACION MEDIANTE PALETAS.....	146
IV.	<u>DISCUSION</u>	150
V.	<u>CONCLUSIONES</u>	164
VI.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	169

Abreviaturas y símbolos

A	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	colección americana de cultivo tipo
ATP	adenosín-5'-trifosfato
chl	clorofila
d	densidad
FAO	Organización para la alimentación y agricultura
g	aceleración de la gravedad
GMT	tiempo medio de Greenwich
h	constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-27}$ ergio segundo)
ONU	Organización de Naciones Unidas
p/p	peso/peso
p/v	peso/volumen
PCC	colección de cultivos del Instituto Pasteur
PS I	fotosistema I
PS II	fotosistema II
rpm	revoluciones por minuto
v/v	volumen/volumen
μ	velocidad específica de crecimiento
ν	frecuencia de la radiación electromagnética

I. INTRODUCCION

Uno de los problemas más graves con que se enfrenta actualmente la humanidad es el de suministrar a toda la población las suficientes calorías, proteínas, vitaminas y minerales, de manera que tenga cubiertos sus requerimientos nutritivos. En efecto, el aumento exponencial de la población mundial, unido al deseo generalizado de una mejor calidad de vida, ha determinado una extraordinaria demanda tanto de energía como de alimentos. De los casi 5000 millones de personas que habitan la Tierra, se estima que dos tercios del total consumen esencialmente una dieta de tipo vegetariano (Pimentel y Pimentel, 1979), pudiéndose afirmar que, en los países del Tercer Mundo, 500 millones de seres humanos, es decir, casi la décima parte de la población mundial, pasan hambre o están seriamente malnutridos, lo que causa penosas deficiencias y subnormalidades, especialmente en la población infantil (ONU, 1974). La dieta media de proteína se estima en unos 50 g por persona y día, previéndose para el año 2000 una población de al menos 6000 millones de habitantes. Para poder suministrar este aporte proteico se necesita, como mínimo, incrementar la producción de leguminosas en un 66% y la de cereales en un 75% (Pimentel et al., 1975). De no ser así se estima un déficit anual de 40 millones de toneladas de proteínas, que, como es lógico, gravitará fundamentalmente sobre los países subdesarrollados.

Esta carencia de alimentos, fundamentalmente proteicos, fue motivo de un informe del Protein Advisory Committee de la ONU en el que se concluyó (ONU, 1967) que los productos agrícolas convencionales deberían suplementarse con alimentos ricos en proteínas de nuevo origen, tales como harinas de semillas oleaginosas y de pescado, y proteínas de microorganismos. Entre los primeros intentos de búsqueda de nuevas fuentes de proteína destacan los proyectos presentados en la 1ª Conferencia Internacional sobre Single-Cell Protein, celebrada en el Massachusetts Institute of Technology (Mateles y Tannenbaum, 1968) para discutir el uso directo de los microorganismos como fuente de alimentación. El término "single-cell protein" (SCP) se refiere a las células desecadas de microorganismos, tales como algas, bacterias y hongos, que pueden cultivarse a gran escala para su utilización como fuente de proteína en alimentación humana o del ganado. Aunque la principal finalidad del cultivo de estos microorganismos sea obtener proteína, también se utilizan para la extracción de carbohidratos, lípidos, vitaminas y ácidos.

dos nucleicos (Litchfield, 1983).

En la búsqueda de otras fuentes alimentarias que ayuden a soportar el incesante consumo que demanda una civilización desarrollada, parte de los esfuerzos se han dirigido al aprovechamiento de la luz solar mediante sistemas biológicos alternativos que permitan la síntesis de alimentos de alto contenido proteico, así como de compuestos químicos de interés y, en general, de biomasa. Entre estos sistemas conversores de energía solar merece destacarse por su sencillez y eficacia el de las microalgas. Estos organismos presentan gran variedad de formas y tamaños y prácticamente habitan en todos los ecosistemas acuáticos, ya sean de agua dulce, marina o salobre, e incluso pueden encontrarse en suelos húmedos, rocas, cortezas de árboles, plantas, etc. Al igual que las plantas superiores, contienen clorofila a y otros tipos de pigmentos, cuya calidad y cantidad varía según la especie, mediante los cuales son capaces de transformar, a expensas de la luz solar, compuestos inorgánicos de bajo contenido energético en materia orgánica a través del proceso de la fotosíntesis.

Las microalgas presentan a priori una serie de ventajas frente a las plantas superiores empleadas en la agricultura convencional. Desde un punto de vista estructural y fisiológico, el carácter primitivo y sencillo de su organización celular permite que todo el organismo sea aprovechable, ya que en contraste con las plantas superiores no tienen que gastar energía para diferenciar sistemas con fines mecánicos, nutritivos, de transporte, etc. (raíz, tallo, hojas). La mayoría de los alimentos vegetales que el hombre consume corresponden sólo a una determinada porción del conjunto de la planta, tales como frutos, semillas y raíces. Estas partes acumulan proteínas, lípidos y carbohidratos, pero la suma de todas ellas apenas supone la mitad del peso seco total de la planta. Por otro lado, las microalgas, a diferencia también de las plantas superiores, presentan tiempos de generación muy cortos, pudiendo cultivarse, en principio, a lo largo de todo el año, lo que se traduce en una alta productividad de biomasa, así como en el aprovechamiento exhaustivo de la zona cultivada.

Entre las microalgas existe una gran variedad ecológica y fisiológica que hace factible su cultivo en medios muy diver

sos, bien sean aguas salobres o residuales, pudiendo también emplearse para la explotación de zonas áridas, tales como desiertos, que no son útiles para la agricultura convencional (Richmond y Preiss, 1980; Aaronson y Dubinsky, 1982).

Las microalgas presentan unos valores de eficiencia de conversión de energía fotosintética entre el 0,8 y el 4,3% de la radiación total incidente (Wassink et al., 1953; Dubinsky et al., 1978; Hall, 1980). La mayoría de las plantas sólo utilizan entre el 0,1 y el 0,5% de la energía solar incidente, e, incluso, en condiciones favorables de luz, temperatura y aporte de nutrientes, no pueden alcanzar producciones elevadas de biomasa por estar limitada la disponibilidad de CO_2 . Para solventar este problema de la agricultura convencional se ha sugerido construir grandes invernaderos de plástico hinchable cubriendo extensiones de terreno de 1 km^2 para cultivar alfalfa con un elevado nivel de CO_2 (Bassham, 1977a,b; Bassham, 1980). El suplemento de CO_2 a los cultivos de algas es, desde un punto de vista técnico, relativamente más simple, puesto que con la mera adición de anhídrido carbónico y bicarbonato sódico al medio de cultivo puede aumentarse la concentración de carbono inorgánico, que sirve además de amortiguador fisiológico del pH. Esta manipulación química se ve facilitada por el carácter hidráulico de los cultivos de algas.

Por otro lado, debido a la sencillez propia de los microorganismos y a su corto tiempo de generación, las microalgas pueden manipularse genética y bioquímicamente, con el fin de mejorar ciertas propiedades o de producir determinados compuestos de interés, con más facilidad que las plantas superiores.

Por último, las células de las microalgas contienen, en peso seco, más del 50% de proteínas, porcentaje superior al encontrado en las partes comestibles de cualquier planta, siendo además su calidad muy adecuada para la nutrición, tanto animal como humana, por presentar en proporción equilibrada todos los aminoácidos esenciales recomendados por la F.A.O. (Aaronson et al., 1980). No obstante, y según el tipo de microalga, pueden detectarse ciertas deficiencias en aminoácidos azufrados (Waslien, 1975) y en lisina (Ciferri, 1983; Becker y Venkataraman, 1984), en comparación con los patrones proteicos de alimentación.

El interés por el cultivo en masa de las microalgas comenzó en los años 40, tras la aparición de una serie de trabajos que habrían de servir de base para el nacimiento y desarrollo de la Algicultura. La primera propuesta para la utilización de las microalgas como fuente de compuestos químicos y alimentarios fue realizada en Alemania, durante la II Guerra Mundial, por Harder y Von Witsch (1942a,b), que investigaron la diatomea Nitzschia palea y la clorofita Chlorella pyrenoidosa para la potencial producción de lípidos. Los trabajos básicos de aquella época fueron, por un lado, el desarrollo de la técnica del cultivo continuo y semi-continuo de fitoplancton en masa (Myers y Clark, 1944; Ketchum y Redfield, 1949; Ketchum et al., 1949) y, por otro lado, la modificación de las condiciones de cultivo de Chlorella a fin de variar su composición en proteínas y lípidos con vistas a su utilización como alimento rico en proteínas (Spoehr y Milner, 1949; Spoehr, 1951). En 1948 Cook inició en el Stanford Research Institute un estudio técnico y económico de la potencial aplicación comercial del cultivo en masa de Chlorella y mostró que su producción en cultivo continuo era posible (Cook, 1951). Sin embargo, los resultados alcanzados no fueron lo suficientemente prometedores, y su trabajo concluyó en 1950. En 1951 la Carnegie Institution of Washington, que se mostraba interesada por este campo de investigación, financió la construcción por la Arthur D. Little Inc. de una planta piloto al aire libre en Cambridge, Massachusetts. En esta planta, construida en la terraza de un edificio, se llevaron a cabo una serie de experimentos, siendo sus resultados motivo de un informe de amplia repercusión (Burlew, 1953). La Carnegie Institution fue impulsora del cultivo en masa de algas y subvencionó también investigaciones a nivel básico para el estudio de los parámetros físicoquímicos que influyen en el crecimiento (Myers, 1953) y la nutrición de las microalgas (Krauss, 1953).

La estancia en Stanford del profesor H. Tamiya como investigador invitado en el Departamento de Biología Vegetal de la Carnegie Institution promovió la realización de un proyecto internacional del cultivo de microalgas en el Tokugawa Institute for Biological Research de Tokio bajo la dirección del propio profesor Tamiya. Las cosechas obtenidas del cultivo de Chlorella se vendieron para colorear productos alimenticios y como alimentos ricos en sustancias nutritivas muy apropiadas para la prevención y el trata

miento de ciertas deficiencias y desequilibrios metabólicos (Tamiya, 1957). Así, aprovechando el tradicional consumo de algas macroscópicas en el lejano Oriente, fue Japón el primer país en producir y comercializar una especie de microalgas. Pronto el tema de las microalgas adquirió gran auge en Japón, prestándosele atención especial a la optimización de la producción a través del diseño adecuado de los estanques y de los sistemas de agitación.

En Alemania Federal, tras el paréntesis de la II Guerra Mundial, se continuaron las investigaciones para el cultivo de Chlorella en estanques al aire libre y en invernaderos (Gummert et al., 1953). Estas investigaciones que se iniciaron en el Kohlens toffbiologische Forschungsstation de Essen-Bredeney y posteriormente se desarrollaron en Dortmund por el grupo de Soeder, tenía como finalidad emplear las enormes cantidades de anhídrido carbónico generado como desecho por las industrias de la cuenca del Ruhr para suplementar en carbono los cultivos de Chlorella y Scenedesmus.

De acuerdo con Goldman (1979a), el gran interés que despertó el cultivo masivo de microalgas en Japón en la década de los 50, no tuvo tanto eco en los Estados Unidos de América por varias razones. Una fue la verificación de que la producción de microalgas como alimento comercial requería grandes sistemas de cultivo dotados con unos diseños relativamente sofisticados y caros. Por otro lado, la separación y concentración de las células de Chlorella resultaba bastante difícil; además, la gruesa pared celular celulósica dificultaba la asimilación del producto al ser utilizado como alimento para el ganado o para el hombre. Por último, los Estados Unidos tuvieron en esa época extraordinarias cosechas agrícolas, y ello restó interés a la búsqueda de nuevas fuentes alimentarias.

No obstante, el grupo de Oswald, en Berkeley (California), dio nuevo auge, a mediados de los años 50, al cultivo en gran escala de microalgas, al proyectar el empleo de aguas residuales urbanas como medio para el cultivo de algas verdes (clorofitas) con la doble finalidad de depurar el agua y de obtener biomasa rica en proteína (Oswald et al., 1953). Estos sistemas, denominados de oxidación rápida, utilizan cultivos mixtos de algas y bacterias en estanques en los que las algas producen O_2 que es empleado por las

bacterias para oxidar y digerir la materia orgánica. A su vez, la acción bacteriana genera CO_2 que es asimilado fotosintéticamente por las algas para su crecimiento, cerrándose así el ciclo (Figura 1 A). Como resultado final se logra la depuración del agua y la producción de una biomasa de algas y bacterias (Oswald et al., 1957; Oswald y Golueke, 1968). La depuración de aguas residuales urbanas según el modelo de Oswald ha sido desarrollada en Israel por el grupo de Shelef, que ha investigado la optimización de los rendimientos alcanzados mediante la variación de parámetros tales como el tiempo de retención del agua en el estanque de depuración, temperatura, profundidad y área del estanque (Shelef et al., 1973; Shelef et al., 1980; Azov et al., 1980).

Si bien el método de Oswald para el reciclaje de aguas residuales se realizó con algas de agua dulce hasta comienzos de los años 70, la posibilidad de depurar aguas residuales utilizando conjuntamente agua de mar determinó un nuevo avance en este campo. El sistema consistió en cultivar fitoplancton marino, fundamentalmente diatomeas, en una mezcla de aguas residuales y agua de mar. La biomasa producida servía directamente para alimentar crustáceos en vez de retirarse del estanque (Ryther et al., 1972). De esta forma se lograba alargar la cadena trófica en un nuevo eslabón, lo que conllevaba dos ventajas económicas y técnicas: por un lado se evitaba tener que separar las algas del agua, y por otro se obtenía un producto de amplia aceptación comercial (Goldman et al., 1975; Ryther et al., 1975).

Para terminar esta breve perspectiva histórica merece especial atención la evolución del cultivo del alga verde-azulada (cianobacteria) Spirulina. El conocimiento del empleo de Spirulina como alimento data del siglo XVI, gracias a los relatos del conquistador y cronista español Bernal Díaz del Castillo (1492-1584) en su obra "Historia verdadera de la conquista de la Nueva España", publicada en 1568. En ella cuenta como los aztecas vendían en el mercado de Tenochtitlan, origen de la actual capital de México, "unos panecillos que hacen de una como lama que cogen de aquella gran laguna, que se cuaja y hacen panes de ello que tienen un sabor a manera de queso". También Fray Bernadino de Sahagún (1500-1590) en la "Historia general de las cosas de la Nueva España" relató: "Hay unas urronas que se crían sobre el agua que se lla

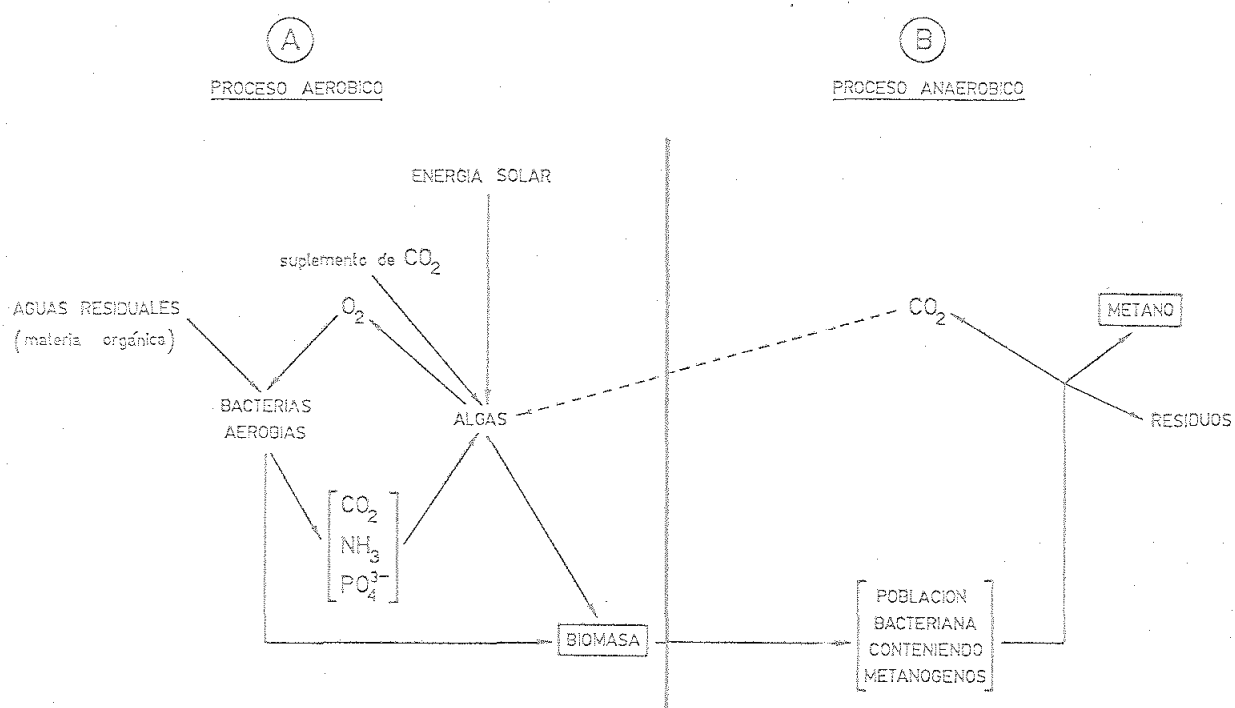


Figura 1. Diagrama del tratamiento combinado propuesto por Oswald y Benemann (1980) para la depuración de aguas residuales mediante un sistema mixto alga-bacteria (A) y producción de metano (B) a expensas de energía solar.

man tecuitate; son de color azul claro después de que está bien es peso y grueso; cógenlo, tiéndenlo en el suelo sobre ceniza y después se hacen unas tortas de ello, y tostadas las comen". Parecidos comentarios en relación con el empleo de Spirulina por los aztecas hizo en su obra "Historia de Méjico" el jesuita Francisco Javier de Clavijero (1731-1787): "Hacían también uso de una sustancia fangosa que nada en las aguas del lago, secándola al sol y con servándola para comerla a guisa de queso, al que se parecía mucho en el sabor. Dábanle el nombre de tecuitlatl, o sea, excremento de piedra". Estos tres relatos coincidentes disipan toda duda sobre la utilización de Spirulina como alimento en la civilización azteca. Con posterioridad a la conquista, el uso de Spirulina como alimento se extinguió en Méjico. Sin embargo, las investigaciones del algólogo francés Dangeard en 1940 y la expedición del botánico belga Leonard en 1964 han puesto de manifiesto que el consumo de esta microalga está extendido también entre el pueblo africano de los Kanembous que cosecha Spirulina platensis de la superficie del lago Chad. Tras secarla al sol confeccionan unas tortas llamadas dihé (Ciferri, 1983), y también la utilizan como ingrediente de unas salsas para aderezar la harina de mijo. Así, en dos civilizaciones distintas y separadas por el océano, se han descubierto independientemente las propiedades nutricionales de Spirulina.

El cultivo en masa de Spirulina con fines comerciales comienza en 1967, cuando la Dra. Clement, del Instituto Francés del Petróleo, entra en relaciones con la compañía Sosa Texcoco, S.A.. Esta compañía tiene en explotación en el lago Texcoco, situado en el valle de la ciudad de Méjico, un gigantesco evaporador solar en forma de espiral ("Caracol"), de 3,2 km de diámetro y 850 ha de superficie, para la concentración y extracción de sales de sodio, como carbonato y bicarbonato. En 1967 se construyó la primera planta industrial para la recolección de los cultivos de Spirulina maxima, que se desarrollan sobre una superficie de 20 ha en la parte más externa del Caracol. La biomasa se recoge por filtración y, después de su concentración y homogeneización, se somete a un proceso de esterilización y pulverización. Para aumentar la productividad y puesto que el alga no es fijadora de N_2 se añaden sales nitrogenadas y otros fertilizantes, así como CO_2 , a la zona de cultivo, con lo que se alcanzan valores medios anuales de $10 \text{ g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ (Clement et al., 1967; Durand-Chastell, 1980). Hoy día Spiru

lina es el alga más conocida comercialmente, y su explotación, aunque a menor escala que en Méjico, se lleva a cabo también en Taiwan, Tailandia, Japón, Israel, India y Estados Unidos (Vonshak et al., 1982; Becker y Venkataraman, 1984; Bedell, 1985; Ciferri y Tiboni, 1985).

Aunque la principal finalidad del cultivo de microalgas a gran escala radica en su utilidad como fuente de proteína, estos organismos sintetizan además una gran variedad de compuestos biológicos de interés en la industria química y farmacéutica, tales como pigmentos, lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. Así, por ejemplo, los cultivos de Spirulina, además de generar casi 30 toneladas de proteína bruta por ha y año, se emplean para obtener más de 50 productos químicos empleados en alimentación o farmacología (Santillan, 1982).

Las microalgas pueden de hecho servir de fuente para la síntesis de lípidos específicos, completando así las provenientes de plantas superiores, animales y petróleo. La demanda de lípidos para fines industriales podría así cubrirse parcialmente a partir de microalgas, haciendo uso de la facultad que presentan de alterar su metabolismo cuando se modifican las condiciones de cultivo en el sentido de producir gran cantidad de este tipo de compuestos (Aaronson et al., 1980). Por ejemplo, se ha observado en diferentes algas que, al aumentar la irradiancia, la salinidad o la temperatura, se incrementa el porcentaje de lípidos respecto al peso seco. Igual efecto se obtiene con el envejecimiento celular o con la carencia de fuente nitrogenada en el medio de cultivo (Dubinsky et al., 1978).

Otro producto de interés comercial al que se ha prestado atención es el glicerol, producido fotosintéticamente por representantes del género Dunaliella y por Asteromonas gracilis como respuesta de carácter osmorregulador a las altas concentraciones salinas existentes en un medio natural, llegando su concentración interna a alcanzar el 50% del peso seco cuando la concentración de NaCl en el medio de cultivo es de 2 M (Ben-Amotz et al., 1982).

Las microalgas pueden utilizarse también como fuente de pigmentos de amplio uso industrial, tales como clorofila, ca

rotenos, xantofilas y ficocianinas. Algunas xantofilas, como la luteína y la cantaxantina, se emplean en avicultura, con objeto de colorear la carne y la yema de los huevos (Benemann y Weissman, 1984). Cuando Dunaliella bardawil se cultiva a elevada irradiancia en un medio con alta concentración de sal puede contener β -caroteno en concentraciones de hasta el 8% de su peso seco, frente al 0,2-0,5% descrito para otras microalgas (Ben-Amotz y Avron, 1981). También las ficobiliproteínas, que son los principales pigmentos fotosintéticos accesorios en las cianobacterias (Myers y Kratz, 1955), han sido propuestos como pigmentos naturales con fines alimentarios y comerciales (Boussiba y Richmond, 1979; Benemann y Weissman, 1984).

En relación con los carbohidratos, las microalgas, concretamente diatomeas del fitoplancton marino, se han empleado como fuente de β -1,3 glucano (Myklestad, 1974; Myklestad, 1977), y el alga roja Porphyridium (Ramus, 1973) como fuente de galactanos sulfatados, polisacáridos parecidos a la carragenina.

La producción de combustibles es otra de las posibles aplicaciones del cultivo de microalgas. La enorme y creciente dependencia de la sociedad industrial moderna de los combustibles fósiles está conduciendo rápidamente al agotamiento de las reservas petrolíferas, habiéndose registrado desde 1973 un alza notable en el precio de los crudos. Esta situación ha encarecido también los costes de una gran variedad de productos directa o indirectamente derivados del petróleo. Frente a este problema, los cultivos de microalgas, cuya fuente de energía primaria es el Sol, no sólo podrían emplearse para la producción de biomasa sino para generar diversos combustibles o productos de interés industrial o agrícola que actualmente se sintetizan a partir del petróleo. A este respecto, se ha considerado (Figura 1 B) la producción de metano mediante digestión anaeróbica de la biomasa de algas y bacterias obtenida en los procesos de depuración de aguas residuales (Golueke et al., 1957; Golueke y Oswald, 1959; Oswald y Benemann, 1980), o de los cultivos de Spirulina maxima (Samson y LeDuy, 1982). También se ha sugerido la producción de hidrógeno a partir de algas verde-azuladas fijadoras de N_2 (Lambert y Smith, 1981; Ramachandram y Mitsui, 1984), habiéndose llevado a cabo experimentos a la luz solar durante 25 días con Anabaena cylindrica en atmósfera anoxigénica (N_2 , CO_2 y

argon) (Hallenbeck et al., 1978). Sin embargo, en el estado actual de conocimientos, esta aplicación no es viable económicamente

Considerable interés presenta también la explotación de Botryococcus braunii para la producción de combustibles. En condiciones naturales este alga contiene hasta un 76% de hidrocarburos insaturados del tipo $C_{34}H_{58}$ (Maxwell et al., 1968; Douglas et al., 1969), estimándose posible la producción de 60 toneladas de hidrocarburos por ha y año (Largeau et al., 1980).

Finalmente, se ha contemplado la producción de amoníaco por microorganismos fijadores de N_2 mediante la alteración bioquímica o genética de su metabolismo. La inhibición por L-metionina D,L-sulfoximina de la glutamina sintetasa, enzima responsable de la incorporación del amonio a esqueletos carbonados, provoca la excreción del amoníaco al medio de cultivo (Stewart y Rowell, 1975; Guerrero et al., 1982).

Interesa resaltar aquí la importancia de los fertilizantes nitrogenados en la mejora de la producción agrícola. El nitrógeno es nutriente primordial para el crecimiento de las plantas y para la producción de proteínas vegetales, actuando de hecho como factor limitante en muchas regiones del mundo, esencialmente en los países en vías de desarrollo. La aplicación como abono se ha visto también seriamente afectada en los países desarrollados, debido a la significativa subida de precio que han experimentado los fertilizantes químicos derivados del petróleo a raíz de la crisis de 1973; actualmente, la síntesis de fertilizantes nitrogenados supone hasta el 50% de la energía empleada en agricultura. Estas razones económicas han motivado la búsqueda de nuevos fertilizantes nitrogenados procedentes de la fijación biológica del nitrógeno y del reciclaje de materiales nitrogenados industriales, agrícolas y domésticos.

La fijación biológica del nitrógeno es una capacidad exclusiva de ciertos tipos de organismos procarióticos -bacterias y cianobacterias- que, en vida libre o en simbiosis, constituyen la fuente de casi todo el nitrógeno fijado en la biosfera, si se excluye el proceso químico de Haber-Bosch. La fijación biológica

del nitrógeno es un proceso que necesita un sustancial aporte energético para llevarse a cabo. Para este fin, las bacterias fijadoras simbióticas utilizan carbohidratos u otras formas de carbono reducido generado fotosintéticamente, que pasan desde las hojas a los nódulos radiculares. La fijación simbiótica del nitrógeno está siendo objeto de intensos estudios desde un punto de vista genético y bioquímico, y durante los próximos años se esperan notables avances en su aplicación. Por otra parte, algunas algas verde-azuladas (cianobacterias) pueden utilizar, a expensas de la energía y poder reductor suministrados en último término por la energía solar, el nitrógeno molecular presente en el aire para la síntesis de proteína y demás compuestos nitrogenados de su material celular. Esta singular característica hace a estos microorganismos, al menos a priori, unos candidatos muy idóneos para la producción de fertilizantes y de "single-cell protein", sobre todo teniendo en cuenta que presentan requerimientos mínimos para su crecimiento, a saber, luz solar, aire, agua y algunas sales minerales. A esta ventaja económica hay que añadirle la de crecer en un medio de cultivo restrictivo para otros posibles organismos contaminantes por carecer el mismo de nitrógeno combinado (Guerrero y Losada, 1983).

De hecho, las algas verde-azuladas son los únicos organismos que combinan las capacidades metabólicas de producción fotosintética de oxígeno y fijación de nitrógeno. Esta dualidad de funciones es muy interesante ya que la enzima nitrogenasa, responsable de la última reacción, es muy lábil frente al oxígeno. Las algas verde-azuladas han desarrollado diferentes estrategias para eludir este problema. Una de las más efectivas, en términos de eficacia metabólica y preponderancia ecológica, es la que presentan las cianobacterias filamentosas con heterocistos. Estas algas poseen a lo largo del filamento dos tipos de células diferenciadas morfológica y funcionalmente. Las más numerosas son las células vegetativas, a partir de las cuales desarrollan irreversiblemente una célula especializada con gruesa pared, el heterocisto, para la fijación de N_2 . Durante el proceso de diferenciación de los heterocistos, el complejo encargado de la fotólisis del agua, así como las enzimas fundamentales del ciclo de Calvin, ribulosa biscofosfato carboxilasa y fosforribulosaquinasa, se pierden. Así, los heterocistos se hacen totalmente dependientes de las células vegetativas para el abastecimiento de compuestos orgánicos carbonados.

Mientras que aún no se ha identificado inequívocamente la naturaleza concreta de las moléculas importadas (Haury y Spiller, 1981; Juttner, 1983), parece claro que su oxidación en el heterocisto es la principal fuente de equivalentes de reducción para la nitrogenasa en condiciones autotróficas (Stewart, 1980; Bothe, 1982; Stewart et al., 1985). Según parece, los electrones procedentes de la oxidación de los carbohidratos son canalizados vía NAD(P)H-oxidasa por la cadena fotosintética de transporte de electrones hacia el PS I, desde donde vía ferredoxina, se donan a la nitrogenasa (Houchins y Hind, 1982; Schrautemeier et al., 1984 y 1985). Por tanto, la fijación de N_2 en los heterocistos a la luz se encuentra supeditada a la fijación fotosintética de CO_2 en la célula vegetativa, para recibir indirectamente electrones procedentes de la fotooxidación del agua (Fay, 1976; Ohmori, 1984). Las algas verde-azuladas filamentosas con heterocistos pueden también fijar N_2 en la oscuridad, si existen reservas adecuadas de carbohidratos o se encuentra presente en el medio una fuente de carbono orgánico metabolizable, como puede ser la fructosa (Wolk y Shaffer, 1976; Stewart et al., 1982). En tales casos, el poder asimilatorio almacenado en los carbohidratos sintetizados durante el periodo luminoso, o el tomado del medio, constituye la fuente tanto de energía como de poder reductor para la fijación de N_2 . Así, este ingenioso sistema heterocisto-célula vegetativa puede producir amonio y oxígeno simultáneamente, a partir de agua y aire, con el soporte energético de la luz solar (Wolk, 1982).

El interés por el cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno con fines prácticos data de los trabajos de Watanabe en los años 50 con el alga Tolypothrix tenuis. Cultivándola en condiciones de laboratorio y en ausencia de nitrógeno combinado, este autor consiguió una productividad de $4 \text{ g (peso seco) m}^{-2} 12 \text{ h}^{-1}$ y sugirió la posibilidad de usar las cianobacterias fijadoras de nitrógeno como fertilizante natural (Watanabe et al., 1951; Tamiya, 1957). Watanabe comenzó a evaluar la incidencia de estos microorganismos sobre las cosechas de arroz mediante experimentos llevados a cabo desde 1951 en once campos de cultivo de diversas zonas del Japón, concluyendo que la adición de Tolypothrix a los campos de arroz producía incrementos de hasta un 20% en las cosechas (Tamiya, 1957). Watanabe empleó para el cultivo en masa de Tolypothrix, y su posterior distribución en los arrozales, un medio de cultivo que

contenía nitrato potásico, lo que, probablemente, debía mermar, al menos transitoriamente, su capacidad de fijación de N_2 . Con este medio, las productividades alcanzadas en estanques de 5 m^2 de superficie al aire libre fueron de $6,4 \text{ g (peso seco) m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ (Watanabe et al., 1959).

Además de esta aplicación como fertilizante, las cianobacterias fijadoras de nitrógeno son, como las algas verdes y otras cianobacterias no fijadoras, microorganismos muy útiles para la producción de biomasa rica en proteína, poseyendo, por lo demás, una amplia gama de pigmentos (clorofila, carotenoides, ficocianinas y ficoeritrinas) que las hacen especialmente atractivas. De hecho, algas verde-azuladas fijadoras de nitrógeno, como Nostoc pruniforme y Nostoc sphaericum, que se desarrollan en los lagos peruanos situados en los altos Andes, sirven de alimento (cushuro) durante parte del año a la población que habita aquellas zonas (Castillo et al., 1980). Aunque algunos autores han preconizado el cultivo de cianobacterias fijadoras de N_2 (Watanabe et al., 1951; Benemann, 1979; Ramos et al., 1984), lo cierto es que todavía no se han emprendido, ni a gran escala ni a nivel de planta piloto, trabajos experimentales de producción de biomasa con estos microorganismos, habiéndose preferido investigar y desarrollar los cultivos clásicos de Chlorella y Spirulina, a fin de potenciar los conocimientos e infraestructura ya adquiridos con estos microorganismos no fijadores (Tabla I).

A mediados de 1981 se emprendió en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y CSIC de Sevilla un proyecto de investigación con fines aplicados para la producción de biomasa rica en proteína mediante el cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Este proyecto persigue la producción de estos microorganismos para su empleo como fertilizante agrícola y fuente de proteína microbiana. Aunque el propósito final de estos estudios es de carácter práctico, los puntos de vista y el enfoque de las investigaciones son esencialmente científicos. En resumen, se pretende desarrollar una investigación básica cuyos resultados tengan aplicación en el campo de la Algicultura.

Estas investigaciones se vieron notablemente potenciadas por las instalaciones aportadas por la empresa Dragados y

TABLA I

PROGRAMAS MUNDIALES PARA LA PRODUCCION DE MICROALGAS A LA INTemperie

Lugar	Microorganismo	Area de cultivo (m ²)	Productividad (g(p.s.)m ⁻² día ⁻¹)	Duración (días)	Referencias
Cambridge (EEUU)	<u>Chlorella</u>	56	2	52	Burlew (1953)
Essen (RFA)	<u>Chlorella</u>	6	4	30	Gummert <u>et al.</u> (1953)
Tokio (Japón)	<u>Chlorella</u>	15	3,5	10	Mituya <u>et al.</u> (1953)
Tokio (Japón)	<u>Chlorella</u>	13,8	16	27	Morimura <u>et al.</u> (1955)
Tokio (Japón)	<u>Chlorella-Scenedesmus</u>	147,8	8,6	365	Kanazawa <u>et al.</u> (1958)
Jerusalén (Israel)	<u>Chlorella</u>	4	12	35	Mayer <u>et al.</u> (1964)
Trebon (Checosl.)	<u>Scenedesmus</u>	900	12	89	Vendlova (1969)
Jerusalén (Israel)	<u>Chlorella</u>	300	27	30	Shelef <u>et al.</u> (1973)
Dortmund (RFA)	<u>Scenedesmus</u>	320	10	-	Soeder (1976)
Bangkok (Tailandia)	<u>Scenedesmus</u>	609	15	-	Soeder (1976)
Taiwan	<u>Chlorella</u>	16200	22	365	Tsukada <u>et al.</u> (1977)
Haifa (Israel)	<u>Clorofitas</u>	270	15	365	Shelef <u>et al.</u> (1978)
Taiwan	<u>Chlorella</u>	100000	20,8	365	Soong (1980)
Texcoco (Méjico)	<u>Spirulina</u>	200000	10	365	Durand-Chastell (1980)
Negev (Israel)	<u>Spirulina</u>	100	15-16	300	Vonshak <u>et al.</u> (1982)
Mysore (India)	<u>Scenedesmus</u>	55	15-20	12-20	Becker (1984)
Nevada (EEUU)	<u>Spirulina</u>	55	13,7	300	Bedell (1985)
Taiwan	<u>Spirulina</u>	66000	5,6	365	Ciferri y Tiboni (1985)
Calipatria (EEUU)	<u>Spirulina</u>	50000	7,1	365	Ciferri y Tiboni (1985)
Bangkok (Tailandia)	<u>Spirulina</u>	18000	12,2	365	Ciferri y Tiboni (1985)
Miyako (Japón)	<u>Spirulina</u>	13500	5,1	365	Ciferri y Tiboni (1985)
Ein-Yahav (Israel)	<u>Spirulina</u>	5500	10	365	Ciferri y Tiboni (1985)

Construcciones S.A., que en el verano de 1983 construyó una planta piloto para el cultivo en masa de microalgas en la terraza de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla. Las investigaciones desarrolladas en esta planta persiguen conocer más profundamente los factores que inciden en la productividad y calidad de la biomasa a lo largo de todo el proceso de producción, desde la selección de estirpes hasta su cultivo, recolección, secado y procesamiento, como paso previo para la construcción al aire libre de estanques de cultivo de microalgas a gran escala, lo que puede ser ejemplo eficaz de una atractiva faceta biológica de la combinación entre ciencia y tecnología.

Resultado de estas investigaciones es el presente trabajo, parte del cual ha sido ya objeto de comunicaciones a varios congresos (Fontes et al., 1981; Fontes et al., 1982; Fontes, 1983; Fontes et al., 1983; Vargas et al., 1984; Fontes et al., 1985; Vargas et al., 1985).

II. MATERIALES Y METODOS

II.A. CULTIVO DE MICROALGAS

II.A.1. Material biológico

Los microorganismos utilizados en este trabajo han sido Anabaena variabilis ATCC 29413 y Anabaena ATCC 33047, procedentes de la colección americana de cultivos tipo (American type Culture Collection) de Rockville; Anabaena PCC 7119, procedente del laboratorio del Prof. Daniel I. Arnon, de la Universidad de Berkeley; Nostoc PCC 6719 y Fischerella PCC 7520, procedentes de la colección de cultivos del Instituto Pasteur de Paris; y Nostoc paludosum, aislada de la albufera de Valencia y cedida por la Dra. Vicenta Vidal, de la E.T.S. de Ingenieros Agrónomos de Valencia. Las seis cianobacterias ensayadas son estirpes filamentosas con heterocistos fijadoras de nitrógeno atmosférico. La mayoría de los experimentos descritos se han llevado a cabo con Anabaena variabilis (Figura 2) y Anabaena ATCC 33047 (Figura 3).

II.A.2. Cultivo en cámara

Todas las estirpes se cultivaron en condiciones axénicas, fotoautotróficamente -salvo en los experimentos de nutrición con fructosa-, en los siguientes tipos de recipientes, de volumen y forma variables, a saber:

recipiente cilíndrico con base cónica de 4,5 cm de diámetro y 150-170 ml de volumen útil;

frasco de Roux de 5 cm de profundidad y 800 ml de volumen útil;

frasco de Roux de 8 cm de profundidad y 2-3 l de volumen útil;

botellón de 29 cm de profundidad y 20 l de volumen útil (Figura 4).

También se empleó en algunos experimentos una cubeta, igual a las utilizadas en cultivos al aire libre, de 60 litros de capacidad y $0,25\text{ m}^2$ de superficie superior expuesta a la luz y de 25 cm de profundidad, fabricada con fibra de vidrio y poliéster, sin que se adoptaran medidas para mantener la esterilidad, aunque no se registró contaminaciones por otros tipos de microorganismos (Figura 7 A).

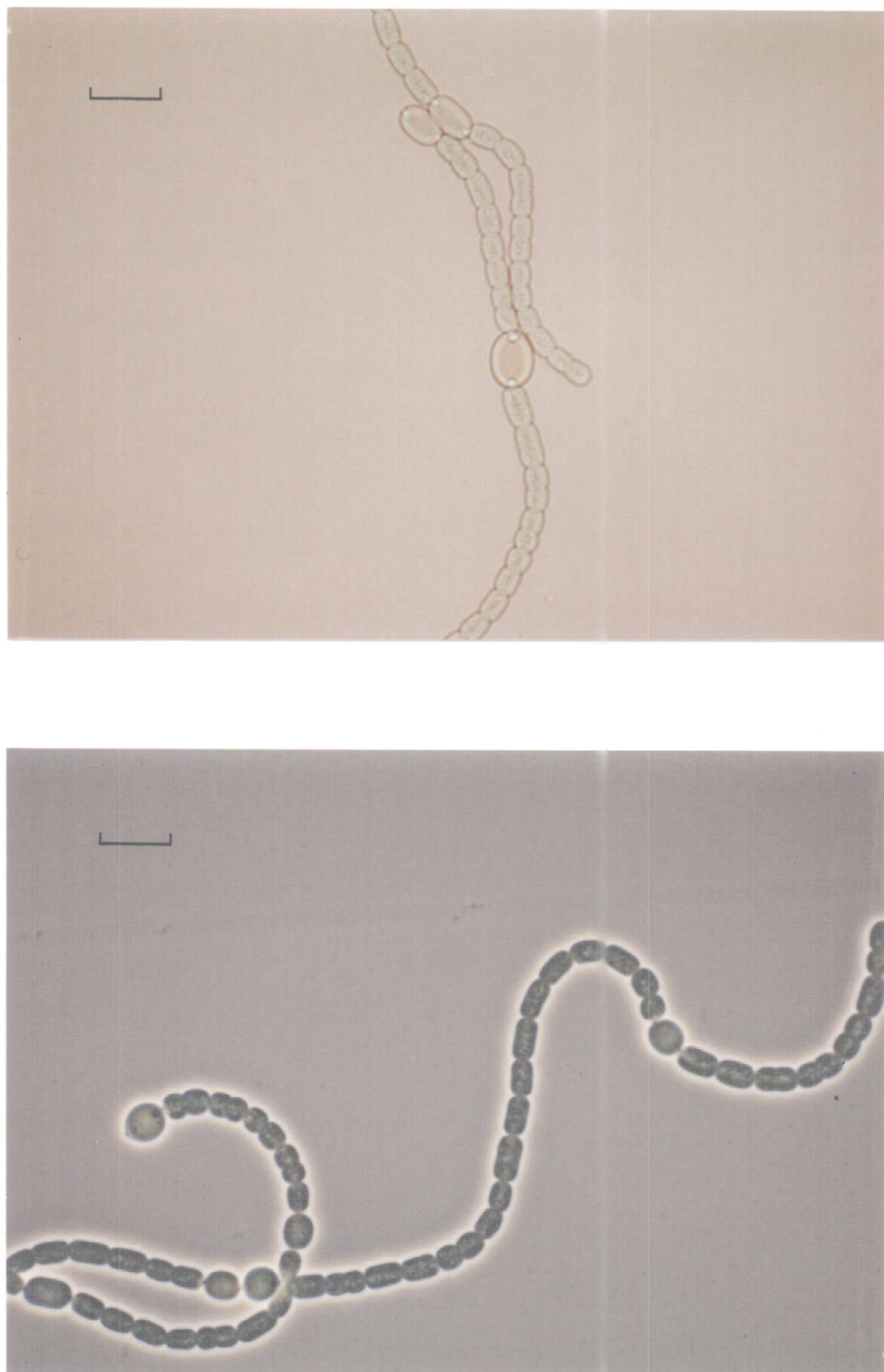


Figura 2. Filamentos de *A. variabilis* en cultivos con aire como fuente de nitrógeno. Arriba: microfotografía en campo claro; abajo: en contraste de fases. La barra equivale a 10 μm .

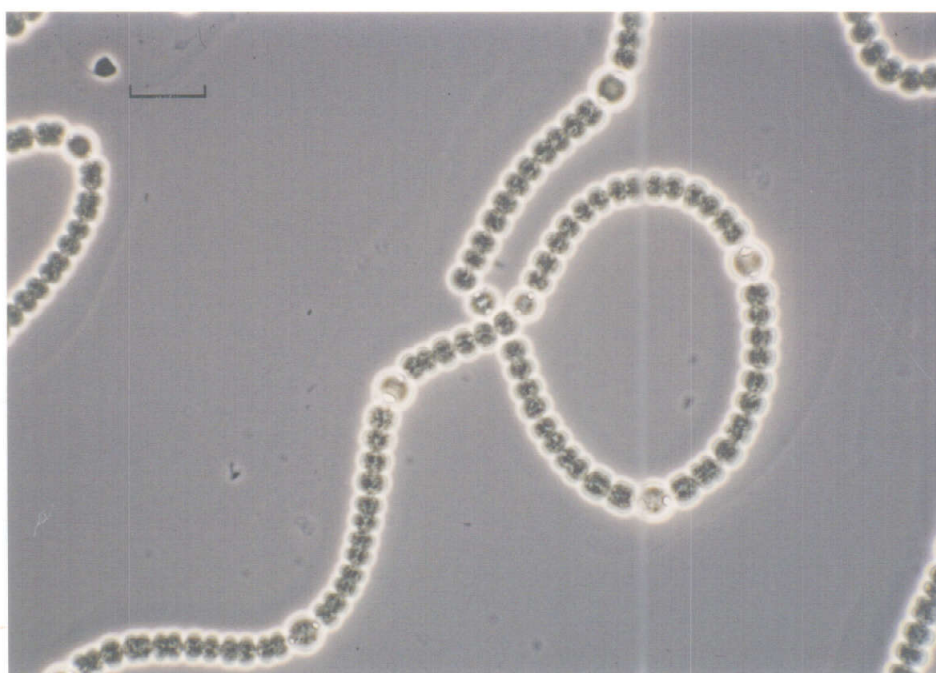
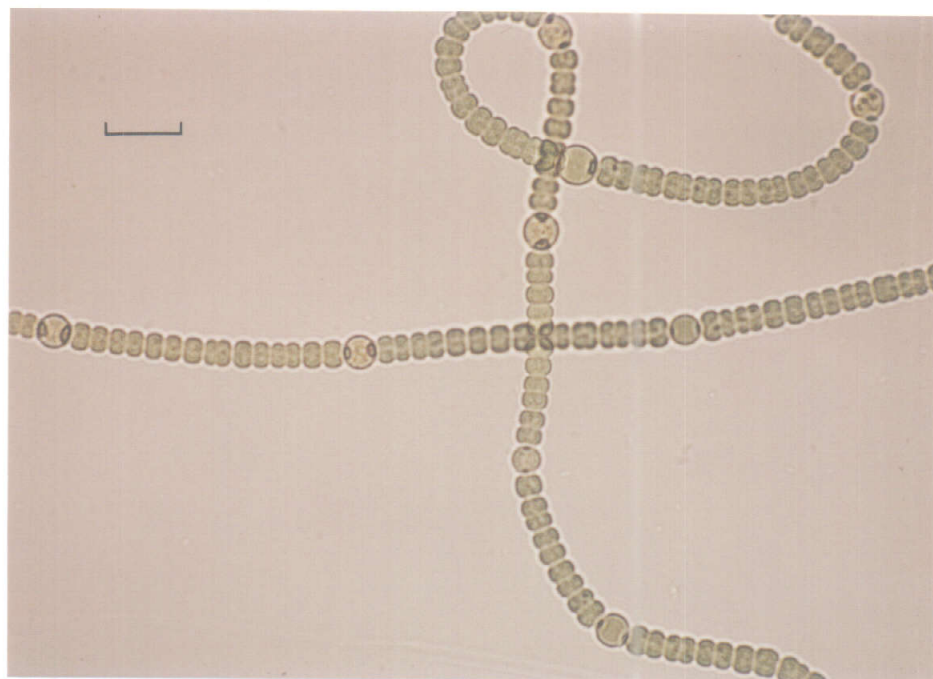


Figura 3. Filamentos de Anabaena ATCC 33047 en cultivos con aire como fuente de nitrógeno. Arriba: microfotografía en campo claro; abajo: en contraste de fases. La barra equivale a 15 μm .

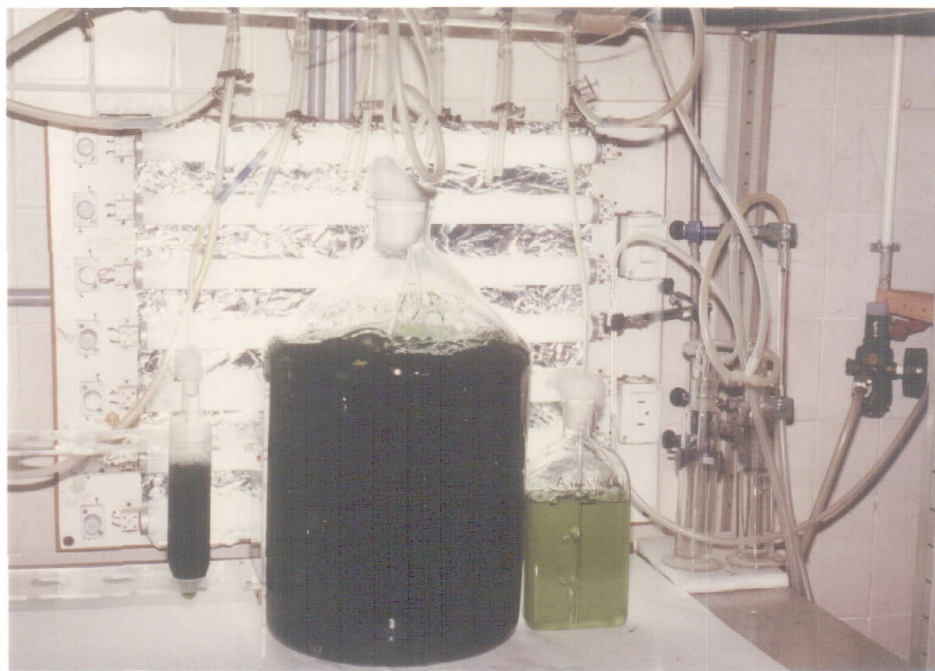


Figura 4. Cultivos en laboratorio de *A. variabilis* en recipientes de distinto tipo.

II.A.3. Cultivo al aire libre

Los cultivos al aire libre se realizaron en recipientes de distintos tipos dispuestos en la terraza de la Facultad de Biología de Sevilla (Figuras 5 y 6). Estos recipientes difieren en superficie, capacidad, forma y sistema empleado para la agitación según se especifica a continuación:

- a) cubetas de poliéster y fibra de vidrio de 0,5 x 0,5 m de superficie, con la superficie superior abierta al aire y con una profundidad efectiva de cultivo entre 15 y 55 cm, dependiendo del volumen de suspensión celular. En este tipo de cubetas se ensayaron dos sistemas de agitación, uno por burbujeo de aire a través de la suspensión, y otro por paletas giratorias. El primer sistema utilizó un electrosoplante SIEMENS ELMO G 2BH 4 que insuflaba aire, una vez filtrado a través de un filtro FILTERITE AMO 10-1, en la suspensión celular mediante una tubería de PVC finamente agujereada colocada sobre el fondo de las cubetas (Figura 7 A). El sistema de agitación por paletas utilizó un motor MULTIFIX M 80 que permitía hacer girar a velocidad regulable cuatro paletas de 14 x 38 cm de superficie, dispuestas en ángulo recto entre sí, y parcialmente sumergidas en la suspensión celular (Figura 7 B).
- b) Estanques de 1,25 x 0,8 m de superficie, con una profundidad efectiva de cultivo entre 10 y 25 cm, provistos a lo largo de su eje mayor de un tabique divisorio vertical de metacrilato a fin de formar dos canales de circulación. En cada uno de los extremos del estanque se dispusieron dos tabiques curvos verticales del mismo material para facilitar la circulación y agitación del cultivo. Un motor MULTIFIX M 80 hacía girar a velocidad regulable tres paletas de 28 x 32 cm de superficie, dispuestas en ángulo de 120° entre sí, y parcialmente sumergidas en la suspensión celular (Figura 8).
- c) Estanques metálicos de 5x2 m de superficie, con una altura efectiva entre 15 y 30 cm. Estos estanques disponían de una cubierta abatible de plástico transparente y de paredes recubiertas exteriormente con un aislante térmico. En este caso también se ensayaron los dos sistemas de agitación antes descritos. Para la agi

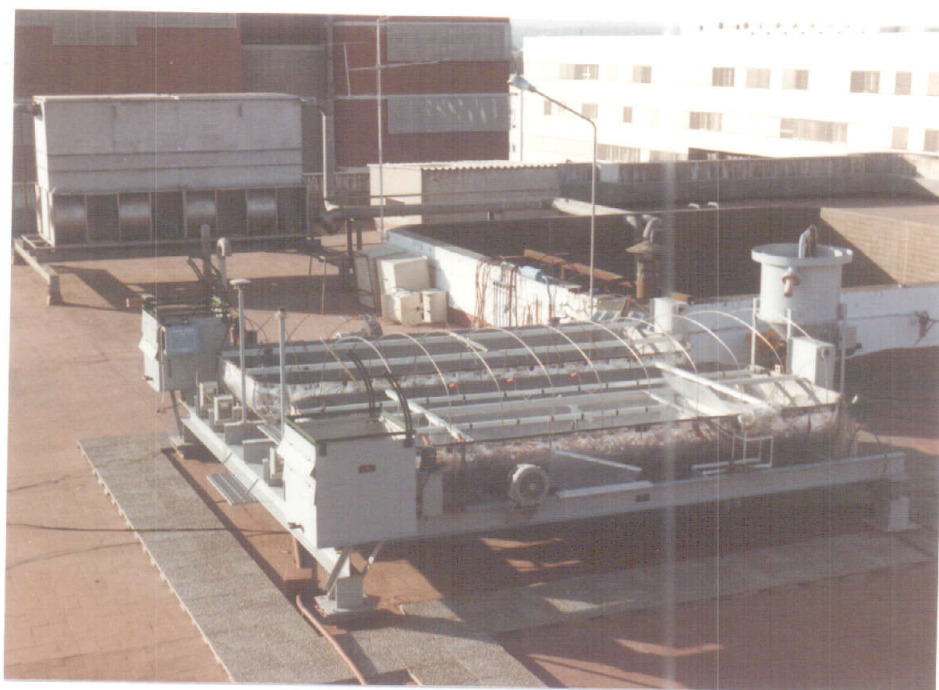


Figura 5. Instalaciones para el cultivo de microalgas a la intemperie en la terraza de la Facultad de Biología de Sevilla.
Arriba: estanques de 10 m^2 de superficie; abajo: batería de estanques de 1 m^2 de superficie.



Figura 6. Batería de cubetas de $0,25 \text{ m}^2$ de superficie para el cultivo de microalgas con agitación por aireación forzada.



Figura 7 A. Cubeta de 0,25 m² de superficie provista de entramado tubular perforado para la agitación de los cultivos mediante aireación forzada.

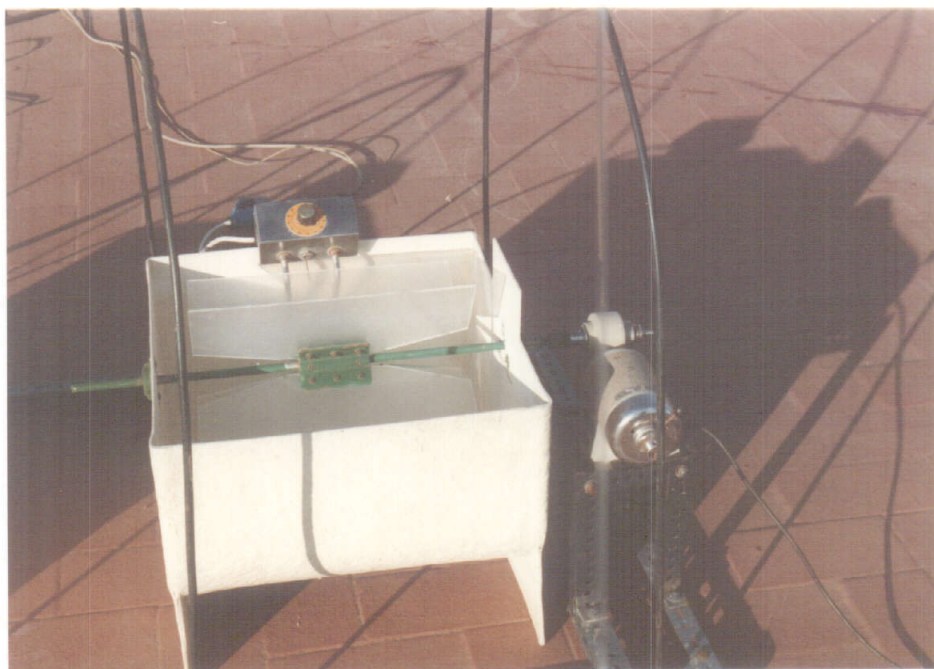


Figura 7 B. Cubeta de 0,25 m² de superficie provista de un sistema de paletas para la agitación de los cultivos.



Figura 8. Estanques de 1 m² de superficie para el cultivo de microalgas a la intemperie con agitación mediante paletas.

tación por aire se empleó un electrosoplante SIEMENS ELMO G 2BH 8, canalizándose el aire por seis tuberías agujereadas, paralelas entre sí, situadas a lo largo del fondo del estanque y conectadas perpendicularmente a otra sin agujerear de 5 m de longitud, situada en un lateral, que les servía de arteria principal (Figura 9). Para la agitación por paletas se utilizó un motor MULTIFIX MR 25 que hacía girar tres paletas de 0,3 x 1 m de superficie, dispuestas en ángulo de 120° entre sí, y parcialmente sumergidas en la suspensión celular (Figura 10).

Cuando se suministró CO_2 a los cultivos, éste se suplementó de forma diferente según el sistema de agitación empleado. Para el sistema de agitación por aireación forzada, una conducción de CO_2 puro se conectó a la del aire a la altura de un recipiente de expansión para conseguir una mezcla homogénea de aire y CO_2 . El caudal de CO_2 se midió con un caudalímetro (SISTEMA GAUTHIER, S.E.O.) y el del aire con un rotámetro (CONSTREMA); regulando ambos caudales se conseguía una mezcla aire- CO_2 en la proporción deseada (Figura 11). En el sistema de agitación por paletas, el CO_2 puro se suministró a través de un tubo poroso de plástico situado en el fondo de las cubetas, que permitió una difusión del gas en burbujas muy finas.

En aquellos experimentos en los que se mantuvo constante la temperatura de los cultivos, se utilizaron resistencias eléctricas cuyo funcionamiento se reguló mediante un termostato.

II.A.4. Composición de los medios de cultivo. Características generales

Excepto para Anabaena ATCC 33047, el medio de cultivo empleado fue el descrito por Arnon et al. (1974), siendo su composición la siguiente:

Compuesto	Concentración	
	(g l ⁻¹)	(mM)
K_2HPO_4	0,697	4,0
NaCl	0,117	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,124	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,015	0,1



Figura 9. Aspecto de un cultivo de *A. variabilis* en estanque de 10 m^2 de superficie con agitación por aireación forzada.

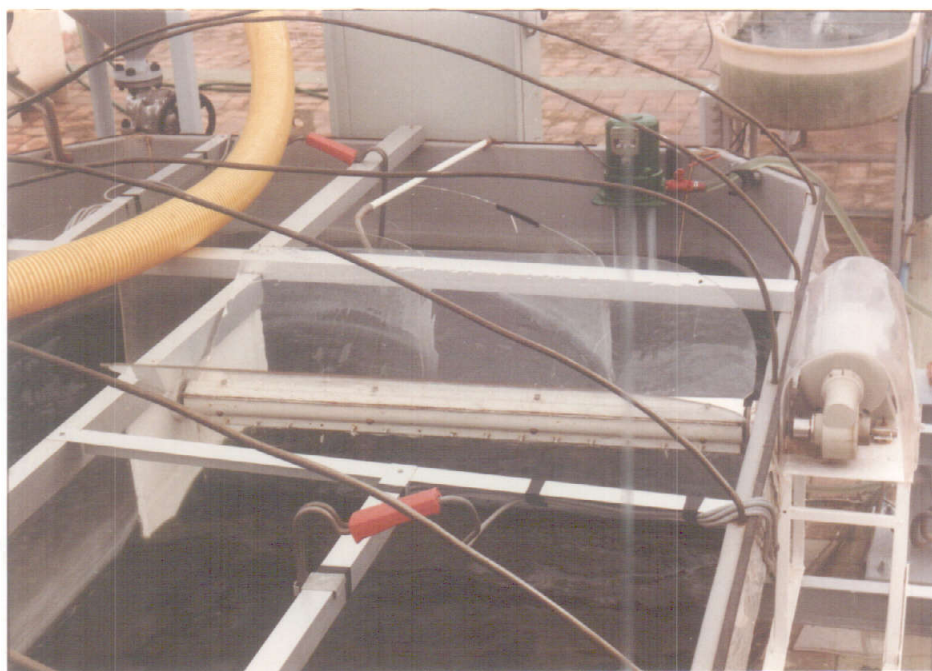


Figura 10. Detalle del sistema de agitación por paletas en estan-
que de 10 m² de superficie.



Figura 11. Sistema de tuberías para el suministro de aire y CO₂ a los cultivos de microalgas.

conteniendo además, por litro de medio de cultivo, 1 ml de las siguientes soluciones de Fe-EDTA y de micronutrientes D₇.

La solución de Fe-EDTA se prepara (Arnon et al., 1974) disolviendo 16 g de EDTA (forma ácida) y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua destilada y mezclándose con otra disolución que contiene 13,7 g de FeSO₄·7 H₂O en 364 ml de agua. La disolución resultante, de color amarillo-verdoso, se burbujea con aire durante toda la noche, a fin de oxidar completamente al hierro, dando así lugar a la disolución final, de color pardo oscuro, cuyo pH es aproximadamente 4 y que contiene 5 mg de Fe³⁺ y 13 mg de K⁺ por ml.

La composición de la solución de micronutrientes D₇ es la siguiente:

Compuesto	Concentración	
	(g l ⁻¹)	(mM)
H ₃ BO ₃	2,860	46,26
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,810	9,15
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	1,260	5,21
NaVO ₃	0,239	1,96
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,222	0,77
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,079	0,32
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,040	0,17

Anabaena ATCC 33047 se cultivó en el siguiente medio sintético, modificado a partir del medio ASP-2 descrito por Provasoli et al. (1957):

Compuesto	Concentración	
	(g l ⁻¹)	(mM)
NaCl	5,000	85,56
NaHCO ₃	4,200	50,00
KCl	0,600	8,05
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,250	1,01
K ₂ HPO ₄	0,174	1,00
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,050	0,34

conteniendo además 1 ml de la solución de Fe-EDTA y 1 ml de la solución D₇ por litro de medio de cultivo.

Para proceder a la esterilización del medio se colocó la disolución de los nutrientes en el propio frasco de cultivo, a excepción del fosfato y, cuando el medio lo incluía, también del bicarbonato. Todos los recipientes se taparon con algodón hidrófobo que era atravesado por una varilla de vidrio hueca cuyo extremo inferior llegaba al fondo del recipiente y el superior, relleno con un pequeño trozo de algodón hidrófobo que servía de filtro, se prolongó mediante un tubo de goma, que se cerraba con una pinza antes de proceder a la esterilización, y que sirvió de conexión con el sistema de gaseo durante el cultivo de las células. La esterilización se llevó a cabo, durante 20 minutos, por el vapor de agua caliente producido en un autoclave SELECTA modelo 437-G a la presión de 1 atmósfera (121°C). El fosfato y bicarbonato, esterilizados por separado para evitar su precipitación se añadieron, una vez fríos, al frasco de cultivo manteniendo las condiciones de esterilidad.

El cultivo de las estirpes en el laboratorio se llevó a cabo en una cámara de cultivo climatizada a 30°C. Los cultivos se iluminaron de manera continua empleando tubos fluorescentes (OSRAM daylight 20 W) que suministraban en la superficie del cultivo una irradiancia variable entre 20 y 60 W m⁻², según la distancia de la fuente luminosa a que se situaron los recipientes. Para los experimentos a temperaturas inferiores a 30°C se empleó un baño refrigerador TAMSON. Cuando los cultivos se sometieron a los ciclos luz/oscuridad, ésta última se consiguió enfundando completamente los recipientes en cajas de cartón recubiertas con papel de aluminio.

En general el suministro de CO₂ se realizó burbujear una mezcla de aire:CO₂ en proporción 98:2 (v/v) a través del medio de cultivo, si bien en algunos experimentos se empleó sólo aire o la proporción de CO₂ fue menor del 2%, especificándose en cada caso.

El inóculo empleado para comenzar todos los experimentos al aire libre se cultivó en la cámara del laboratorio a 30°C en botellones de 20 l de capacidad, con iluminación continua de

40 W m^{-2} y burbujeándose la suspensión celular con aire suplementado en CO_2 al 2% (v/v) a un caudal de 90 l por litro y h (Figura 4). Cuando la suspensión celular tuvo entre 4 y 6 mg de clorofila por litro, se transportaron los botellones a la terraza y se trasvasó el contenido de cada uno a los recipientes al aire libre, donde se dejaron adaptar las células durante 3-4 días previamente a cada experimento.

II.A.5. Mantenimiento de las estirpes

La conservación y mantenimiento axénico de las estirpes se llevó a cabo mediante su siembra en placas de Petri rellenas con medio de cultivo sólido, de composición igual que la descrita en el apartado anterior y suplementado con DIFCO-BACTOAGAR al 1,5% (p/v) (Figura 12). Tras cinco días de crecimiento a 30°C y con iluminación continua de 20 W m^{-2} las placas se guardaron a 4°C . Estas placas sembradas sirvieron para iniciar los cultivos en medio líquido y, con una periodicidad aproximada de un mes, cada estirpe se volvió a sembrar en placas nuevas a fin de conservarlas.

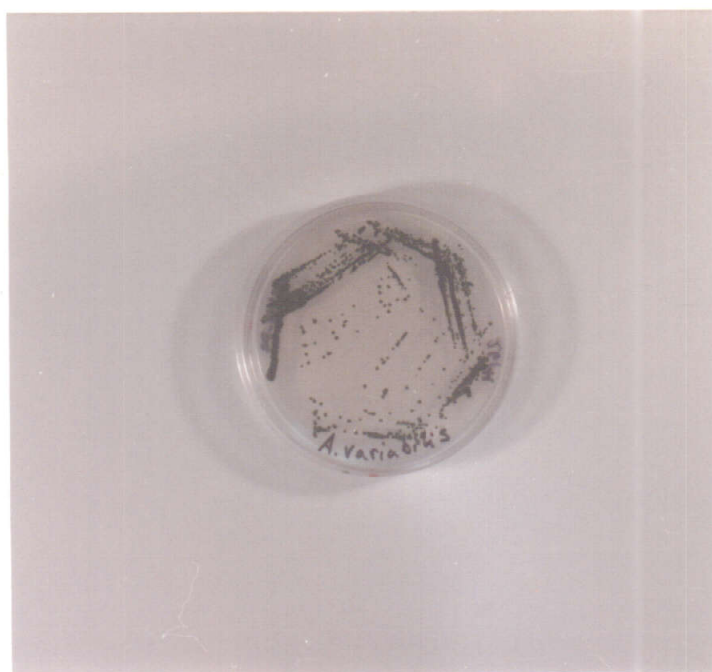


Figura 12. Cultivo de A.variabilis en medio sólido.

II.B. ENSAYO DE ACTIVIDADES

II.B.1. Ensayo de la actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa de los cultivos celulares se determinó por la técnica de reducción de acetileno a etileno descrita por Stewart et al. (1967). Los ensayos se realizaron en erlenmeyers de 17 ml de capacidad, en los que se dispusieron 2 ml de la pertinente suspensión celular en su propio medio de cultivo. Después de tapar las vasijas con tapones de goma (ARTHUR THOMAS, Co.) se inyectaron 1,5 ml de C_2H_2 para alcanzar una concentración de acetileno del 10% (v/v) en la atmósfera de la vasija. Las vasijas mantenidas en agitación en un baño de Warburg (BRAUN), a la misma temperatura que la utilizada para el crecimiento del alga -excepto obviamente en los experimentos en que se estudió el efecto de la propia temperatura de ensayo-, se iluminaron desde abajo con luz blanca de una irradiancia de 100 W m^{-2} en el fondo de las vasijas. La reacción se inició encendiendo la luz, se dejó proceder durante 15 minutos, y se detuvo apagándola. Inmediatamente después se extrajo una parte alícuota de 0,5 ml de la fase gaseosa de la vasija mediante una microjeringa HAMILTON, se obturó la punta de su aguja pinchándola en un tapón de goma para así evitar la pérdida de gas durante el trasvase de la muestra y, finalmente, se inyectó en el cromatógrafo. Cuando el experimento precisó varios ensayos simultáneos se usaron jeringas de polipropileno de 1 ml y se procedió de igual forma.

Para que, en las condiciones del ensayo, la luz fuera siempre saturante el contenido de clorofila por vasija no superó los 12 μg . Con este objeto, cuando la densidad del cultivo era muy alta, se diluyó convenientemente la suspensión celular con medio de cultivo fresco. En las condiciones del ensayo, la producción de etileno fue lineal desde los 5 hasta los 80 minutos.

II.B.2. Determinación polarográfica del desprendimiento de oxígeno

La determinación de la actividad fotosintética de las suspensiones celulares se llevó a cabo con un electrodo de oxígeno tipo Clark (YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS Co.), con unidad de polarización y baño para cuatro cubetas, acoplado a una unidad ter-

morreguladora de flujo continuo LAUDA K2R (MESSGERATE WERK LAUDA). La unidad de polarización se conectó a un registrador SERVOSCRIBE 1S (SMITHS INDUSTRIES Ltd.).

Los ensayos se realizaron a la temperatura de cultivo, generalmente a 30°C. En la cámara de ensayo del electrodo se colocaron 3 ml de suspensión celular en su propio medio de cultivo con un contenido en clorofila inferior a 20 µg. Tras 3 minutos de incubación en la oscuridad la reacción se inició iluminando lateralmente la cámara mediante un proyector de diapositivas ZEISS IKON (IKOLUX AN 24), que suministraba una irradiancia de 200 W m⁻² sobre la superficie de la cámara de ensayo. La respuesta se registró durante 5-10 minutos.

Previamente a cada experimento, el electrodo se calibró con agua destilada saturada de aire a la temperatura de ensayo primero, y tras la adición de ditionito sódico, a fin de reducir la presión parcial de oxígeno a cero, después.

II.C. METODOS Y DETERMINACIONES ANALITICAS

II.C.1. Determinación de peso seco

Para la determinación del contenido en peso seco de los cultivos se filtran 30 ml de la pertinente suspensión celular a través de un filtro WHATMAN GF/C previamente tarado y seco, después de lavarlo repetidas veces, con al menos 200 ml de agua destilada, se seca en estufa a 80°C hasta peso constante. Las determinaciones de peso seco de los cultivos al aire libre se hacen de la misma forma, pero utilizando entre 100-200 ml de suspensión celular y lavándose con 500 ml de agua destilada.

II.C.2. Determinación de clorofila

La clorofila a se determinó según el método de Mac kinney (1941). 2 ml de la suspensión celular se centrifugan a 2500 g durante 5-10 minutos en una centrífuga IEC CLINICAL. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular en 2 ml de metanol puro. Se agita y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones, y se mide la absorbancia del sobrenadante a 665 nm frente a agua. El coeficiente de extinción empleado fue de $74,46 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$.

Cuando las suspensiones celulares eran diluidas se utilizaron 4-6 ml de las mismas con objeto de que la absorbancia del sobrenadante fuera siempre superior a 0,100. Por el contrario, cuando la suspensión celular era demasiado concentrada, se diluyó convenientemente el precipitado celular con mayores volúmenes de metanol para así conseguir absorbancias inferiores a 0,900.

II.C.3. Análisis elemental de la biomasa: contenido en C, N, H y O

A tenor de la concentración del cultivo, se centrifugan entre 30 y 100 ml de suspensión celular a 3000-6000 g durante 10 minutos en una centrífuga SORVALL RC-2B refrigerada a 4-5°C. El precipitado se lava con agua destilada y se centrifuga de nuevo, esta operación se repite dos veces más y al final se trasvasa el precipitado resultante a un tubo de vidrio reforzado que se seca en una estufa KOWELL a 80°C durante 72 horas. Pasado este tiempo, el

tubo se coloca en un desecador, donde se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente. Una vez frío, se toman partes alícuotas del material seco que, una vez pesadas, se introducen en contenedores de estaño, para la determinación de C,N,H, o de plata, para la de O, y a continuación se disponen en un revólver de muestras de un analizador CARLO ERBA STRUMENTAZIONE 1106 conectado a un integrador HEWLETT-PACKARD 3390A. Las muestras deben pesar entre 500 y 1500 µg, y los contenedores se lavan previamente con cloroformo y acetona para eliminar posibles residuos orgánicos, secándose a continuación en una estufa a 80°C.

Los análisis se efectuaron por triplicado utilizando los siguientes compuestos como patrones:

<u>Patrón</u>	<u>Proporción teórica (%)</u>				
	C	N	H	O	S
Ciclohexanona 2,4-dinitrofenilhidrazona	51,79	20,14	5,07	23,00	0
Sulfanilamida	41,84	16,27	4,68	18,58	(18,62)
Acetanilida	71,09	10,36	6,71	11,84	0

En cada tanda de análisis se colocaron los tres patrones, también en una cantidad entre 500 y 1500 µg, en contenedores independientes, empleándose como blanco un contenedor vacío.

II.C.4. Determinación de cenizas

Aproximadamente 10 mg de material seco de la biomasa empleada para el análisis elemental se pesan exactamente (Pi) en un pequeño crisol de cuarzo previamente tarado (Pc). El crisol con la muestra se introduce en una mufla SELECTA Termotronic de 3 kW a temperatura ambiente y se eleva su temperatura interior hasta 400°C. Transcurrido un periodo de 6 horas se apaga la mufla y, cuando la temperatura está entre 200 y 150°C, se saca el crisol. Finalmente se coloca el crisol en un desecador y se deja enfriar hasta temperatura ambiente, pesándolo de nuevo (Pf). El contenido en cenizas

respecto al peso seco se calcula según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{P_f - P_c}{P_i - P_c} \times 100$$

La determinación de cenizas con muestras muy pequeñas de material (10 mg) se pudo realizar gracias a los crisoles de cuarzo de bajo peso (460 mg, aproximadamente) y a la microbalanza digital METTLER M3 empleados.

II.C.5. Preparación para la determinación secuencial de componentes moleculares

Para la determinación de proteínas, carbohidratos, lípidos, ARN y ADN, se siguió un proceso que permitió analizar los mencionados componentes sin necesidad de utilizar muestras de volumen excesivo o que no tuvieran el mismo origen.

El análisis completo se inicia con una muestra de aproximadamente 100 ml de suspensión celular, de la que una vez homogeneizada por agitación, se destinan 60 y 4 ml, respectivamente para la determinación, por duplicado, del peso seco y de la clorofila. El resto del volumen se distribuye en seis tubos de vidrio reforzado de los que dos se utilizan para las determinaciones de carbohidratos y proteínas (2-4 ml por tubo), dos para ARN y dos para ADN (4-8 ml por tubo). Los lípidos se analizan a partir de estos mismos cuatro últimos tubos.

Los seis tubos se centrifugan a 2500 g durante 10 minutos y, tras desechar el sobrenadante, se lavan con agua destilada dos veces consecutivas, centrifugando de nuevo después de cada lavado. Los dos precipitados destinados a la determinación de proteínas y carbohidratos se resuspenden independientemente en 2-5 ml de NaOH 1N y, después de agitar, se dejan homogeneizar en un baño de agua a 70°C durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se enfrían con agua corriente y se analizan las proteínas y los carbohidratos.

Por otra parte, a los precipitados de los cuatro tu

bos restantes, destinados a la determinación de ácidos nucleicos y lípidos, se les añaden 2-3 ml de etanol puro, y después de agitar se dejan reposar durante 1 hora en un frigorífico a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugan a 2500 g durante 5 minutos y se recogen los cuatro sobrenadantes etanólicos en dos tubos de ensayos, que se utilizan para el análisis, por duplicado, de los lípidos. Los correspondientes cuatro sedimentos se emplean para el análisis, también en cada caso por duplicado, del ARN y del ADN.

II.C.6. Determinación de proteína

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976), empleándose los siguientes reactivos y soluciones:

- a) Reactivo de proteínas. Se disuelven 100 mg de azul de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol y se añaden a la solución 100 ml de ácido fosfórico (85% (p/p); $d = 1,71 \text{ g ml}^{-1}$) y agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 1 litro. La solución se filtra a través de papel WHATMAN GF/C y se guarda en un frasco color topacio a temperatura ambiente.
- b) NaOH 1N
- c) Solución patrón. Se disuelven 10 mg de seroalbúmina bovina en 50 ml de NaOH 1N. Esta solución se prepara inmediatamente antes de verificar la recta de calibrado y de proceder a los análisis de las muestras.

Con cada determinación se incluyen patrones que contienen 10, 20, 30, 40 y 50 μl de la solución de seroalbúmina, en tanto que para la evaluación de proteína en las soluciones problemas se toman 30 y 50 μl de los correspondientes tubos. A continuación se completan todos los tubos hasta un volumen final de 50 μl con NaOH 1N y como blanco se emplea un tubo con 50 μl de NaOH 1N. Finalmente, se añaden a todos los tubos 2 ml del reactivo de proteínas, se agitan sin producir espuma y se esperan 10 minutos. La reacción desarrolla un color azul-violeta, cuya absorbancia se mide a 595 nm frente al blanco.

II.C.7. Determinación de carbohidratos

El método empleado para la determinación de carbohidratos fue el de Dubois et al. (1956), utilizándose los siguientes reactivos y soluciones:

- a) Solución fenólica. Se disuelven 81 g de fenol en agua destilada hasta un volumen final de 100 ml. La disolución se conserva a 4°C y es estable durante al menos 6 meses.
- b) H_2SO_4 (98% (p/p); $d = 1,84 \text{ g ml}^{-1}$)
- c) NaOH 1N
- d) Solución patrón. Se disuelven 50 mg de glucosa en 100 ml de NaOH 1N. Esta disolución se prepara inmediatamente antes de verificar la recta de calibrado y de proceder a los análisis de las muestras.

Con cada determinación se incluyen patrones que contienen 20, 40, 80, 120, 160 y 200 μl de la solución patrón de glucosa, en tanto que para la evaluación de carbohidratos en las soluciones problemas se emplean partes alícuotas de 0,2 y 0,5 ml de los respectivos tubos. A continuación se enrasan todos los tubos hasta un volumen final de 2 ml con NaOH 1N y como blanco se emplea un tubo con 2 ml de NaOH 1N. Seguidamente, se añaden a todos los tubos 50 μl de la solución fenólica y se agita vigorosamente. Por último, se añaden 5 ml de ácido sulfúrico, se agitan de nuevo los tubos y se dejan estar 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción desarrolla un color anaranjado, cuya absorbancia se mide a 485 nm frente al blanco.

II.C.8. Determinación de lípidos

Para la determinación de lípidos totales se siguió el test BOEHRINGER, basado en el reactivo de la fosfovainillina, que utiliza los siguientes reactivos y soluciones:

- a) Etanol puro
- b) H_2SO_4 (98% (p/p); $d = 1,84 \text{ g ml}^{-1}$)

- c) Solución patrón. A 0,30 ml del patrón de lípidos BOEHRINGER se añaden 9,7 ml de etanol puro. La disolución se guarda a 4°C.
- d) Reactivo de fosfovainillina BOEHRINGER. Es estable a temperatura ambiente.

Para realizar la recta de calibrado se pipeteen 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 ml de la solución patrón de lípidos en los respectivos tubos de ensayo con tapón de rosca. Por otra parte, para la determinación de lípidos en las soluciones problemas se pipeteen 0,5 y 1 ml de cada correspondiente solución etanólica en sendos tubos igualmente roscados. A continuación se enrasan todos los tubos hasta un volumen final de 1 ml de etanol y como blanco se utiliza un tubo que contiene 1 ml de etanol. Se añaden 3 ml de ácido sulfúrico a cada uno y, después de enroscar los tapones y agitar los tubos, se colocan todos ellos en un baño con agua hirviendo durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se enfrían con agua corriente y se trasvasa una parte alícuota de 0,5 ml de cada uno a sendos tubos de ensayo vacíos. Por último, se añaden a cada tubo 2 ml de fosfovainillina y se incuban durante 30 minutos en un baño a 35°C. La reacción desarrolla un color rosa, cuya absorbancia se mide a 530 nm frente al blanco.

II.C.9. Determinación de ARN

El método empleado fue el de Lin y Schjeide(1969), utilizándose los siguientes reactivos y soluciones:

- a) Solución cúprica. 150 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 100 ml de HCl (37% (p/p); $d = 1,19 \text{ g ml}^{-1}$). Esta solución se guarda en frasco topacio y es estable a temperatura ambiente.
- b) Solución de orcinol. 12,5 g de orcinol se disuelven en 25 ml de etanol.
- c) KOH 0,3N
- d) HClO_4 (60% (p/p); $d = 1,53 \text{ g ml}^{-1}$)
- e) Solución patrón. 10 mg de ARN de levadura se disuelven en 100 ml de agua destilada. La disolución se guarda congelada.

Inmediatamente antes de la determinación se mezclan 1 ml de la solución de orcinol con 50 ml de la solución cúprica.

A dos de los tubos conteniendo los precipitados libres de lípidos se añaden 2 ml de KOH 0,3N y se incuban durante 24h en un baño a 30°C. Transcurrido este tiempo se colocan los tubos en una maceta con hielo y se añaden 0,1 ml de HClO_4 concentrado. Después de agitar se centrifugan a 2500 g durante 10 minutos y se separan cuidadosamente los sobrenadantes, vertiéndolos en otros dos tubos de ensayo colocados igualmente en la maceta.

Con cada determinación se incluyen patrones conteniendo 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 ml de la solución patrón de ARN en tubos con tapón de rosca, mientras que para el análisis de las muestras se pipetea 0,3 y 0,5 ml, de cada uno de los dos sobrenadantes resultantes de la extracción con ácido perclórico, en tubos igualmente roscados. Seguidamente se enrasan todos los tubos con agua destilada hasta un volumen final de 2 ml y se incluye un blanco con 2 ml de agua destilada. Se añaden 2 ml de la solución orcinol-cloruro cúprico a cada tubo, se enroscan los tapones, se agita cada uno de los tubos, y se colocan en un baño con agua hirviendo durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se enfrían los tubos con agua corriente y se mide la absorbancia a 665 nm frente al blanco. La reacción desarrolla un color verde.

II.C.10. Determinación de ADN

Se siguió el método de Burton (1968), empleándose los siguientes reactivos y soluciones:

- a) Solución de acetaldehído. Con una pipeta se añade 1 ml de acetaldehído a 50 ml de agua destilada. Puesto que el acetaldehído es muy volátil, previamente la pipeta ha de enfriarse dentro de una nevera. Esta solución mantenida a 4°C es estable durante al menos 6 meses.
- b) Solución de difenilamina. Se disuelven 1,5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial y se añaden 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Esta solución es estable a 4°C durante 2 meses.

c) HClO_4 1N y HClO_4 0,5N

d) Solución patrón. Se disuelven 10 mg de ADN de timo de ternera en 50 ml de NaOH 5 mM.

Inmediatamente antes de la determinación se mezclan 0,25 ml de la solución de acetaldehído con 50 ml de la solución de difenilamina.

A los otros dos tubos conteniendo los precipitados libres de lípidos se añaden 2 ml de HClO_4 0,5N y se agitan. Por otra parte se pipetea 2 ml de la solución patrón de ADN en un tubo de ensayo, se le añaden 2 ml de HClO_4 1N y se agita. A continuación los tres tubos se incuban a 70°C durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se enfrían con agua corriente, pero los dos tubos correspondientes a la muestra problema se someten a una centrifugación a 2500 g durante 10 minutos, y después se trasvasa cuidadosamente el sobrenadante a otros dos tubos de ensayo.

Para verificar la recta de calibrado se pipetea en los respectivos tubos roscados 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 ml de la solución patrón de ADN que ha sido tratada con ácido perclórico y calentada. Paralelamente se pipetea 0,5 y 1 ml de cada uno de los tubos conteniendo los sobrenadantes de la solución problema en otros dos tubos roscados. Se ajusta el volumen final de todos los tubos a 1 ml con HClO_4 0,5N y se incluye un blanco con 1 ml de HClO_4 0,5N. A continuación se añaden 2 ml de la solución de difenilamina-acetaldehído a cada tubo y se agitan. Por último, se incuban todos los tubos en un baño a 30°C durante 20 h y, transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia a 600 nm frente al blanco. La reacción desarrolla un color violáceo. Para esta determinación se recomienda el uso de guantes ya que la solución difenilamina-acetaldehído ataca la piel.

II.C.11. Determinación de ficobiliproteínas

El método empleado fue el de Glazer (1976). Se centrifugan 20-40 ml de suspensión celular a 8000 g durante 10 minutos. El precipitado se lava con agua destilada y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. El precipitado final se resuspen-

de en 5 ml de agua destilada y se somete a tratamiento con ultrasonidos (BRANSON) cuatro veces consecutivas, con una frecuencia de oscilación de 20 kHz y una potencia de 80 W, durante 15 segundos, con intervalos de parada de 1 minuto entre las sonicaciones para evitar el calentamiento de la muestra. El extracto sonicado se centrifuga a 2500 g y se mide la absorbancia del sobrenadante a 620 nm frente a agua. El coeficiente de extinción empleado fue de $7,41 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$.

II.C.12. Determinación de carotenoides

El método seguido fue el de Davies (1976). Se centrifugan a 8000 g 20-40 ml de suspensión celular durante 10 minutos. Se lava el precipitado con agua destilada y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. El precipitado final se resuspende en 5 ml de agua destilada y se somete a tratamiento con ultrasonidos (BRANSON) cuatro veces consecutivas, con una frecuencia de oscilación de 20 kHz y una potencia de 80 W, durante 15 segundos, con intervalos de parada de 1 minuto entre las sonicaciones. Se añaden 4 ml de acetona pura a 1 ml del extracto sonicado y se agita. Se centrifuga a 2500 g durante 5 minutos y se mide la absorbancia del sobrenadante a 480, 645 y 663 nm, frente a acetona al 80% (v/v). La absorbancia neta de los carotenoides a 480 nm viene dada por $A_{480} (\text{carotenoides}) = A_{480} + 0,114 A_{663} - 0,638 A_{645}$. El coeficiente de extinción empleado para la absorbancia neta de los carotenoides a 480 nm fue $250 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$.

II.C.13. Determinación de etileno

El etileno formado en el ensayo de la actividad nitrógenasa se determinó por cromatografía de gases, empleándose un cromatógrafo de gases PYE UNICAM 204 equipado con un detector de ionización de llama y una columna PORAPAK N. La temperatura del detector fue de 150°C , la del inyector de 100°C y la de la columna de 80°C . La señal de salida fue recogida por un integrador PYE UNICAM DP 88 (MINIGRATOR). El contenido en etileno de las muestras gaseosas se determinó por comparación con patrones de etileno conocidos.

II.C.14. Determinación de la fructosa en el medio de cultivo

Después de centrifugar a 2500 g durante 10 minutos 2 ml de la suspensión celular pertinente, se tomaron partes alícuotas de 20 y 50 µl del sobrenadante y se estimó el contenido en carbohidratos según el método descrito en el apartado II.C.7, pero utilizando agua destilada en lugar de NaOH 1N.

II.C.15. Determinación del carbono inorgánico en el medio de cultivo

Para hallar la concentración del carbono inorgánico total disuelto en el medio de cultivo, se tomaron 20 ml de suspensión celular y se centrifugaron a 2500 g durante 30 segundos. Se colocaron 15 ml del sobrenadante en un vaso de precipitado adecuado y se introdujo un electrodo de anhídrido carbónico HNU (ISE-10-22-00) conectado a un potenciómetro BECKMAN 4500. La solución se mantuvo en agitación, ajustándose su pH entre 4,3 y 4,5 por adición de 3 ml de NaH_2PO_4 5 M, a fin de que todo el carbono inorgánico pasara a la forma de CO_2 y, una vez estabilizado el potencial, se anotó éste. Para confeccionar la recta de calibrado, a 15 ml de medio de cultivo, mantenidos en las mismas condiciones de agitación, se añadieron 3 ml de NaH_2PO_4 5 M, anotándose el potencial obtenido tras la adición de cantidades conocidas de NaHCO_3 .

II.C.16. Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó durante la fase exponencial o logarítmica del cultivo, según la ecuación:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

donde x_1 es la concentración de células, estimada como clorofila o peso seco, a tiempo t_1 , y x_2 la concentración de células a tiempo t_2 . Las dimensiones de la velocidad específica de crecimiento son tiempo⁻¹. Una $\mu = 0,693 \text{ día}^{-1}$ indica un tiempo de generación de 24h.

El tiempo de generación (t_g) viene dado en función de μ , según la fórmula:

$$t_g = \frac{0,693}{\mu}$$

II.C.17. Determinación de la productividad en cultivos semicontinuos

La productividad (P) de un cultivo de microalgas viene dada por el aumento en peso seco de la biomasa por unidad de área iluminada y por unidad de tiempo. Para determinarla se mide el contenido en peso seco del cultivo a un tiempo dado y de nuevo después de un intervalo de tiempo conveniente, aproximadamente 24 h. A partir de estos datos, del volumen total del cultivo y del área iluminada, la productividad, en g(peso seco) $m^{-2}día^{-1}$, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{(C_2 - C_1) V}{(t_2 - t_1) A}$$

C_1 y C_2 : concentración de la suspensión celular a tiempo t_1 y t_2 , respectivamente (g(peso seco) l^{-1})

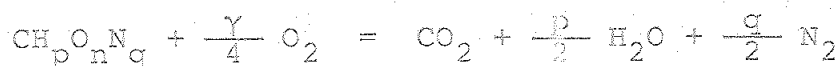
A : superficie iluminada (m^2)

V : volumen de suspensión celular (l)

Para mantener el cultivo en condiciones de semicontinuidad se removió periódicamente el volumen del mismo, correspondiente a su incremento en biomasa, y se repuso con medio fresco de manera que mantuviera su densidad inicial.

II.C.18. Determinación del grado de reducción de la biomasa

El grado de reducción de la biomasa se calculó según el método descrito por Patel y Erickson (1981). Si la ecuación para la oxidación de la biomasa seca es



donde $\text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_q$ corresponde a la fórmula elemental de la biomasa calculada por átomo de carbono, entonces

$$\gamma = 4 + p - 2n$$

es el grado de reducción de la biomasa, que indica el número de equivalentes-gramo de oxígeno requeridos para la oxidación completa de la cantidad de biomasa que contiene un átomo-gramo de carbono. Este parámetro también representa el número de equivalentes de electrones disponibles que se transfieren al oxígeno por átomo-gramo de carbono de la biomasa. De forma práctica, el grado de reducción se calcula en función de los porcentajes de C, H y O obtenidos del análisis elemental de la biomasa seca, sobre la base de los siguientes números de oxidación : C = 4, H = 1 y O = -2

$$\gamma = \frac{\%C \frac{4}{12} + \%H - \%O \frac{2}{16}}{\%C \frac{1}{12}}$$

En esta fórmula no se considera la contribución del nitrógeno por ser organismos fijadores y la fuente de nitrógeno fue N_2 (Lee y Erickson, 1984).

El grado de reducción es un parámetro que puede oscilar entre 0 para el anhídrido carbónico (CO_2) y 8 para el metano (CH_4).

II.C.19. Estimación del calor de combustión de la biomasa

El calor de combustión de la biomasa, H_b , se estimó por el método de Minkevich y Eroshin (1973), basado en la observación de que los calores molares de combustión de compuestos orgánicos son prácticamente proporcionales a la cantidad de oxígeno consumido (Thornton, 1917; Kharasch y Sher, 1925). La fórmula aplicada fue:

$$H_b = \frac{Q_o \cdot \gamma \cdot \sigma}{12}$$

Q_o = valor medio del calor de combustión de la biomasa por equivalente-gramo de oxígeno consumido (27 kcal/eq-g de oxígeno)

γ = grado de reducción de la biomasa (eq-g de oxígeno/at-g de C)

σ = tanto por uno en peso seco de carbono de la biomasa

II.C.20. Medidas del pH

El pH de las soluciones y de los cultivos se determinó con un pH-metro METROHM modelo 654, provisto de escala expandida. Las medidas in situ de pH en los cultivos al aire libre se realizaron con un pH-metro portátil GALLENKAMP pHK-120-B.

II.C.21. Medidas de irradiancia

En los experimentos de laboratorio la irradiancia se determinó con un aparato YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS modelo Radiometer 65 A, equipado con un sensor Radiometer 6551, que suministraba una salida constante de 280 a 2600 nm.

En los experimentos al aire libre la irradiancia se midió con un piranómetro MIDDLETON SP 237 conectado a un procesador de datos AUTODIGIT (Geónica, S.A.).

II.C.22. Medidas gravimétricas

Para los reactivos y el peso seco se empleó una balanza analítica METTLER H 10 con precisión de décimas de milígramo. En los análisis elementales y de cenizas se usó una microbalanza METTLER M3 con precisión de microgramos.

II.C.23. Medidas espectrofotométricas

Se llevaron a cabo con un espectrofotómetro PYE UNI CAM SP8-150.

II.C.24. Medidas de temperaturas ambientales y de las suspensiones celulares al aire libre

La temperatura ambiental exterior se midió con una sonda de temperatura modelo STA-101 con protector de radiación solar PRS-101. La temperatura de las suspensiones celulares se determinó con una sonda de temperatura con vaina de acero inoxidable y sensor NTC. Ambas medidas de temperatura se registraban en un procesador de datos AUTODIGIT (Geónica, S.A.).

II.C.25. Recolección de células en los cultivos al aire libre

Para recoger del medio las células cultivadas en grandes volúmenes se utilizó un sistema semicontinuo en dos fases. La primera consistió en llenar un decantador de 400 l de capacidad con la suspensión celular y, tras su decantación, se hizo retornar por gravedad el medio libre de células al estanque de cultivo. En una segunda fase, se concentró la masa celular haciendo que el decantado cayera sobre un filtro vibratorio SWECO modelo S1 S (Figura 13).



Figura 13. Filtro vibratorio centrifugador para la separación de las microalgas del medio de cultivo. La suspensión de células se concentra por decantación antes de proceder a su filtración.

II.D. REACTIVOS

Todos los ácidos empleados, acetaldehído, acetona, cloroformo, etanol, fenol, metanol, fructosa y glucosa se obtuvieron de MERCK. La acetanilida, ciclohexanona 2,4-dinitrofenilhidrazona, sulfanilamida y las cápsulas de estaño y plata para los análisis elementales se obtuvieron de CARLO ERBA. El ADN, ARN, azul de Coomassie, difenilamina, orcinol y seroalbúmina bovina procedieron de SIGMA.

Todos los demás compuestos fueron de grado analítico, bien de MERCK o de PANREAC.

Los gases hidrógeno, helio, acetileno, etileno, nitrógeno, oxígeno y aire fueron de la máxima pureza que suministra La Sociedad Española de Oxígeno.

III. RESULTADOS

III.A. CRECIMIENTO Y COMPOSICION DE DISTINTAS ESTIRPES DE CIANO-BACTERIAS FILAMENTOSAS FIJADORAS DE NITROGENO ATMOSFERICO

Como fase preliminar, y con objeto de seleccionar las cianobacterias filamentosas fijadoras de dinitrógeno más idóneas en lo que a productividad y composición se refiere, se han llevado a cabo a nivel de laboratorio, estudios de crecimiento, así como de composición molecular en distintas estirpes. En principio, las condiciones que un microorganismo debe reunir para que su cultivo a gran escala resulte de interés práctico son alto contenido en proteína y/o algún otro producto de interés económico, bajo contenido en ácidos nucleicos, y corto tiempo de generación -que se traduce en elevada productividad. Para los estudios que aquí se describen se utilizaron las siguientes seis estirpes de algas verde-azuladas fijadoras de dinitrógeno; Anabaena variabilis ATCC 29413, Anabaena ATCC 33047, Anabaena PCC 7119, Fischerella PCC 7520, Nostoc PCC 6719 y Nostoc paludosum.

En la elección de las estirpes se tuvo en cuenta la diversidad fisiológica que presentan respecto a ciertos parámetros, tales como temperatura de crecimiento, tolerancia a la salinidad y niveles de actividad fotosintética y de fijación de N_2 .

III.A.1. CINETICA DEL CRECIMIENTO

Para determinar la velocidad de crecimiento de las diferentes estirpes, los cultivos se llevaron a cabo, en frascos de Roux, manteniendo constante la irradiancia (40 W m^{-2}), la temperatura (30°C), la aireación y el suministro de CO_2 (2%, v/v, en aire). El crecimiento se estimó siguiendo, a lo largo del tiempo, la evolución de la densidad celular, tanto en clorofila como en peso seco, de las correspondientes suspensiones, tras inocular con una cantidad de células suficientes para alcanzar una densidad inicial de 1 a 2 mg de clorofila por litro, equivalente a 0,1-0,2 g de peso seco por litro (Figuras 14 y 15). En todos los casos y para una misma estirpe, el tiempo de generación estimado en base a clorofila resultó más corto que cuando se utilizaba como parámetro el peso seco. Sin embargo, desde un punto de vista comparativo, las diferencias entre las estirpes respecto al tiempo de generación se mantuvieron independientemente del parámetro considerado.

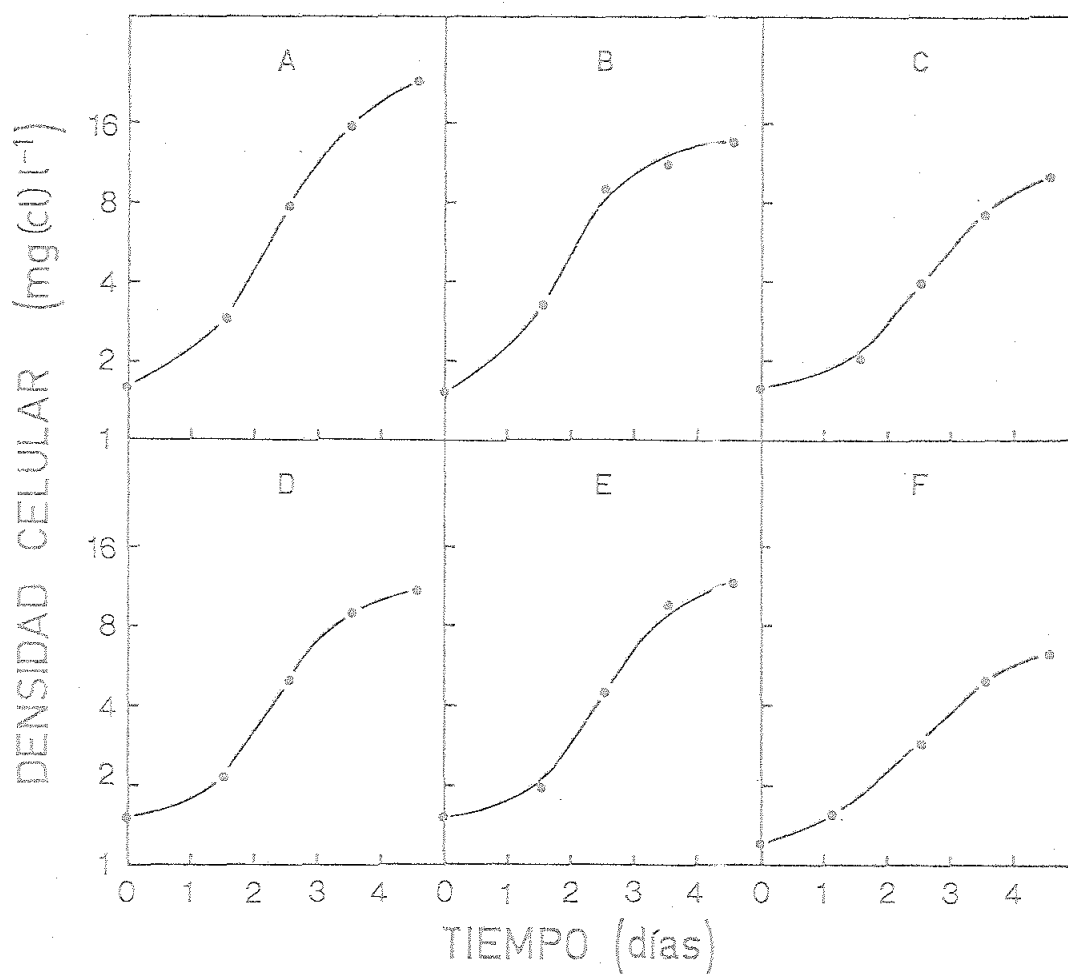


Figura 14. Crecimiento de varias estirpes de cianobacterias fijadoras de N_2 estimado en base a clorofila. Los cultivos se llevaron a cabo en frascos de Roux de 8 cm de profundidad conteniendo 2 litros de medio, cada uno de los cuales se inoculó con una de las estirpes a una concentración de 1 a 2 mg(cD) l⁻¹. La irradiancia fue de 40 W m⁻² y la temperatura de 30°C, burbujeándose los cultivos con aire suplementado en CO₂ al 2% (v/v) a un caudal de alrededor de 80 l por l de suspensión y hora. A los tiempos indicados se determinó la clorofila en alícuotas de los cultivos. Las estirpes empleadas fueron: *Anabaena variabilis* (A), *Anabaena* 33047 (B), *Anabaena* 7119 (C), *Nostoc* 6719 (D), *Nostoc paludosum* (E) y *Fischerella* 7520 (F).

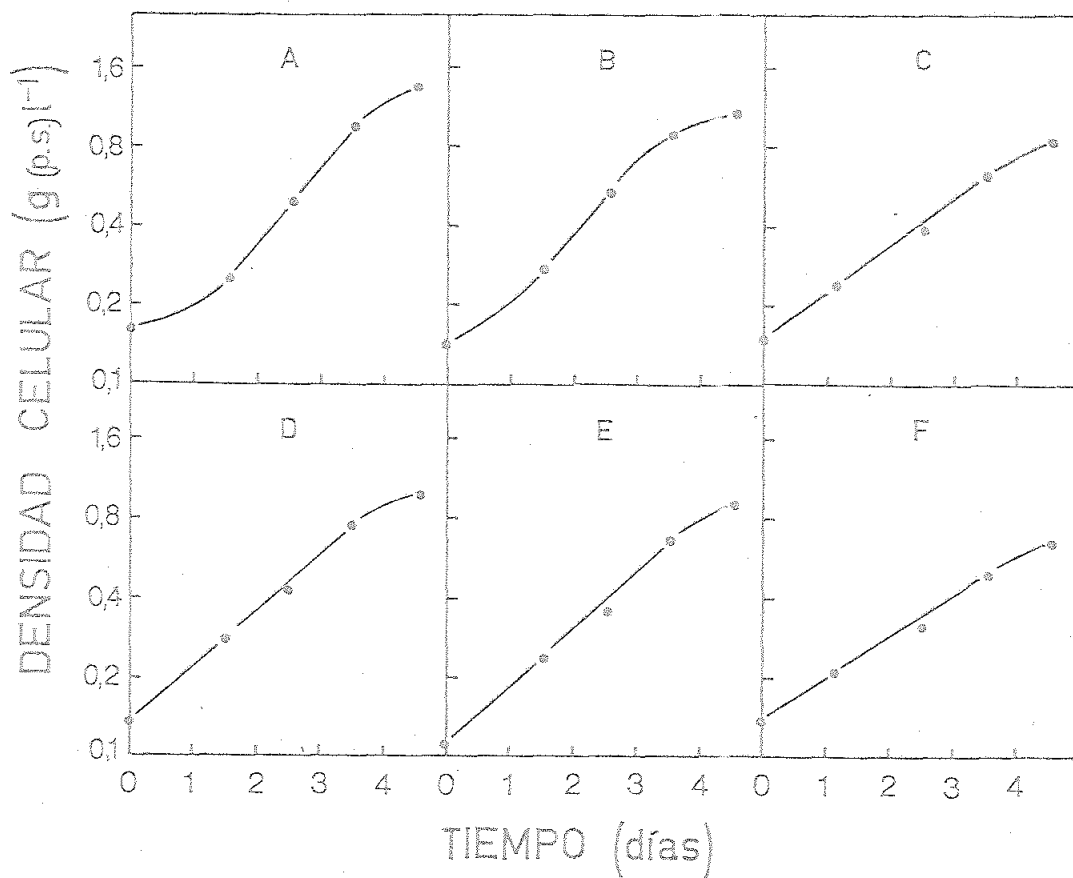


Figura 15. Crecimiento de varias estirpes de cianobacterias fijadoras de N_2 estimado en base a peso seco. Los cultivos se llevaron a cabo en frascos de Roux de 8 cm de profundidad conteniendo 2 litros de medio, cada uno de los cuales se inoculó con una de las estirpes a una concentración de 0,1 a 0,2 g(peso seco) l^{-1} . A los tiempos indicados se determinó el peso seco en alícuotas de los cultivos. Las estirpes utilizadas, así como las condiciones de cultivo, fueron las descritas en la Figura 14.

Resaltan los cortos tiempos de generación (25 h), determinados en base a peso seco en la fase exponencial, de Anabaena 33047 y A. variabilis, frente a los obtenidos para las otras estirpes. Nostoc paludosum y Nostoc 6719 presentaron tiempos de generación de alrededor de 33 h, mientras que Anabaena 7119 y Fischerella 7520, con tiempos de generación de 36 y 40 h, respectivamente, fueron, en las condiciones ensayadas, las estirpes de crecimiento más lento. Merece mencionarse que tanto A. variabilis como Anabaena 33047 alcanzaron mayor densidad celular en la fase exponencial tardía que el resto de las estirpes.

III.A.2. COMPOSICION MOLECULAR DE LAS CELULAS

Se ha analizado la composición molecular en proteínas, carbohidratos, lípidos, ARN y ADN, así como en clorofila de las diferentes cianobacterias empleadas, ya que la naturaleza de la biomasa fotosintetizada es uno de los criterios fundamentales para la elección de las estirpes idóneas. La Tabla II resume la composición de las distintas estirpes a lo largo de la fase exponencial de crecimiento.

A. variabilis presenta el más alto contenido en proteína neta, con un valor del 47% del peso seco, a la vez que el más bajo contenido en ácidos nucleicos, con un total del 10,4% del peso seco. Anabaena 33047 y Nostoc paludosum presentan alrededor del 40% de proteína neta, pero el contenido en ácidos nucleicos de esta última estirpe es más alto, alcanzando el 15%. Nostoc 6719 destaca por su elevado contenido en ácidos nucleicos, con un 14% de ARN y un 3,1% de ADN, lo que, en total, supone más del 17% del peso seco.

Para la generalidad de las estirpes, el contenido en carbohidratos oscila entre el 22% (A. variabilis) y el 28% (N. paludosum). Merece destacarse, sin embargo, el elevado nivel de carbohidratos (36,1%) que presenta Fischerella, en correspondencia con un bajo contenido en proteína. En relación a los lípidos, la estirpe más rica es Anabaena 7119, con un 11,5% del peso seco.

TABLA II

COMPOSICION MOLECULAR DE DISTINTAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS FIJADORAS DE NITROGENO

Estirpe	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	ARN	ADN	Clorofila
(% del peso seco)						
<u>A. variabilis</u>	47,2±1,1	22,3±2,5	10,5±1,1	8,2±1,0	2,2±0,7	1,6±0,1
<u>Anabaena</u> 33047	42,7±1,4	27,1±2,4	8,5±0,8	8,8±1,4	2,6±0,8	1,4±0,2
<u>Anabaena</u> 7119	38,1±0,8	27,7±1,4	11,5±1,6	11,5±0,9	3,8±0,3	1,1±0,1
<u>Nostoc</u> 6719	37,2±1,6	25,7±2,2	9,9±1,0	14,0±1,2	3,1±0,8	1,1±0,1
<u>Nostoc paludosum</u>	40,7±1,4	28,0±1,9	7,2±1,2	12,1±1,3	3,3±0,5	1,3±0,1
<u>Fischerella</u> 7520	30,4±2,1	36,1±3,0	7,6±2,0	12,7±2,3	3,6±0,8	0,9±0,2

Cada valor, con su respectiva desviación estándar, es la media de tres determinaciones independientes efectuadas a lo largo de la fase exponencial de crecimiento de los cultivos representados en la Figura 15.

III.A.3. PRODUCTIVIDAD

A partir de los datos de la cinética de crecimiento se ha estimado la productividad de las distintas estirpes (Tabla III). Como consecuencia de su menor tiempo de generación y de la mayor densidad que llega a alcanzar la suspensión celular en la fase exponencial del crecimiento, Anabaena variabilis y Anabaena 33047 presentan la más alta productividad, con valores de 0,64 y 0,56 g(peso seco) $l^{-1}día^{-1}$, respectivamente, que extrapolados equivalen a 52,0 y 45,5 g(peso seco) $m^{-2}día^{-1}$, teniendo en cuenta que se utilizaron frascos de 8 cm de espesor con una superficie iluminada de 123 cm^2 por litro de suspensión. Si a ello se añade que estas estirpes poseen el más alto contenido en proteína, resulta muy favorecida su productividad en este componente celular. Por el contrario, Fischerella presentó una productividad en peso seco 2,6 veces menor que A.variabilis, siendo la diferencia aún más destacable (3,9 veces inferior) en base a proteína. Por último, Anabaena 7119, Nostoc 6719 y Nostoc paludosum presentaron productividades en peso seco entre 0,3 y 0,4 g $l^{-1}día^{-1}$ y de alrededor de 0,13 g $l^{-1}día^{-1}$ en base a proteína.

III.A.4. EVOLUCION DE LA COMPOSICION ELEMENTAL Y MOLECULAR DE LAS CELULAS A LO LARGO DEL CRECIMIENTO

Estos estudios se llevaron a cabo con A.variabilis la estirpe de mayor productividad. Las células se cultivaron, a 30°C, en recipientes de 60 l de capacidad y 25 cm de profundidad, iluminados con 100 $W m^{-2}$, realizándose los análisis de composición elemental y molecular a lo largo del crecimiento.

En la Figura 16 se observa que la composición molecular de A.variabilis cultivada con N_2 como fuente de nitrógeno varía a lo largo del crecimiento. Destaca especialmente el aumento paulatino del contenido en proteína -desde 34% en la fase de aceleración hasta 52% en la fase de deceleración- frente a la disminución concomitante de carbohidratos, del 33% al 20%, respectivamente. También los lípidos y la clorofila aumentan, mientras que el contenido en ácidos nucleicos desciende apreciablemente. En efecto, mientras que el ARN y el ADN en fase de aceleración suponen el 12,6 y el 1,9% del peso seco, respectivamente, en fase de decelera

TABLA III

PRODUCTIVIDAD EN FASE EXPONENCIAL DE ALGUNAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS FIJADORAS DE NITROGENO

Estirpe	Tiempo de generación	μ	Densidad máxima	Productividad	
				Peso seco	Proteína
	(h)	(día ⁻¹)	(g(p.s.)l ⁻¹)	(g l ⁻¹ día ⁻¹)	
<u>A. variabilis</u>	24,9	0,67	0,96	0,64	0,30
<u>Anabaena</u> 33047	24,6	0,68	0,83	0,56	0,24
<u>Anabaena</u> 7119	35,9	0,46	0,69	0,32	0,12
<u>Nostoc</u> 6719	33,2	0,50	0,76	0,38	0,14
<u>Nostoc paludosum</u>	33,1	0,50	0,66	0,33	0,13
<u>Fischerella</u> 7520	39,9	0,42	0,60	0,25	0,08

La productividad en peso seco de cada estirpe se ha calculado multiplicando su velocidad específica de crecimiento por la densidad máxima que alcanza el cultivo en fase exponencial. A su vez, la productividad en proteína se ha obtenido multiplicando la productividad en peso seco de cada estirpe por su porcentaje medio en proteína (véase Tabla II). Día = 24 horas de iluminación.

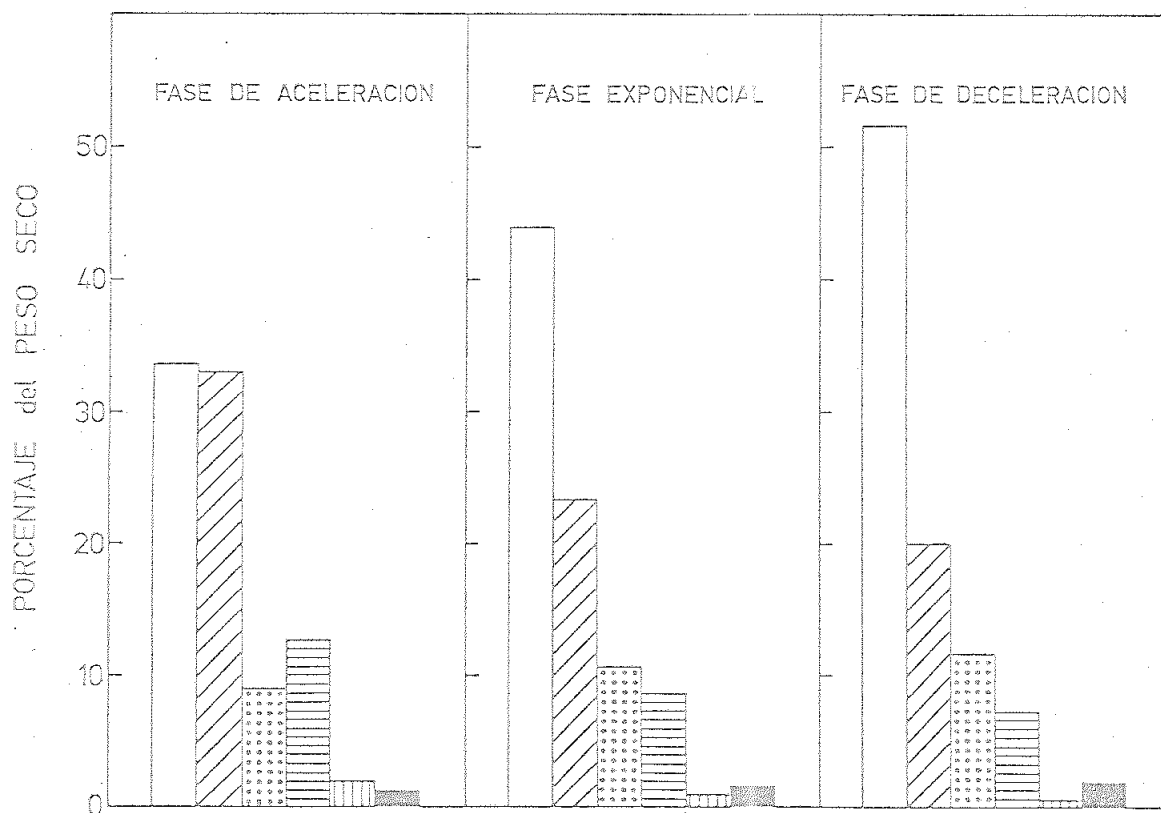


Figura 16. Composición molecular de las células de *A. variabilis* en diferentes fases del crecimiento. El experimento se llevó a cabo en un recipiente de 60 l de capacidad, con una profundidad de 25 cm, iluminándose verticalmente su superficie libre ($0,25 \text{ m}^2$) con luz blanca de 100 W m^{-2} . La temperatura fue de 30°C , burbujeándose aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v) a través de la suspensión celular a un caudal de $60 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$. Durante las fases de aceleración (2 muestras), exponencial (3 muestras) y de deceleración (3 muestras) se determinó el porcentaje de cada componente respecto al peso seco. Proteínas, blanco; carbohidratos, rayas oblicuas; lípidos, puntos; ARN, rayas horizontales; ADN, rayas verticales; clorofila, negro.

ción sólo alcanzan el 7,3 y el 0,5%, lo que implica, en conjunto, una disminución del contenido en ácidos nucleicos del 14,5 al 7,8%.

En relación con la composición elemental es de destacar el aumento en el contenido de carbono, nitrógeno e hidrógeno y la disminución concomitante del contenido en oxígeno (Figura 17). La razón C/N disminuye ligeramente, estabilizándose en un valor al rededor de 4,4.

En la Tabla IV se presenta la fórmula elemental de la biomasa de A. variabilis en las tres fases del cultivo investigadas. Resulta evidente que la contribución del oxígeno va siendo progresivamente menor, lo que denota un incremento en el grado de reducción de la biomasa. La evolución de este parámetro para la biomasa de A. variabilis se muestra en la misma Tabla, presentando valores entre 4 y 5, lo que corresponde a un compuesto ligeramente más reducido que un azúcar de fórmula (CH_2O) . El calor de combustión de la biomasa aumenta a lo largo del crecimiento, en correspondencia con el incremento del grado de reducción y oscila entre 4,3 y 5,5 kcal g^{-1} (peso seco) (Tabla IV).

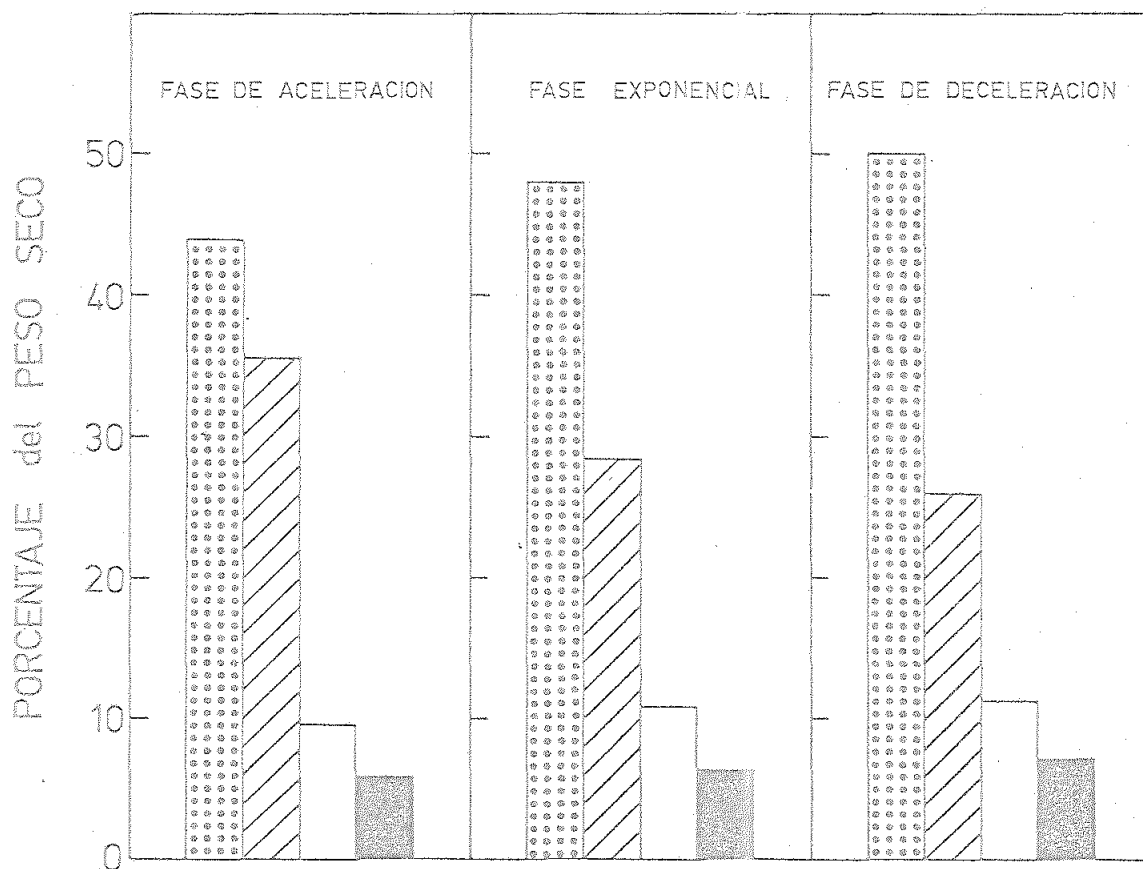


Figura 17. Composición elemental de las células de *A. variabilis* en diferentes fases del crecimiento. Estos datos corresponden al experimento que se describe en la Figura 16, habiéndose determinado la composición elemental de las células en cada fase. Carbono, puntos; oxígeno, rayas oblicuas; nitrógeno, blanco; hidrógeno, negro.

TABLA IV

FORMULA EMPIRICA, GRADO DE REDUCCION Y CALOR DE COMBUSTION DE LA BIOMASA DE A. variabilis EN
DIFERENTES FASES DE CRECIMIENTO

<u>Parámetro</u>	<u>Fase de crecimiento</u>		
	aceleración	exponencial	deceleración
Fórmula empírica	$C_{5,44}H_{8,64}O_{3,31}N$	$C_{5,21}H_{8,51}O_{2,32}N$	$C_{5,16}H_{8,67}O_{2,0}N$
Grado de reducción	4,37	4,74	4,91
Calor de combustión (kcal g ⁻¹ (p.s.))	4,31	5,10	5,52

Los valores se han obtenido a partir de los datos de la Figura 17, habiéndose calculado el grado de reducción y el calor de combustión según se describe en los apartados II.C.18 y 19.

III.B. EFFECTO DE DISTINTOS FACTORES SOBRE EL CRECIMIENTO, ACTIVIDAD FIJADORA DE NITROGENO Y COMPOSICION DE *Anabaena variabilis*

III.B.1. EVOLUCION DE LAS ACTIVIDADES FOTOSINTETICA Y DE FIJACION DE N_2 A LO LARGO DEL CRECIMIENTO

En la Figura 18 se presenta una curva de crecimiento típica de *A. variabilis* junto a la evolución con el tiempo de las actividades fotosintética -medida como desprendimiento de O_2 - y de fijación de N_2 . En la fase de aceleración se aprecia el aumento gradual de ambas actividades fisiológicas. A continuación, y coincidiendo con el comienzo de la fase exponencial, la actividad fotosintética tiende a estabilizarse, mientras que la actividad de fijación de N_2 prosigue aún su aumento, hasta mediada la fase exponencial, en que ambas actividades comienzan a descender. Cuando el cultivo entra en fase de deceleración, tanto la actividad fotosintética como la de fijación de N_2 , muestran un comportamiento similar, si bien ésta última se ve más afectada en su descenso.

La disminución en la actividad nitrogenasa que experimentan las células una vez superadas las fases de aceleración y exponencial es un fenómeno bien patente. Como muestra la Figura 19, la actividad nitrogenasa de un cultivo irradiado con 350 W m^{-2} experimenta, tras una fuerte subida inicial, un apreciable descenso, en tanto prosigue el crecimiento celular. No obstante, si cuando la suspensión celular alcanza una alta densidad se remueve parte de las células del cultivo, de manera que éste se diluya hasta 1 mg de clorofila por litro, la actividad nitrogenasa aumenta en respuesta a la dilución, alcanzando de nuevo su máxima actividad hacia el final de la fase exponencial y descendiendo posteriormente a su nivel inicial. El fenómeno vuelve a repetirse al diluir el cultivo por segunda vez consecutiva. Estos resultados indican que la disminución de actividad fijadora de N_2 no se debe a la acumulación de algún inhibidor en el medio, sino al incremento de densidad del cultivo, que, muy probablemente, por efecto de ensombrecimiento, reduce la luz disponible para cada célula.

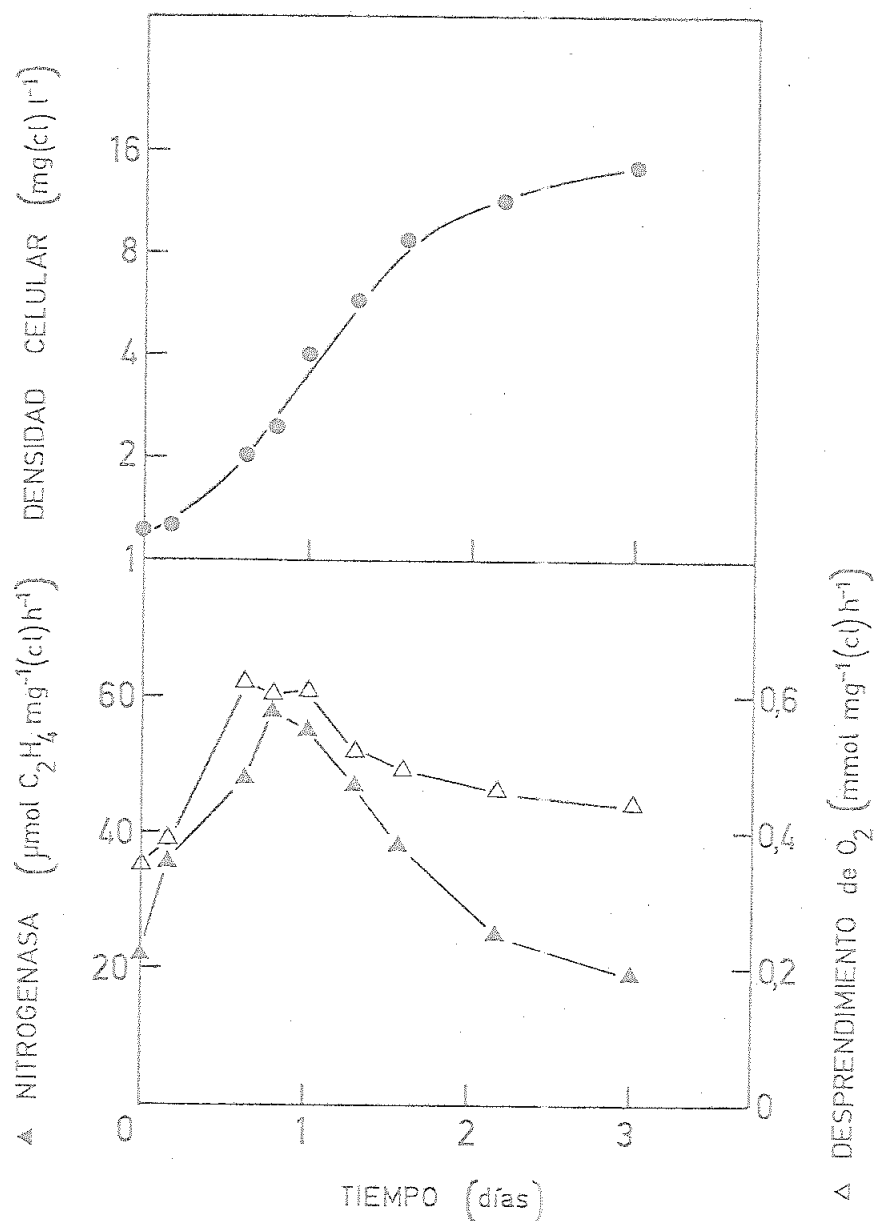


Figura 18. Evolución con el crecimiento de las actividades fotosintética y de fijación de N_2 de *A. variabilis*. El cultivo se llevó a cabo en un frasco de Roux de 5 cm de profundidad conteniendo 800 ml de suspensión celular por la que se burbujeaba aire enriquecido en CO_2 al 2%. La irradiancia fue de 50 W m^{-2} y la temperatura de 30°C . A los tiempos indicados se determinó la densidad celular del cultivo y se ensayaron sus actividades fotosintética y de fijación de N_2 .

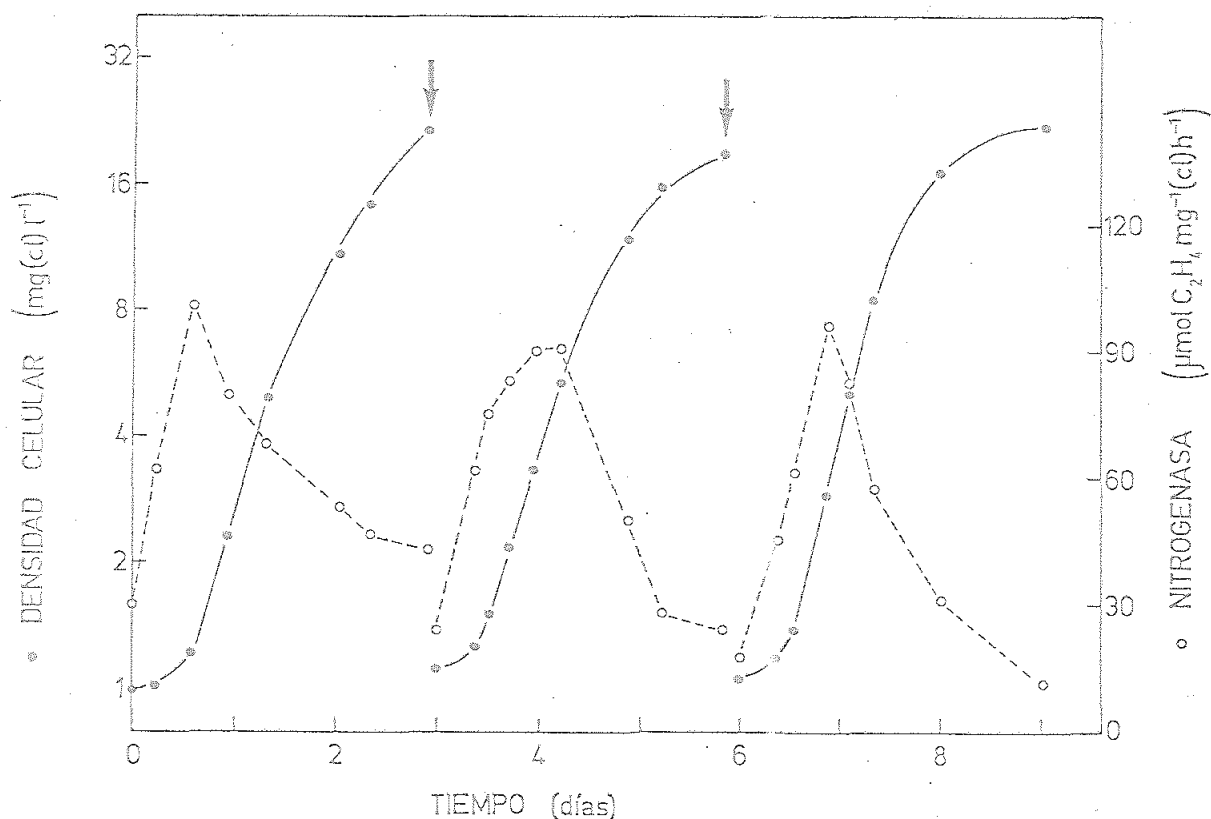


Figura 19. Recuperación de la actividad de fijación de N_2 en células de *A. variabilis* tras la dilución del cultivo. El experimento se llevó a cabo en un frasco de Roux de 0,8 l y 5 cm de profundidad, burbujeando aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v) a través de la suspensión celular. La irradiancia fue de 350 W m^{-2} y la temperatura de 30°C . A los tiempos indicados por las flechas se centrifugó la suspensión celular y se resuspendió una fracción del precipitado de células en el propio medio sobrenadante, a fin de que la nueva suspensión celular tuviera una concentración de clorofila próxima a la de la suspensión inicial (1 mg l^{-1}).

En relación con la actividad nitrogenasa es interesante resaltar la correspondencia existente a lo largo del crecimiento entre la actividad de fijación de N_2 -estimada como la capacidad de reducción de acetileno a etileno por las células- y la medida real de fijación de nitrógeno -estimada como la capacidad de incorporación de nitrógeno por el cultivo. La Figura 20 muestra la estrecha correlación existente entre ambos parámetros, que evolucionan paralelamente a lo largo del tiempo, siendo la velocidad de reducción de acetileno (2e) del orden de 3 veces mayor que la de asimilación de nitrógeno (6e).

III.B.2. EFECTO DE LA NUTRICION CARBONADA

III.B.2.1. Efecto de diferentes fuentes de carbono

A.variabilis puede crecer fotoautotróficamente utilizando carbono inorgánico, o fotoheterotróficamente, empleando formas orgánicas de carbono, tales como fructosa o sacarosa.

Para establecer la posibilidad de conseguir un crecimiento satisfactorio sin aporte adicional de CO_2 se realizaron sendos cultivos de A.variabilis a baja irradiancia, burbujeándose en un caso sólo aire, y en otro aire enriquecido con CO_2 al 2% (v/v). La Figura 21 muestra que el crecimiento de ambos cultivos en la fase exponencial fue similar, con tiempos de generación entre 9 y 10 horas. No obstante, el cultivo burbujeado con aire enriquecido en CO_2 exhibió una fase exponencial más prolongada y alcanzó mayor densidad celular. La actividad de fijación de N_2 presentó en ambos cultivos un máximo entre el inicio y la mitad de la fase exponencial. Sin embargo, el aporte adicional de CO_2 se tradujo en un nivel más alto de actividad nitrogenasa ($63 \mu\text{mol } C_2H_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl}) \text{ h}^{-1}$ frente a 47 en el cultivo burbujeado sólo con aire).

A baja irradiancia ($20-50 \text{ W m}^{-2}$), la velocidad de crecimiento no se afecta apreciablemente por la naturaleza de la fuente de carbono. Así, los tiempos de generación oscilan alrededor de 9 horas, tanto cuando los cultivos se burbujean sólo con aire, como cuando se suplementan con CO_2 , HCO_3^- o ambos, incluso si se añade fructosa al medio de cultivo (datos no presentados).

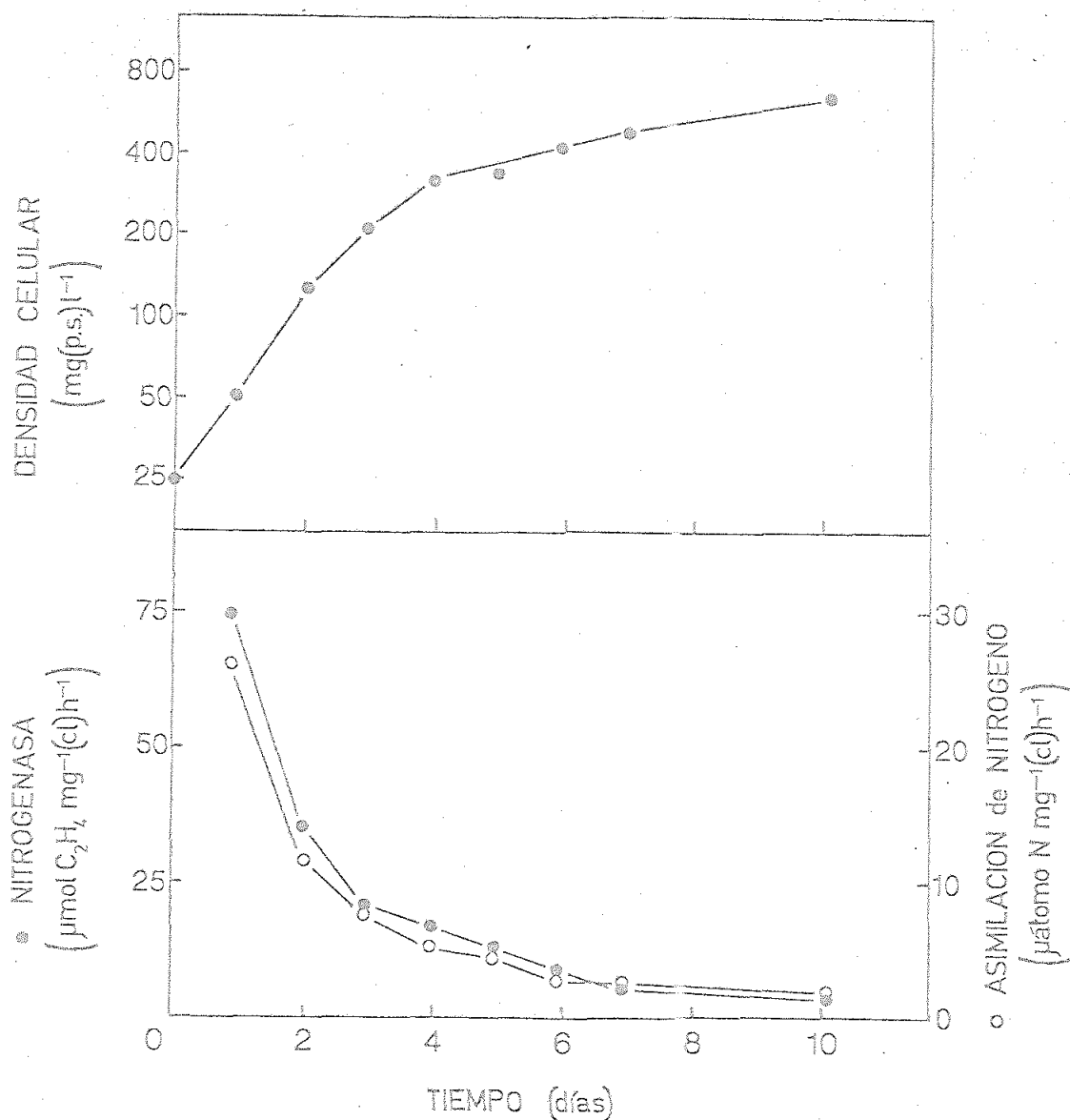


Figura 20. Correlación entre la actividad nitrogenasa y la de incorporación de nitrógeno por las células de *A. variabilis* a lo largo del crecimiento. El experimento se llevó a cabo en un recipiente cúbico de 60 l de capacidad y 25 cm de profundidad, cuya superficie libre de 0,25 m² se iluminó con luz blanca de 300 W m⁻². La temperatura de cultivo se mantuvo a 33-35°C, burbujeándose a través de la suspensión celular aire enriquecido con CO₂ al 2% (v/v). A los tiempos indicados se determinaron la concentración de clorofila y el peso seco, a la par que se analizó el contenido en nitrógeno elemental de las células y se ensayó su actividad nitrogenasa. La actividad de incorporación de nitrógeno se calculó a partir del incremento en nitrógeno del cultivo.

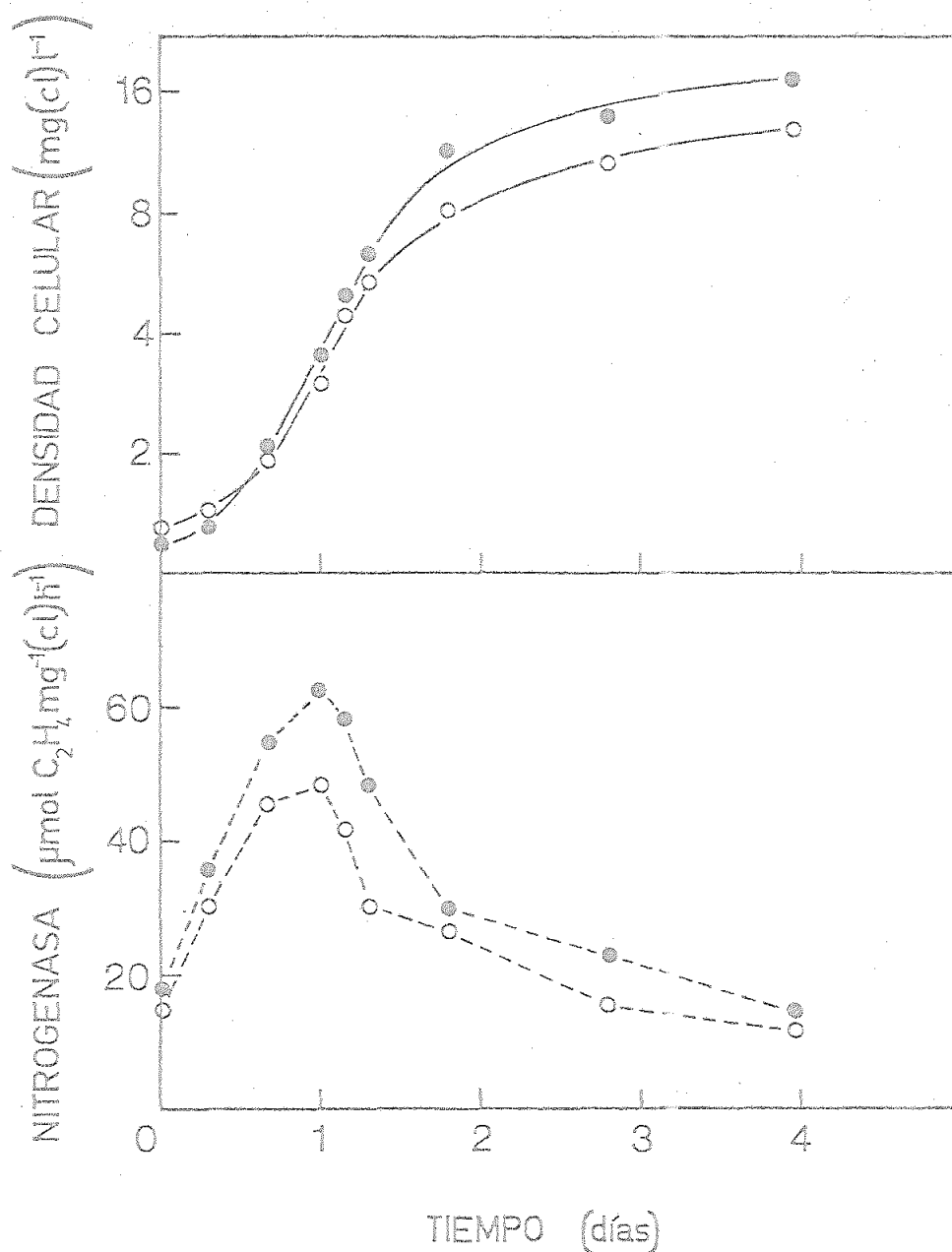


Figura 21. Efecto del aporte adicional de CO₂ sobre el crecimiento y la actividad de fijación de N₂ de *A. variabilis* cultivada a baja irradiancia. Los cultivos se llevaron a cabo paralelamente en dos frascos de Roux de 0,8 l de capacidad y 5 cm de profundidad. La temperatura fue de 30°C, y la irradiancia de 50 W m⁻². A los tiempos indicados se determinó la concentración de clorofila y se ensayó la actividad nitrogenasa. Los círculos negros corresponden al cultivo burbujeado con aire enriquecido en CO₂ al 2% (v/v), y los blancos al cultivo burbujeado sólo con aire. El caudal de aire fue de 90 l l⁻¹h⁻¹.

A altos valores de irradiancia (200 W m^{-2}), las células burbujeadas con sólo aire muestran un tiempo de generación de 9,3 horas, similar al obtenido a baja irradiancia, si bien la actividad de fijación de N_2 sube hasta $67 \text{ } \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$, nivel mayor que el observado a baja irradiancia (Figura 22 A). En las mismas condiciones de irradiancia, las células cultivadas con aire enriquecido en CO_2 presentan un tiempo de generación de 7,9 horas, sensiblemente menor que el que exhiben a baja irradiancia, alcanzando, por otro lado, la actividad de fijación de N_2 niveles de hasta $97 \text{ } \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$ (Figura 22 B).

Estos resultados parecen indicar que a alta irradiancia el factor limitante del crecimiento no es la luz, sino la disponibilidad de carbono, por lo que las células cultivadas con aire crecen más lentamente que aquellas a las que se les aporta carbono inorgánico adicional. Esta conclusión se ve apoyada por el hecho de que, cuando se cultiva A. variabilis a alta irradiancia (200 W m^{-2}) con aire y fructosa 10 mM, el tiempo de generación es de 7,9 horas, similar al que exhibe el cultivo suplementado con CO_2 . Además, en estas condiciones, la actividad de fijación de N_2 mantiene un alto nivel, próximo a $90 \text{ } \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$, iniciando un drástico descenso al irse agotando la fructosa del medio de cultivo (Figura 22 C).

III.B.2.2. Relación entre el contenido en carbohidratos y la actividad fijadora de N_2

Los resultados presentados anteriormente demuestran que la actividad fijadora de N_2 a lo largo del crecimiento exhibe dos fases, una ascendente, hasta llegar a un máximo, y otra posterior descendente, más o menos pronunciada. En la Figura 23 se observa que la actividad nitrogenasa se correlaciona con el nivel intracelular de carbohidratos, tanto en cultivos con aire suplementado con CO_2 como en cultivos con aire y fructosa añadida. También puede observarse que el cultivo suplementado con fructosa mantiene niveles más altos de actividad nitrogenasa. Todo ello parece indicar que la reserva de carbohidratos de las células juega un papel importante en el establecimiento del nivel de la actividad fijadora de N_2 .

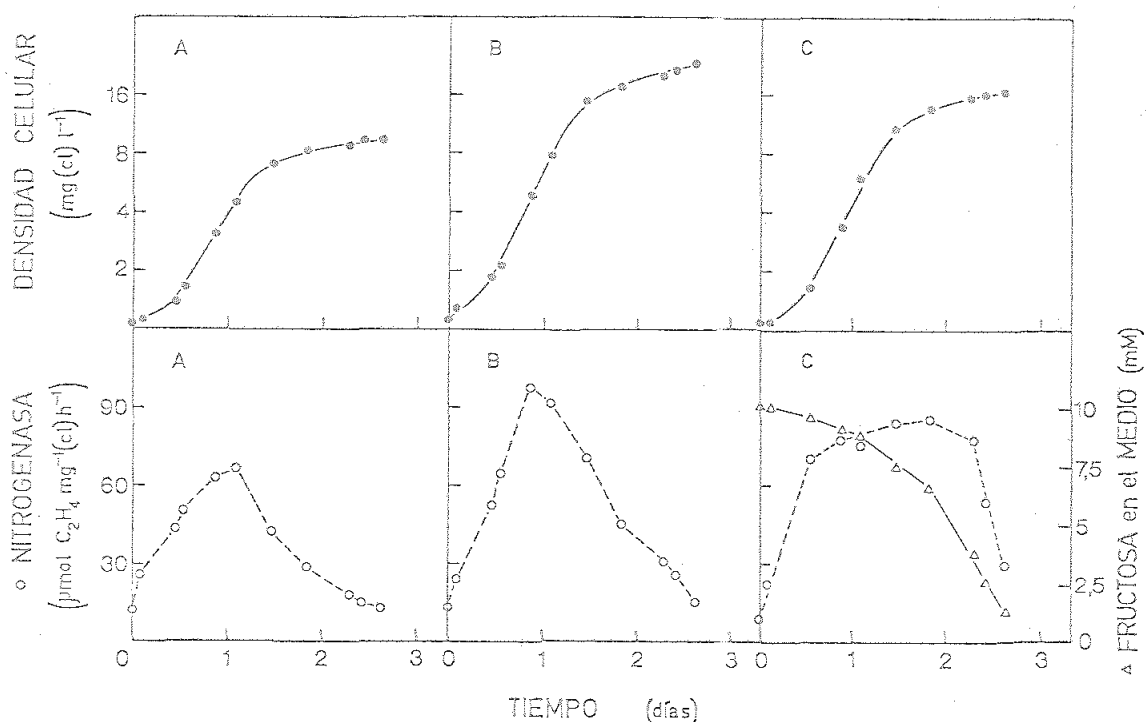


Figura 22. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la actividad nitrogenasa de *A. variabilis* cultivada a alta irradiancia. Los cultivos se llevaron a cabo, paralelamente, a 30°C, en frascos de Roux de 0,8 l de capacidad y 5 cm de profundidad sometidos a una irradiancia de 200 W m^{-2} . A, células cultivadas sólo con aire. B, células cultivadas con aire enriquecido en CO_2 al 2%(v/v). C, células cultivadas con aire en un medio suplementado con fructosa a una concentración inicial de 10 mM. A los tiempos indicados se determinó la densidad celular de los cultivos y se ensayó su actividad nitrogenasa, midiéndose la fructosa en el medio después de separar las células. El caudal fue de $90 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

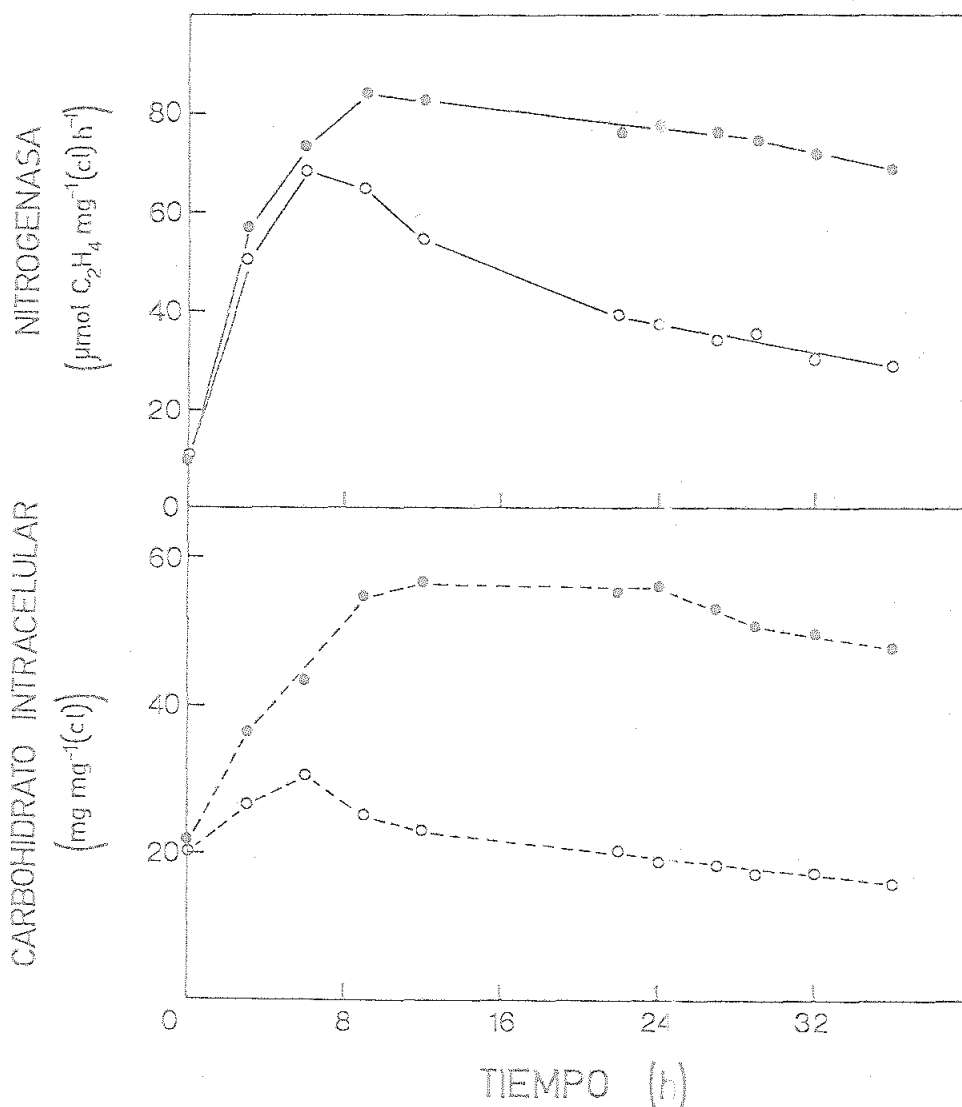


Figura 23. Paralelismo entre la actividad fijadora de N_2 y el nivel intracelular de carbohidratos en *A. variabilis*. El experimento se llevó a cabo, paralelamente, a 30°C , en dos frascos de Roux de 5 cm de profundidad y 0,8 l de capacidad sometidos a una irradiancia de 50 W m^{-2} . A los tiempos indicados se ensayó la actividad nitrogenasa de las células y se determinó, por duplicado, su contenido en clorofila y carbohidratos. Los círculos negros corresponden a un cultivo con fructosa a una concentración inicial de 10 mM burbujeado con aire, y los blancos a un cultivo burbujeado con aire enriquecido con CO_2 al 2% (v/v).

III.B.2.3. Composición molecular de células cultivadas con aire o aire enriquecido en CO₂

Se ha analizado la composición molecular de las células de A. variabilis cultivadas con aire o aire suplementado con CO₂. En la Tabla V se presentan los resultados correspondientes a la fase de deceleración del crecimiento. Las células cultivadas con aire contienen 53,6% de proteína neta respecto al peso seco, frente a 56,4% las cultivadas con aire enriquecido en CO₂. Por otra parte, no hay apenas diferencia en el nivel de carbohidratos, que se sitúa en ambos casos alrededor del 17% del peso seco. En cuanto a los demás componentes, tampoco hay disparidad significativa, con valores medios del 7% para lípidos, 12% para ácidos nucleicos, 2% para clorofila y 0,4% para carotenoides.

TABLA V

COMPOSICION MOLECULAR DE A. variabilis CULTIVADA CON AIRE O AIRE SUPLEMENTADO CON CO₂

Componente	Porcentaje del peso seco	
	aire	aire, CO ₂ (2% v/v)
PROTEINA TOTAL	53,6±1,4	56,4±2,2
Ficobiliproteínas	13,6±0,5	14,7±0,8
CARBOHIDRATOS	17,8±1,3	17,0±0,6
LIPIDOS	7,7±0,4	7,2±0,1
ACIDOS NUCLEICOS ^a	11,7	11,9
ARN	10,8±0,6	11,1±0,7
ADN	0,9±0,1	0,8±0,2
CLOROFILA	1,7±0,1	1,9±0,2
CAROTENOIDES	0,4±0,1	0,4±0,1

El cultivo de las células se llevó a cabo, a 30°C, en recipientes de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro bajo una irradiancia de 50 W m⁻². Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son las medias de dos experimentos independientes con determinaciones por duplicado en cada caso. Los análisis corresponden a muestras tomadas en la fase de deceleración de cada cultivo.

^aValor calculado por la suma del contenido en ARN y ADN.

III.B.3. EFECTO DE LA ILUMINACION

Uno de los factores con mayor incidencia sobre el crecimiento de un cultivo de microalgas es el grado de iluminación al que se encuentra sometido. En efecto, el nivel de irradiancia no sólo afecta a la actividad fijadora de N_2 y a la velocidad específica de crecimiento, sino incluso a la composición de las algas. A continuación se presentan una serie de resultados obtenidos en diferentes condiciones de iluminación así como con diversas fuentes de carbono.

III.B.3.1. Efecto de la irradiancia sobre el crecimiento y la actividad fijadora de N_2

La irradiancia a que se ven sometidos los cultivos, viene impuesta por las condiciones ambientales externas y especialmente por los ciclos diurnos y la época del año, sin que pueda modificarse fácilmente, como es el caso para otros parámetros, tales como la composición del medio, el pH, o incluso la temperatura.

En la Figura 24 se representa el efecto de la irradiancia sobre el tiempo de generación en la fase exponencial de una serie de cultivos de A. variabilis. Puede observarse que la relación entre ambos parámetros es inversa, de forma que el tiempo de generación disminuye asintóticamente, acercándose a 6 h, conforme aumenta la irradiancia desde 10 hasta 350 W m^{-2} . En la Figura 24 puede verse también que el nivel máximo de actividad nitrogenasa aumenta conforme lo hace la irradiancia a que se somete el cultivo, presentando dos fases lineales con diferente pendiente, una más pronunciada de 10 a 100 W m^{-2} , y otra más suave de 100 a 300 W m^{-2} , correspondiendo el valor máximo de actividad nitrogenasa, alrededor de $105 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl}) \text{ h}^{-1}$, a las irradiancias más altas.

La correspondencia existente entre la actividad nitrogenasa y el crecimiento a distintas irradiancias se hace aún más patente cuando los resultados se representan como en la Figura 25, donde se pone de manifiesto una estrecha correlación lineal entre la actividad fijadora de N_2 y la velocidad específica de crecimiento, que se relaciona inversamente con el tiempo de generación.

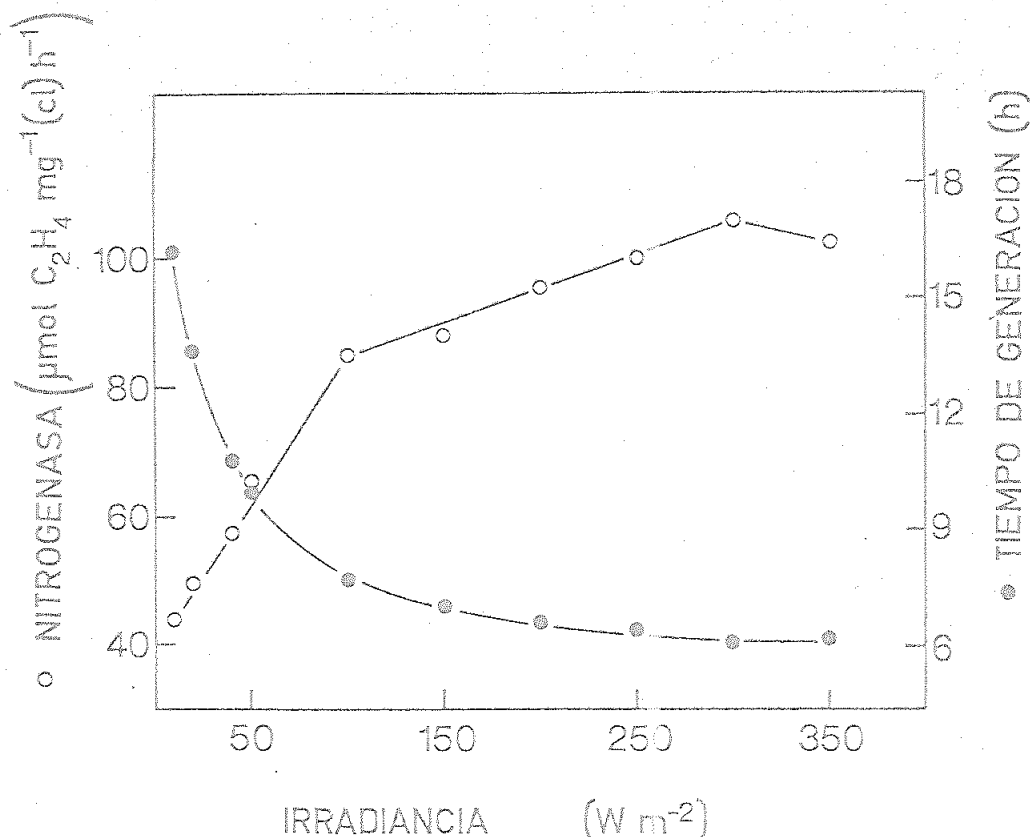


Figura 24. Efecto de la irradiancia sobre la actividad específica de fijación de N_2 y el tiempo de generación de *A. variabilis*. El experimento se llevó a cabo, a 35°C , en recipientes cilíndricos de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro, a través de los cuales se burbujeaba aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v). Los medios de cultivo se inocularon a 1,5 mg de clorofila por litro y se situaron a las distancias requeridas de un panel de 5 lámparas OSRAM Concentra de 150 W cada una, para conseguir la gama de irradiancia. El tiempo de generación corresponde a la fase exponencial de crecimiento, en base a clorofila, en tanto que la actividad nitrogenasa representa el valor máximo alcanzado en cada cultivo. Por razones de limitación de espacio los experimentos se realizaron en dos tandas de cinco recipientes sometidos a irradiancias de 10, 40, 100, 200 y 300 W m^{-2} y de 20, 50, 150, 250 y 350 W m^{-2} , siendo los valores mostrados las medias de dos experimentos independientes. Las células utilizadas como inóculo procedían en todos los casos de un cultivo en fase exponencial de *A. variabilis*, creciendo a 35°C , con una iluminación de 50 W m^{-2} , por el que se burbujeaba aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v).

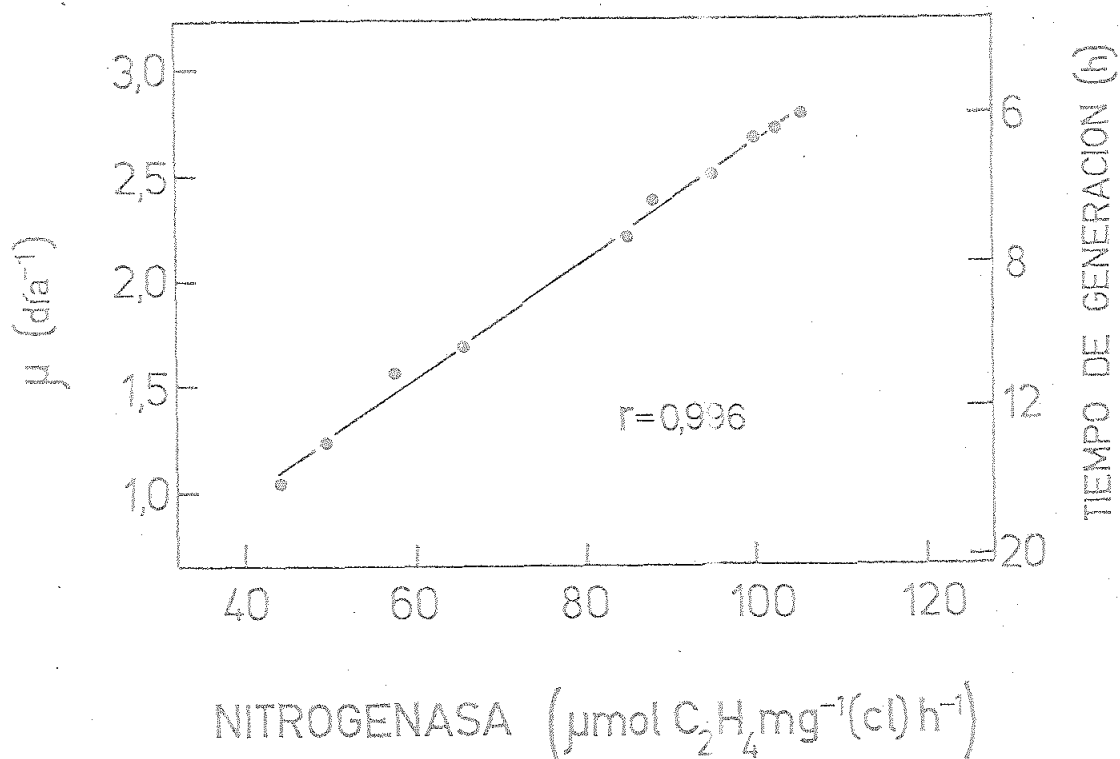


Figura 25. Relación entre velocidad específica de crecimiento y actividad fijadora de N_2 en *A. variabilis*. Las velocidades específicas de crecimiento -calculadas a partir de los respectivos tiempos de generación- y los niveles de actividad fijadora de N_2 corresponden al experimento descrito en la Figura 24.

La influencia de la irradiancia sobre la velocidad específica de crecimiento se ha estudiado en este caso partiendo de inóculos de alrededor de 1 mg de clorofila por litro de suspensión que se iluminaban con distintas intensidades de luz. Un abordaje diferente para estudiar el mismo fenómeno consiste en mantener constante la irradiancia y variar la densidad inicial del inóculo, de modo que, conforme aumenta ésta, las células se hagan más sombra entre sí, y se produzca un efecto similar al observado iluminando con menor irradiancia. Este distinto enfoque reveló que al aumentar la densidad inicial del inóculo, disminuían igualmente tanto la velocidad de crecimiento como la actividad fijadora de N_2 (datos no mostrados).

Como ya se ha comentado, la actividad específica de fijación de N_2 inicia un descenso hacia el comienzo o mitad de la fase exponencial. Este comportamiento general puede atribuirse, entre otras causas, a la menor cantidad de luz de que disponen las células a medida que el cultivo se va haciendo más denso. En la Figura 26 se presenta la evolución de la fase descendente de la actividad específica de fijación de N_2 durante la fase exponencial de crecimiento de un cultivo de A. variabilis irradiado con luz blanca de 40 W m^{-2} . Si en dicha fase se somete parte de la suspensión celular a una irradiancia de 100 W m^{-2} , en tanto se mantiene la otra mitad de la suspensión a la irradiancia inicial de 40 W m^{-2} , se observa que la actividad nitrogenasa del cultivo que recibe mayor irradiancia aumenta significativamente, mientras que la del control sigue perdiendo actividad. Al cabo de unas 8 horas de tratamiento, también la actividad del cultivo sometido a alta irradiancia comienza a descender.

III.B.3.2. Pérdida de la actividad fijadora de N_2 en la oscuridad y efecto de la fuente de carbono

La transferencia de un cultivo de A. variabilis, creciendo en la luz con aire enriquecido en CO_2 , a la oscuridad se traduce en la disminución de la actividad nitrogenasa, primero con rapidez y luego más lentamente, de modo que transcurridas 4 horas la actividad se reduce a un 25% de la inicial (Figura 27). Cuando el cultivo retorna a la luz, la actividad fijadora de N_2 se recupera rápidamente, alcanzando el nivel inicial tras aproximadamente 3 horas de iluminación.

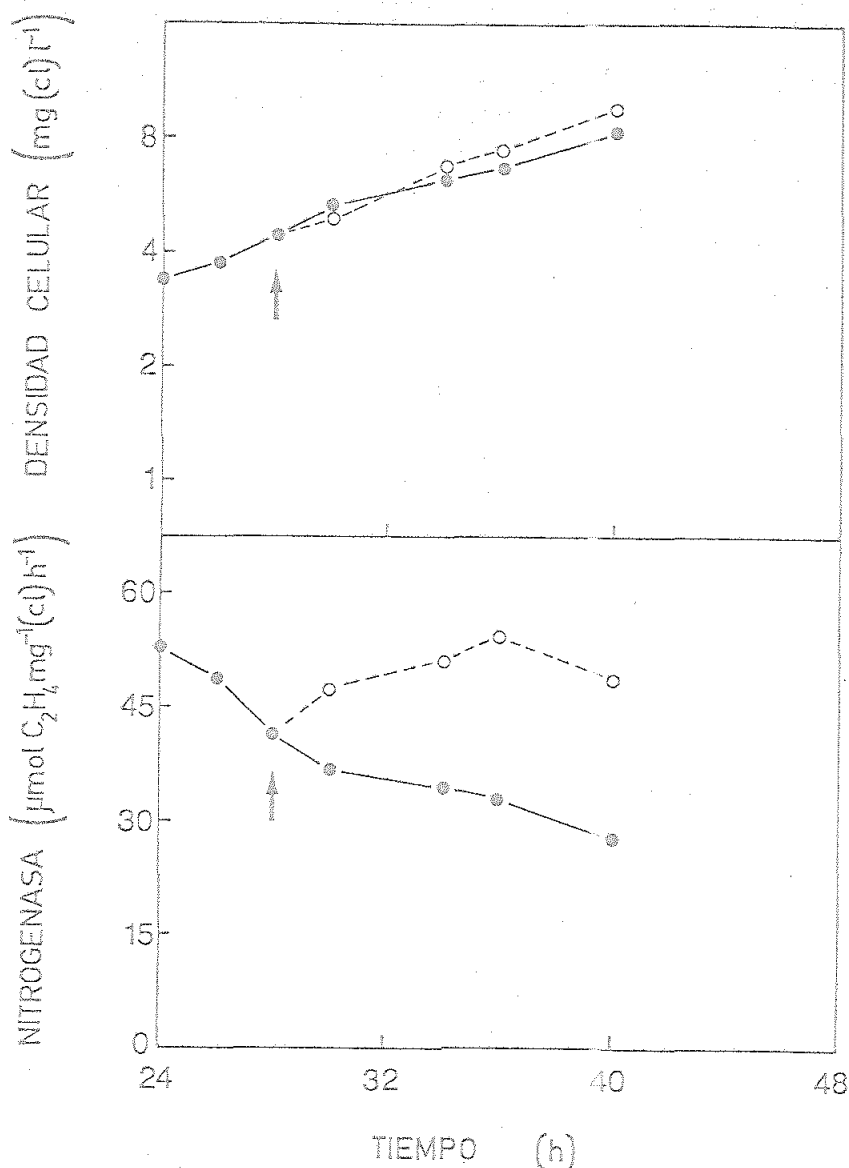


Figura 26. Efecto de la irradiancia sobre la evolución de la actividad de fijación de N_2 en células de *A. variabilis*. El experimento se llevó a cabo, a 30°C , en frascos de Roux de 0,8 l de capacidad y 5 cm de profundidad, burbujeando aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v) a través de las suspensiones celulares. El cultivo original, conteniendo 1 mg de clorofila por litro, se sometió primeramente a una irradiancia de 40 W m^{-2} (círculos negros). Al cabo de 28 horas después de la inoculación (flechas), - cuando la actividad específica de nitrogenasa del cultivo había iniciado ya el descenso- se trasvasó la mitad de la suspensión celular a otro frasco de Roux idéntico y se irradió con luz de igual espectro pero de 100 W m^{-2} (círculos blancos). A los tiempos indicados se determinó la concentración de clorofila y se ensayó la actividad fijadora de N_2 .

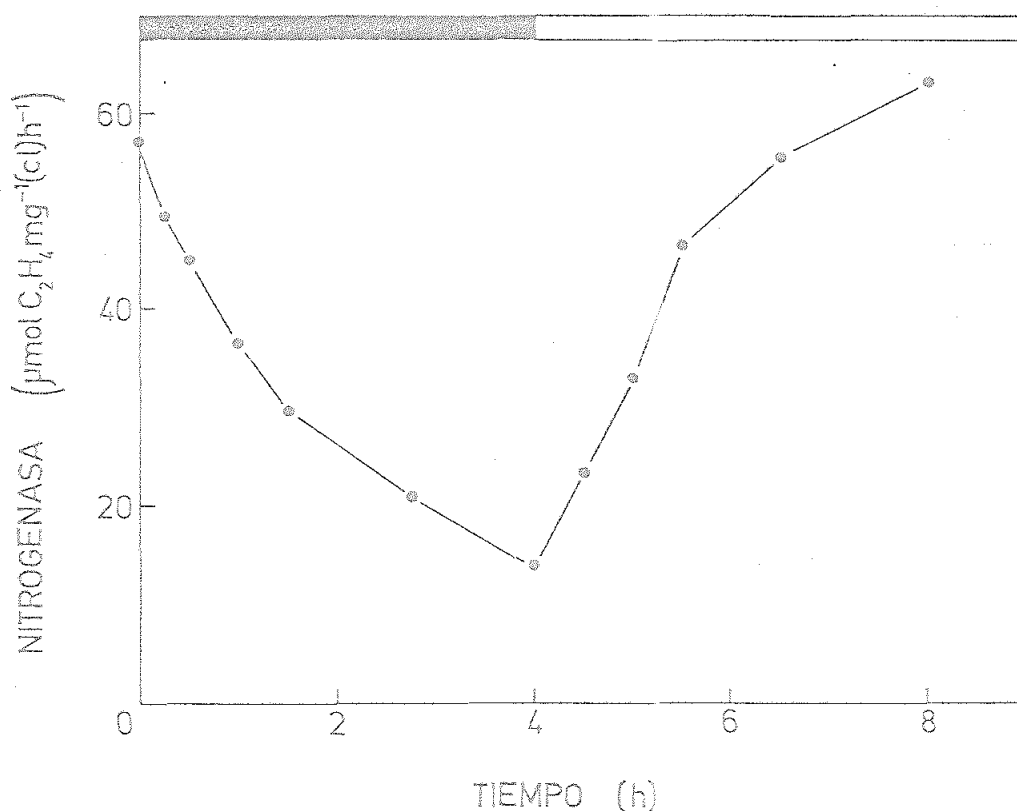


Figura 27. Pérdida de la actividad fijadora de N₂ de A. variabilis en la oscuridad. Un cultivo contenido en un recipiente cilíndrico de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro, a una temperatura de 30°C, e irradiado con luz blanca de 40 W m⁻² y burbujeado con aire enriquecido en CO₂ al 2% (v/v), se cubrió con papel de aluminio a tiempo cero para mantenerlo en oscuridad. Al cabo de cuatro horas, se volvió a iluminar el cultivo con 40 W m⁻². A los tiempos indicados se determinó la clorofila y se ensayó la actividad fijadora de N₂.

Este comportamiento, aunque general, varía según la fuente carbonada disponible y según la fase, ascendente o descendente, en que se encuentre la actividad nitrogenasa. Si la actividad fijadora de nitrógeno está en fase ascendente su nivel disminuye ostensiblemente al pasar a la oscuridad, reduciéndose al 30% del valor inicial, cuando las células se cultivan con aire o con aire y bicarbonato sódico en el medio de cultivo. La actividad fijadora de N_2 de las células cultivadas con aire enriquecido en CO_2 se afecta menos al privarlas de la luz y, aunque también disminuye, sólo baja al 75% del valor inicial. Por último, la actividad nitrogenasa de las células cultivadas en presencia de fructosa no se afecta durante la fase de oscuridad, manteniendo prácticamente constante su nivel. En todos los casos, cuando volvieron a iluminarse los cultivos, la actividad nitrogenasa se recuperó, superando incluso los niveles iniciales (Figura 28).

Interesa subrayar que, cuando la transferencia a la oscuridad se realiza con células cuya actividad nitrogenasa se encuentra ya en fase descendente, el efecto es aún más marcado, ya que sólo mantiene su nivel de actividad inicial las células cultivadas con fructosa; en las restantes, de crecimiento fotoautotrófico, el nivel cae hasta hacerse prácticamente cero. Igualmente, al iluminar de nuevo los cultivos, los niveles de actividad se recuperan en todos los casos, si bien sin sobrepasar los valores iniciales (datos no presentados).

III.B.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA

III.B.4.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la actividad fijadora de N_2

La Tabla VI muestra los valores del tiempo de generación y de la actividad fijadora de N_2 de células de A. variabilis cultivadas a temperatura entre 25 y 40°C en medios burbujeados con aire suplementado con CO_2 . Ambos parámetros presentaron una temperatura óptima de 35°C, siendo, a esta temperatura, el tiempo de generación de 8,7 h, y la actividad fijadora de N_2 de 69,3 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$. Tanto a 30 como a 40°C el tiempo de generación fue del orden de 9,5 h, pero al descender la temperatura a 25°C experimentó un significativo aumento, alcanzando un valor de 13,1 h.

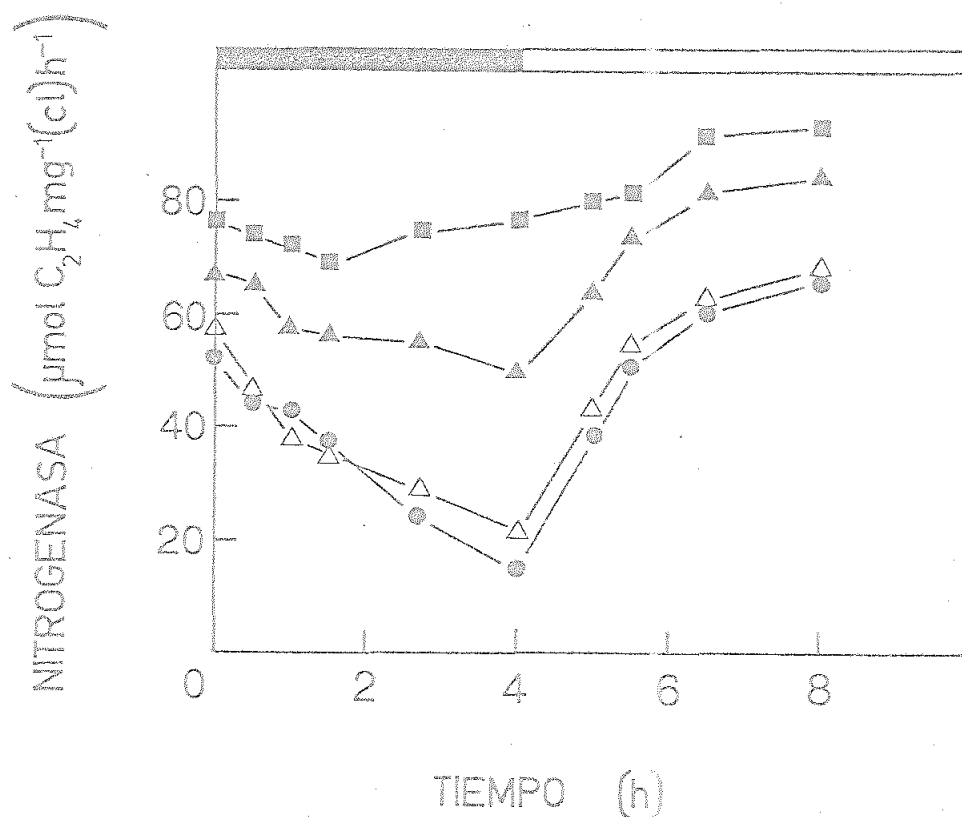


Figura 28. Efecto de la fuente de carbono sobre la pérdida de la actividad fijadora de N_2 en la oscuridad. El experimento se llevó a cabo, a $30^\circ C$, en cuatro frascos cilíndricos de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro. La irradiancia, antes y después de la fase oscura, fue de 40 W m^{-2} . Transcurridas 18 horas después de la inoculación, y cuando todavía la actividad específica fijadora de N_2 se encontraba aumentando, se cubrieron los frascos con papel de aluminio (tiempo cero). Al cabo de 4 horas en la oscuridad se iluminaron de nuevo los cultivos. En todos los casos el caudal de aire fue de $90 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

- (■) aire y fructosa 10 mM en el medio de cultivo
- (▲) aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v)
- (Δ) aire y $NaHCO_3$ 5 mM en el medio de cultivo
- (●) aire

TABLA VI

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TIEMPO DE GENERACION Y LA ACTIVIDAD FIJADORA DE NITROGENO DE A. variabilis

Temperatura de cultivo	Tiempo de generación	Actividad nitrogenasa
(°C)	(h)	($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl})\text{h}^{-1}$)
25	13,1	28,7
30	9,2	45,8
35	8,7	69,3
40	9,7	56,4

Los cultivos se llevaron a cabo, a las temperaturas indicadas, en recipientes cilíndricos de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro burbujeados con aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v). La irradiancia fue de 60 W m^{-2} . Las células se aclimataron previamente a cada temperatura en cultivos sucesivos a lo largo de ocho días, tras lo que se inocularon los medios a razón de $1,5 \text{ mg (cl)}\text{l}^{-1}$. El tiempo de generación se determinó en fase exponencial, y la actividad nitrogenasa se ensayó a la correspondiente temperatura de cultivo, siendo el valor indicado el máximo exhibido por cada cultivo a lo largo de su crecimiento.

Los niveles de actividad nitrogenasa presentados en la Tabla VI corresponden a los valores obtenidos cuando dicha actividad se ensayó a la temperatura de crecimiento del cultivo. Así, el cultivo de 30°C presentó una actividad máxima de 45,8 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ mg}^{-1}(\text{cl}) \text{ h}^{-1}$ frente a 56,4 para el cultivo de 40°C. Sin embargo, hay que señalar que, independientemente de la temperatura de cultivo, la óptima para el ensayo fue de 40°C (Figura 29). Para cualquier temperatura de ensayo, la gradación de la actividad nitrogenasa respecto a la temperatura de crecimiento es de 35, 30 y 40°C.

III.B.4.2. Efecto de la temperatura sobre la composición elemental y molecular de las células

Los resultados que se recogen en la Tabla VII muestran la influencia de la temperatura de cultivo sobre la composición elemental y molecular de las células de A. variabilis. El análisis de las células adaptadas a 30 y 40°C mostró que, durante la fase exponencial, el contenido en proteína neta era de 56,1% del peso seco a 30°C, significativamente mayor que el de 44,5% en el caso de las células cultivadas a 40°C. Esta diferencia en el contenido en proteína se compensa con el de carbohidratos, cuyo porcentaje del peso seco es un 10% menor en las células de 30°C. En relación con los lípidos no se encontraron diferencias significativas, pero el contenido en clorofila de las células de 30°C fue superior en más del 50 por ciento respecto a las de 40°C.

En cuanto a la composición elemental se observó un mayor contenido en nitrógeno en las células cultivadas a 30°C, correlacionándose este aumento con el encontrado para las proteínas. Por el contrario, la biomasa de las células adaptadas a 40°C presentó un mayor grado de oxidación que la de las cultivadas a 30°C. El contenido en hidrógeno no difirió apreciablemente en uno y otro caso.

Por su especial interés se ha estudiado la variación del contenido en nitrógeno de las células en un intervalo de temperaturas de 25 a 40°C a baja (40 W m^{-2}) y alta (200 W m^{-2}) irradiancia (Figura 30). Puede observarse que, conforme aumenta la temperatura del cultivo, decrece el contenido en nitrógeno del material celular. A baja irradiancia, este efecto es más marcado, y el

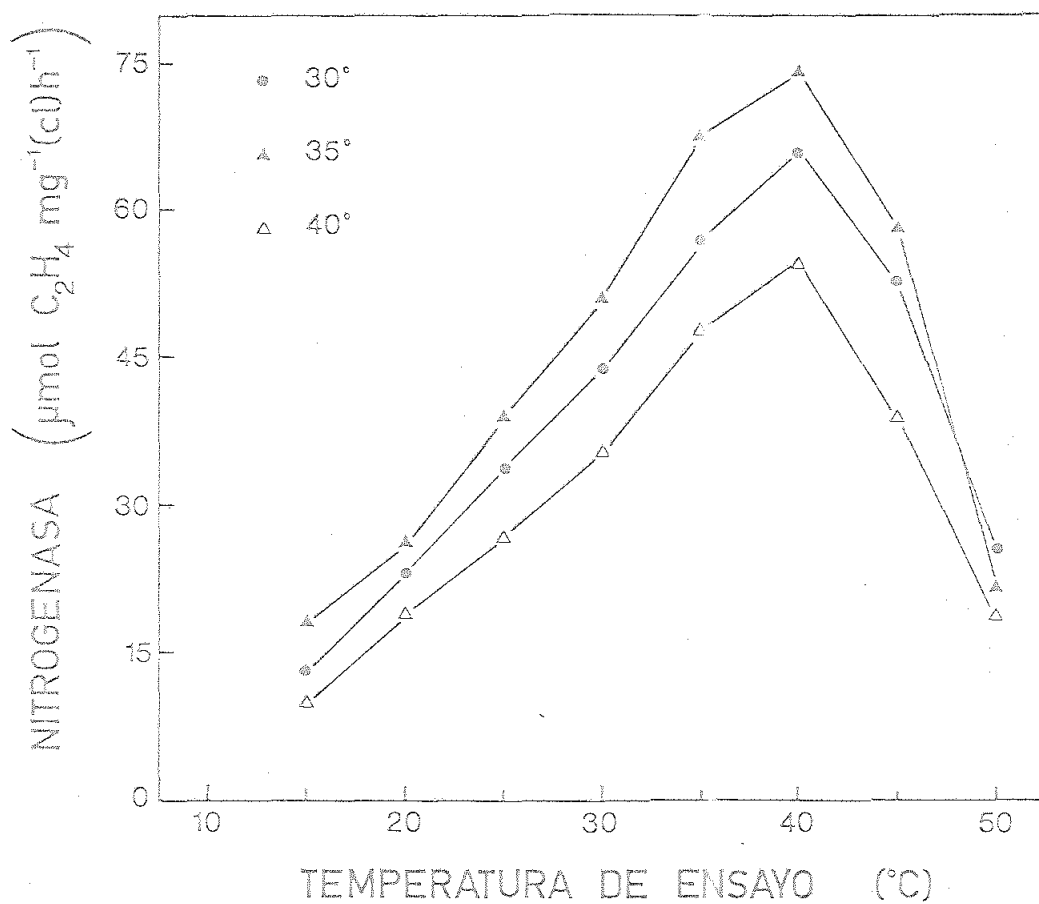


Figura 29. Temperatura óptima de ensayo de la actividad fijadora de N_2 de *A. variabilis*. Las condiciones experimentales son las descritas en la Tabla VI.

TABLA VII

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA COMPOSICION ELEMENTAL Y MOLECULAR
DE A. variabilis

Componente	Temperatura de cultivo	
	30°C	40°C
	(% del peso seco)	
C	50,8	49,6
O	23,1	26,5
N	11,6	9,8
H	6,9	7,2
Proteínas	56,1	44,5
Carbohidratos	22,1	32,2
Lípidos	8,4	8,7
Clorofila	1,9	1,2

Los cultivos se llevaron a cabo, a la temperatura indicada, en recipientes cilíndricos de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro burbujeados con aire enriquecido en CO₂ al 2% (v/v). La irradiancia fue de 40 W m⁻². Las células se aclimataron previamente a cada temperatura en cultivos sucesivos a lo largo de diez días. Los análisis elemental y molecular se realizaron durante la fase de deceleración.

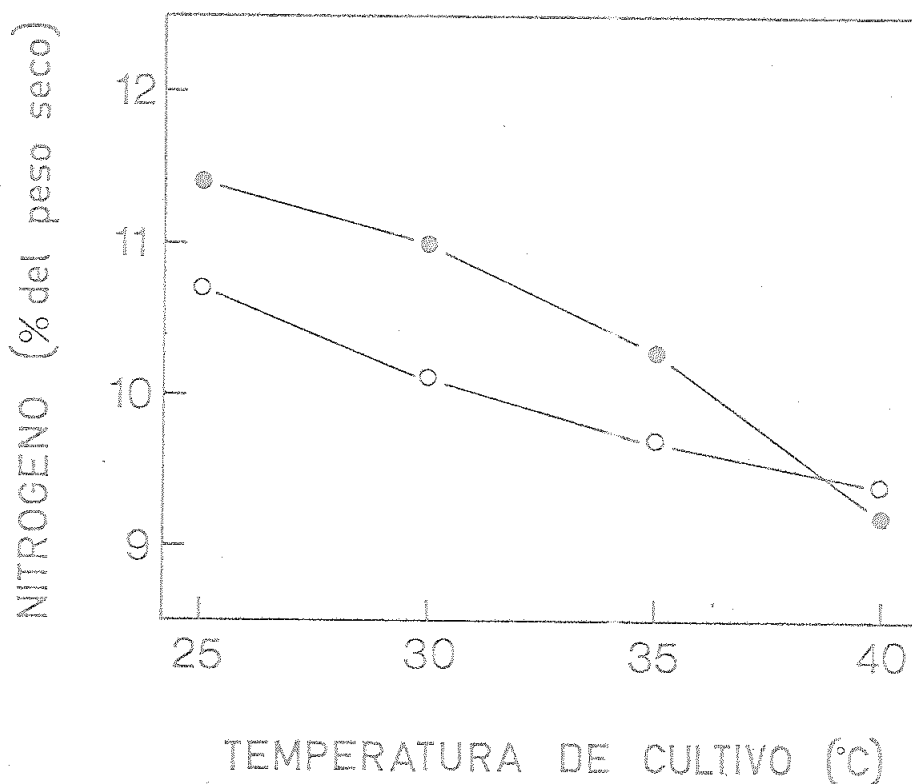


Figura 30. Efecto de la temperatura de cultivo y de la irradiancia sobre el contenido en nitrógeno de las células de *A. variabilis*. Los cultivos se llevaron a cabo en recipientes cilíndricos de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro burbujeados con aire enriquecido en CO₂ al 2% (v/v) y sometidos a irradiancias de 40 (●) y de 200 W m⁻² (○). Las células se adaptaron previamente a las temperaturas indicadas en cultivos sucesivos a lo largo de diez días. El contenido en nitrógeno se analizó durante la fase de deceleración.

contenido en nitrógeno oscila entre el 11,4% del peso seco en células adaptadas a 25°C y el 9,2% en células adaptadas a 40°C. A alta irradiancia las diferencias fueron menos acusadas.

III.B.5. EFECTO DEL pH

El estudio del efecto del pH sobre el crecimiento y actividades fisiológicas de microalgas presenta ciertas dificultades, ya que estos microorganismos asimilan carbono inorgánico del medio, modificando su pH. Por otra parte, la posibilidad de tamponar el medio en un amplio intervalo de pH se encuentra restringida, dado que la mayoría de los amortiguadores convencionales de pH contienen nitrógeno combinado, que podría servir como fuente de nitrógeno para el crecimiento celular y provocar además la pérdida de actividad nitrogenasa en el caso de las cianobacterias fijadoras de N_2 . Por tanto, se utilizaron tampones de KH_2PO_4/K_2HPO_4 y $CO_2/NaHCO_3/Na_2CO_3$, que, adecuadamente combinados, permiten cubrir un intervalo de pH entre 6 y 10, sin afectar excesivamente a la fuerza iónica. Para mantener un suministro adecuado de carbono inorgánico en las distintas condiciones ensayadas, los cultivos se burbujearon constantemente con aire enriquecido en CO_2 al 0,1% (v/v).

III.B.5.1. Efecto del pH del medio sobre el crecimiento

La Figura 31 muestra el efecto del pH del medio sobre la velocidad específica de crecimiento de A. variabilis. Se observa que entre pH 6,4 y 8,3 la velocidad específica de crecimiento se mantiene prácticamente constante, con valores de alrededor de $1,5 \text{ día}^{-1}$, mientras que a partir de pH 8,6 disminuye de forma apreciable. Si los mismos experimentos se llevan a cabo burbujear los cultivos con aire sin suplemento de CO_2 , el intervalo óptimo de pH se desplaza hacia la zona alcalina, situándose entre 7,2 y 8,4 (datos no presentados).

III.B.5.2. Efecto de los ciclos luz-oscuridad sobre el pH del medio

Un factor que puede afectar significativamente al pH del medio de cultivo es la alternancia de ciclos luz-oscuridad. En efecto, cuando los cultivos de A. variabilis se burbujan sólo con aire en presencia de $NaHCO_3$ 5 mM, el crecimiento celular va

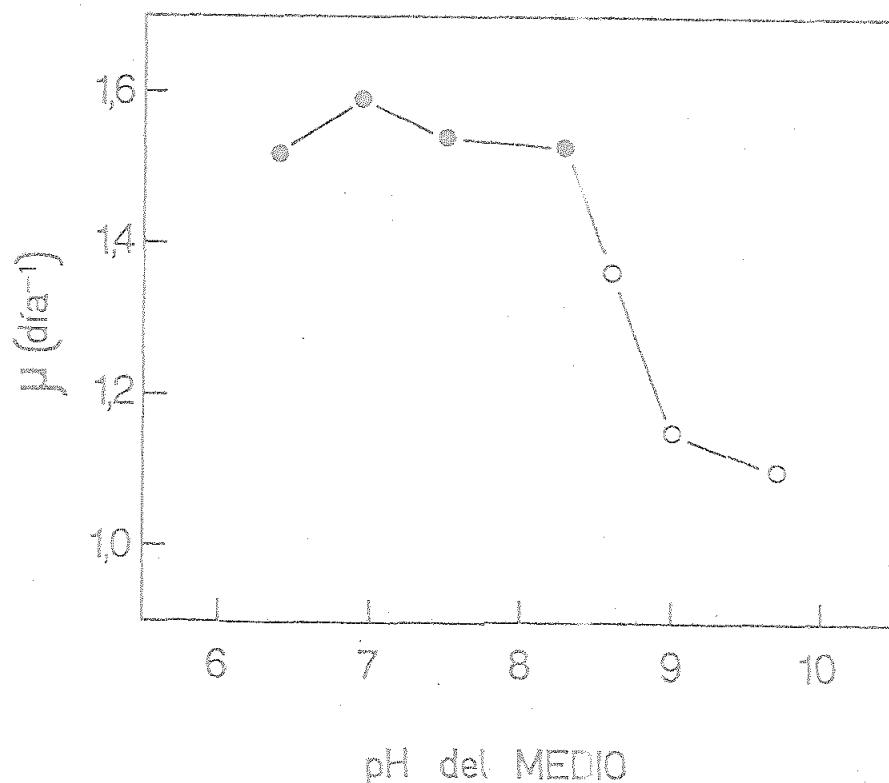


Figura 31. Efecto del pH sobre la velocidad específica de crecimiento de *A. variabilis*. Los cultivos se llevaron a cabo a 35°C en siete recipientes cilíndricos de 170 ml de capacidad y 4,5 cm de diámetro, burbujeándose con aire enriquecido con CO₂ al 0,1% (v/v) e iluminando con luz blanca de 40 W m⁻². Los distintos valores de pH se consiguieron variando las proporciones de las formas ácida y básica de fosfato potásico 4 mM y añadiendo (círculos blancos) bicarbonato y/o carbonato sódico a la concentración total de 10 mM. La densidad de todos los cultivos fue de 1,5 mg(cl) l⁻¹. A lo largo de la fase exponencial de crecimiento se determinó el peso seco, calculándose en base a este parámetro la velocidad específica de crecimiento. Los valores indicados corresponden a la media de dos experimentos independientes.

acompañado de una paulatina alcalinización del medio a lo largo de la fase luminosa y de una acidificación en la fase oscura (Figura 32). Estas oscilaciones de pH se relacionan estrechamente con las variaciones en la concentración de carbono inorgánico en el medio de cultivo. Aunque a menor escala, el mismo comportamiento se registra también cuando la aireación se interrumpe durante la fase oscura.

Si el mismo experimento se realiza suplementando el aire con CO_2 al 2% (v/v) aumenta obviamente el contenido en carbono inorgánico del medio y se amortiguan notablemente las oscilaciones de pH, así como las variaciones del propio carbono inorgánico, sin que se afecte apreciablemente el crecimiento celular (Figura 33).

III.B.5.3. Efecto del pH sobre el contenido en clorofila y nitrógeno de las células

El pH del medio influye también en el contenido celular de clorofila y nitrógeno. La Figura 34 muestra la variación de la concentración de clorofila de células de A. variabilis con el pH del medio en el intervalo entre 6,4 y 9,7. El porcentaje de clorofila respecto al peso seco se mantiene en valores próximos al 2% a pH entre 7 y 8,3 y disminuye progresivamente hasta 1,4% para un pH de 9,7.

Por lo que respecta al contenido en nitrógeno de la biomasa de A. variabilis, éste se mantiene alrededor del 11% en el intervalo de pH entre 6,4 y 8,6, descendiendo hasta el 10% a partir de pH 9 (Figura 35).

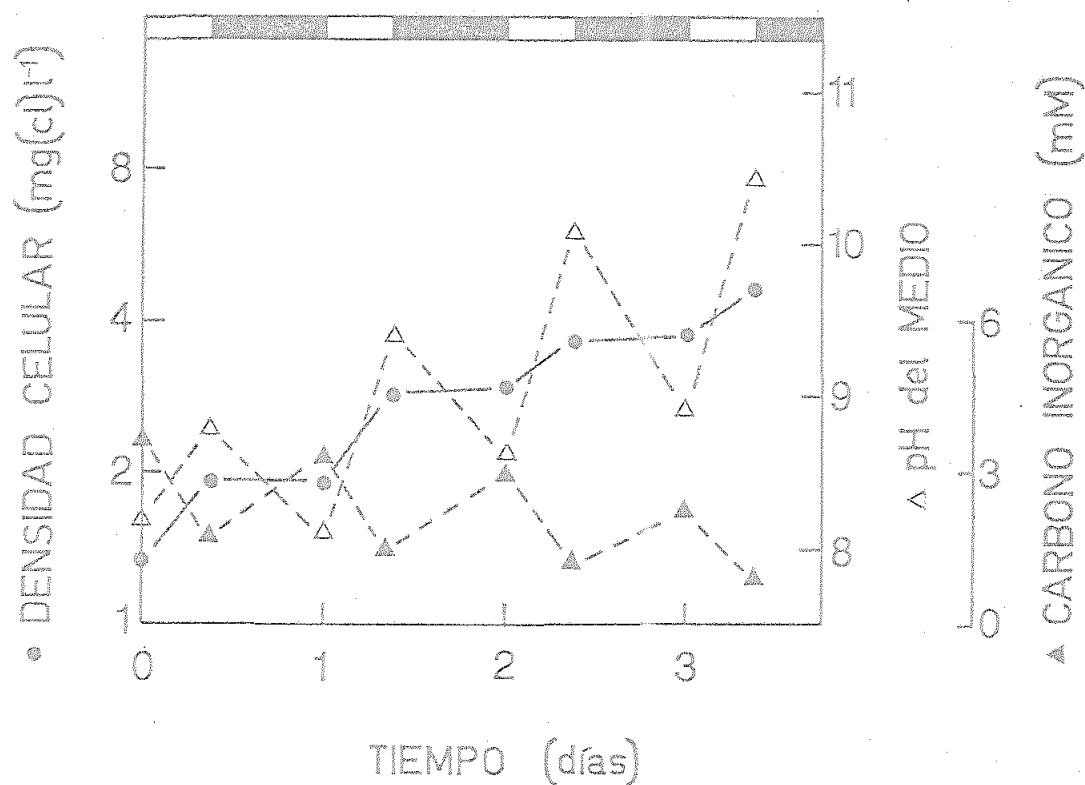


Figura 32. Efecto de los ciclos luz-oscuridad sobre el pH y el contenido en carbono inorgánico del medio en cultivos de *A. variabilis* burbujeados con aire. El experimento se llevó a cabo a 35°C en un frasco de Roux de 800 ml de capacidad y 5 cm de profundidad iluminado durante el fotoperiodo de 9 h con luz blanca de 40 W m⁻². El medio de cultivo, conteniendo K₂HPO₄ 1 mM y NaHCO₃ 5 mM, se burbujeó continuamente con aire a un caudal de 90 l l⁻¹h⁻¹. A los tiempos indicados se determinó la concentración de clorofila de las células, el pH y el carbono inorgánico del medio.

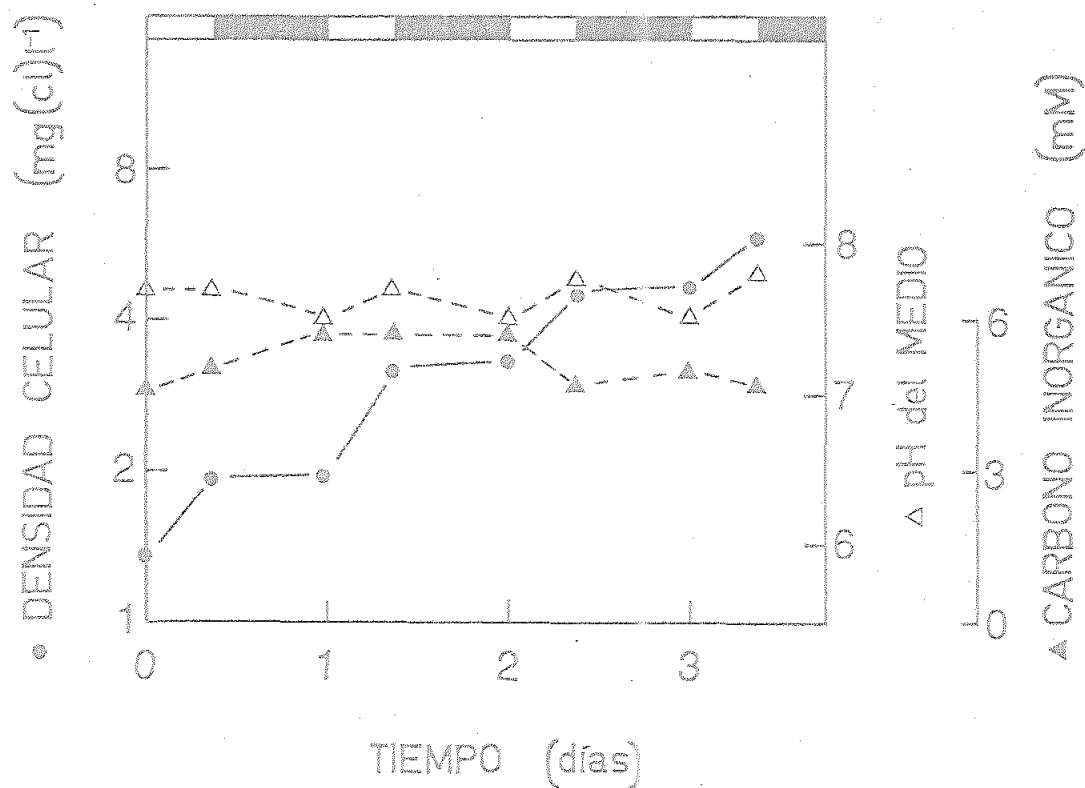


Figura 33. Efecto de los ciclos luz-oscuridad sobre el pH y el contenido en carbono inorgánico del medio en cultivos de *A. variabilis* burbujeados con aire enriquecido en CO_2 . Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Figura 32, excepto que el aire insuflado contenía CO_2 al 2% (v/v).

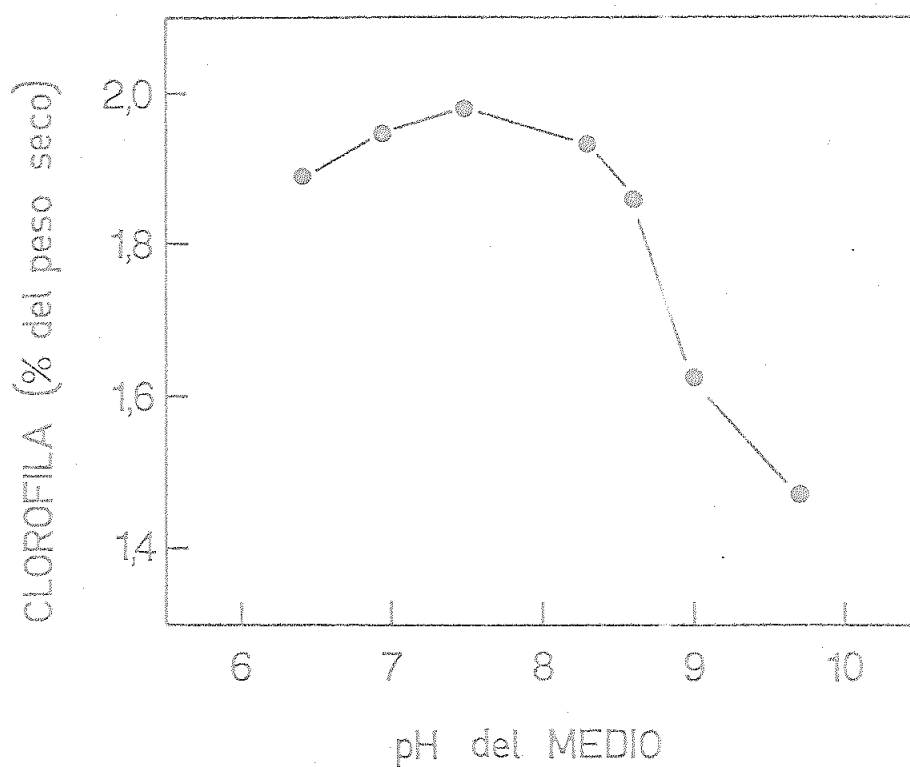


Figura 34. Efecto del pH sobre el contenido en clorofila de las células de *A. variabilis*. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Figura 31. Los valores indicados corresponden a la media de tres determinaciones realizadas en distintos momentos de la fase exponencial de crecimiento.

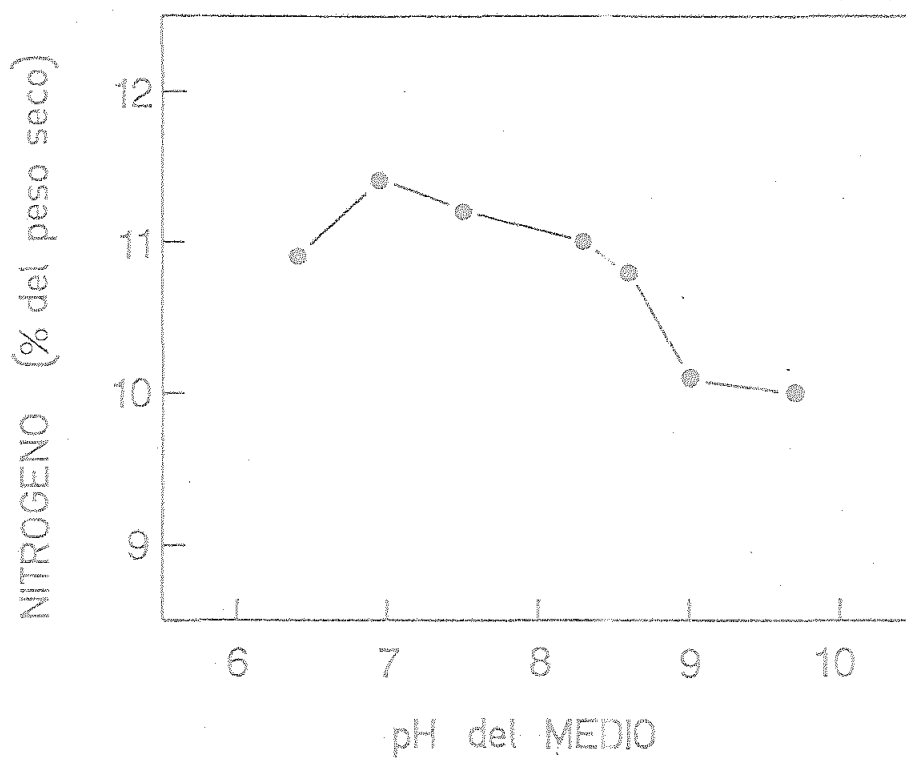


Figura 35. Efecto del pH sobre el contenido en nitrógeno de las células de *A. variabilis*. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Figura 31. Los valores indicados corresponden a la media de tres análisis efectuados al final de la fase exponencial de crecimiento.

III.C. CULTIVO DE Anabaena variabilis A LA INTEMPERIE CON AGITACION MEDIANTE AIREACION FORZADA

Al emprender el estudio del cultivo de A. variabilis en condiciones ambientales los experimentos se plantearon de modo que la mayoría de las variables estuvieran controladas en lo posible, a fin de disminuir la interferencia simultánea de varios factores. Para ello se reguló la temperatura de los cultivos a 30°C, ligeramente inferior a la óptima de crecimiento determinada en condiciones de laboratorio, y se emplearon sales de grado analítico en la preparación del medio de cultivo, si bien el agua utilizada procedía de la acometida general de Sevilla. En ningún caso se esterilizó el medio de cultivo ni ningún componente de la instalación. El sistema de cultivo empleado, que se describe en el apartado II.A.3., consistió básicamente en una serie de cubetas de 0,25 m² de superficie superior abierta al aire, con una profundidad entre 15 y 55 cm, según el volumen del cultivo. La agitación se realizó mediante un electrosoplante, que insuflaba aire a la suspensión celular por una tubería de PVC finamente agujereada y situada sobre el fondo de las cubetas. El aire podía enriquecerse en anhídrido carbónico conectando a la entrada de aire otra que suministraba CO₂ puro.

III.C.1. CRECIMIENTO EN CULTIVOS ESTANCOS Y SEMICONTINUOS

En la Figura 36 se presenta una curva de crecimiento de A. variabilis obtenida en el mes de Abril. Tras inocular el medio a razón de 1 mg de clorofila por litro, el cultivo se desarrolló, con un tiempo de generación inferior a 2 días, hasta alcanzar una densidad celular de alrededor de 4 mg de clorofila por litro. A partir de esta densidad, la velocidad de crecimiento decreció, probablemente por limitación de luz disponible para las células, hasta detenerse completamente el crecimiento.

Aunque a partir de la información suministrada por la curva de crecimiento pueden derivarse datos de productividad, este parámetro debe establecerse con otro tipo de aproximación más fiable. Para este fin se llevó a cabo series de cultivos semicontinuos, extrayendo cada día de las cubetas una parte del volumen total de la suspensión celular, de manera que la cantidad de biomasa

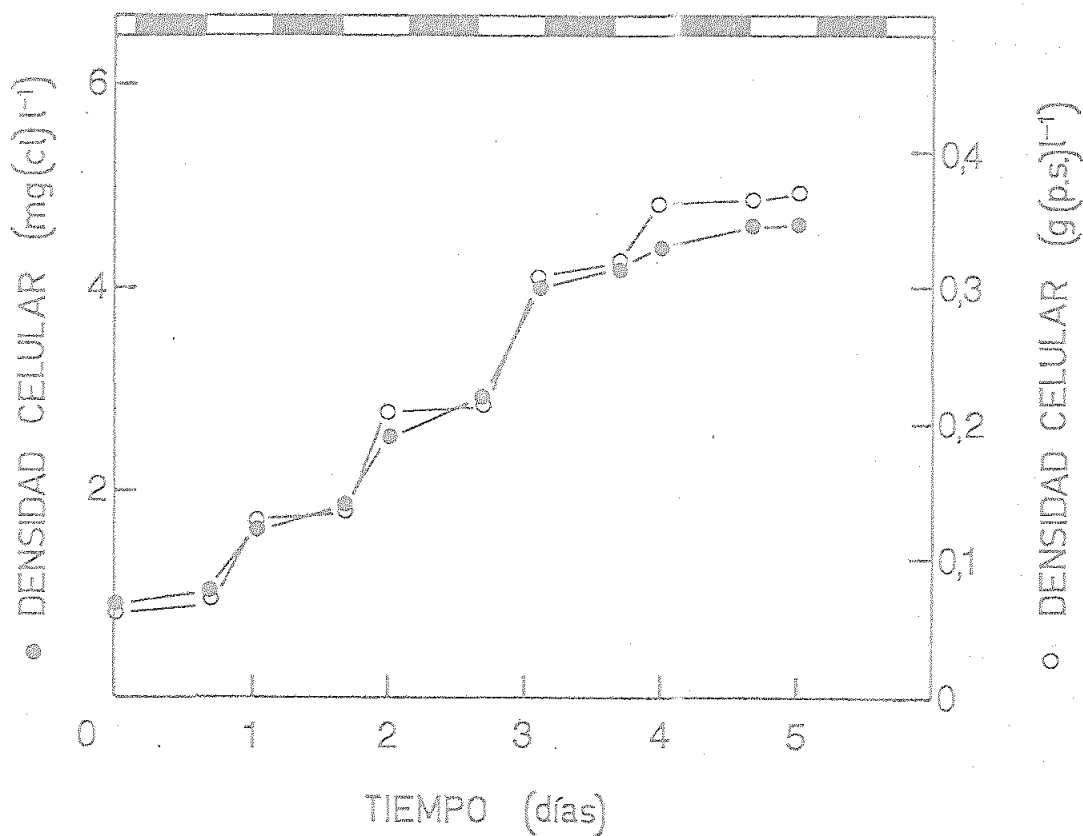


Figura 36. Crecimiento de *A. variabilis* al aire libre en cultivo estanco. Las células se cultivaron durante el mes de Abril en un recipiente de 25 cm de profundidad y 0,25 m² de superficie, burbujeando a través de la suspensión celular aire suplementado con CO₂ al 2% (v/v) a un caudal de 50 l l⁻¹ h⁻¹. La temperatura de los cultivos se mantuvo aproximadamente a 30°C mediante calefactores eléctricos. A los tiempos indicados se determinó la concentración en clorofila y el peso seco.

removida fuese igual al incremento registrado en peso seco de células y añadiendo a continuación medio fresco hasta completar el volumen inicial. Esta forma de proceder permitía mantener la densidad celular de la suspensión dentro de unos márgenes previamente fijados, y evaluar así el efecto sobre la productividad de diversos parámetros de interés, tales como la profundidad y la densidad celular del cultivo, sin introducir otras variables, tales como el aumento de la concentración de los componentes del medio de cultivo por evaporación o el envejecimiento celular. En la Figura 37 se presenta la evolución de un cultivo semicontinuo de A. variabilis manteniendo a una densidad celular mínima de 3 mg de clorofila por litro mediante la remoción y adición diaria de suspensión celular y medio de cultivo, respectivamente. La productividad estimada por este método durante 6 días consecutivos del mes de Junio fue de $13,6 \pm 1,5$ g(peso seco) $m^{-2} día^{-1}$.

III.C.2. EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD DE FIJACION DE NITROGENO EN CULTIVOS ESTANCOS Y SEMICONTINUOS

En el apartado III.B.3. se puso de manifiesto en experiencias de laboratorio que la actividad de fijación de nitrógeno, estimada como reducción de acetileno *in vivo*, presenta una estrecha correlación con la irradiancia. Este comportamiento resulta también evidente en los experimentos realizados al aire libre en cultivos estancos, observándose reiteradamente un aumento en la actividad nitrogenasa durante el periodo de luz, seguido de una caída de la misma durante la fase oscura (Figura 38). Es interesante resaltar que los niveles específicos de actividad nitrogenasa alcanzados durante el periodo de luz fueron mayores en los primeros días del cultivo, cuando la densidad celular era baja, disminuyendo paulatinamente al progresar el crecimiento y, aumentar consecuentemente, la densidad celular.

Lógicamente, la evolución de la actividad nitrogenasa en cultivos semicontinuos siguió también la pauta de subida durante el periodo luminoso y descenso durante la noche. Sin embargo, esta actividad también fue disminuyendo a lo largo del tiempo, a pesar de que se mantuvo constante la densidad celular al comienzo de cada día y de que la irradiancia solar no varió significativamente de un día a otro (Figura 39).

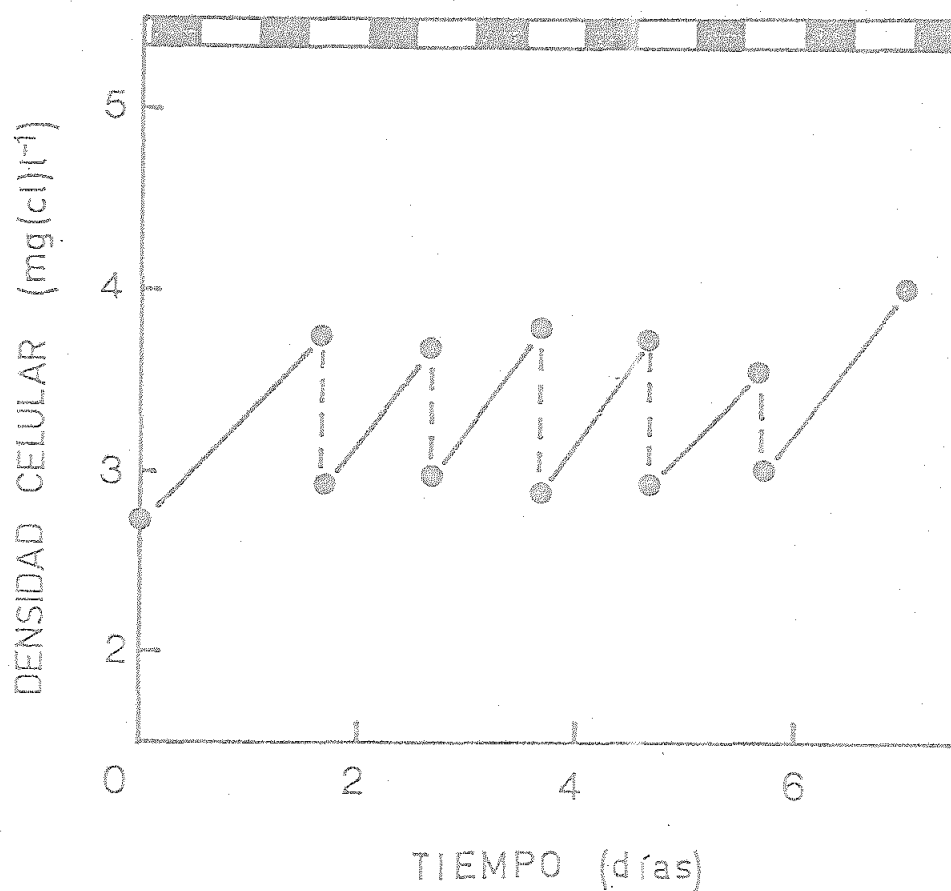


Figura 37. Crecimiento y productividad de *A. variabilis* al aire libre en cultivo semicontinuo. Las células se cultivaron durante el mes de Junio en las condiciones descritas en la Figura 36. Cada mañana se midió la densidad celular del cultivo y se removió una parte del mismo, suplementándose con medio fresco para mantener la densidad celular en su valor inicial de 3 mg de clorofila por litro.

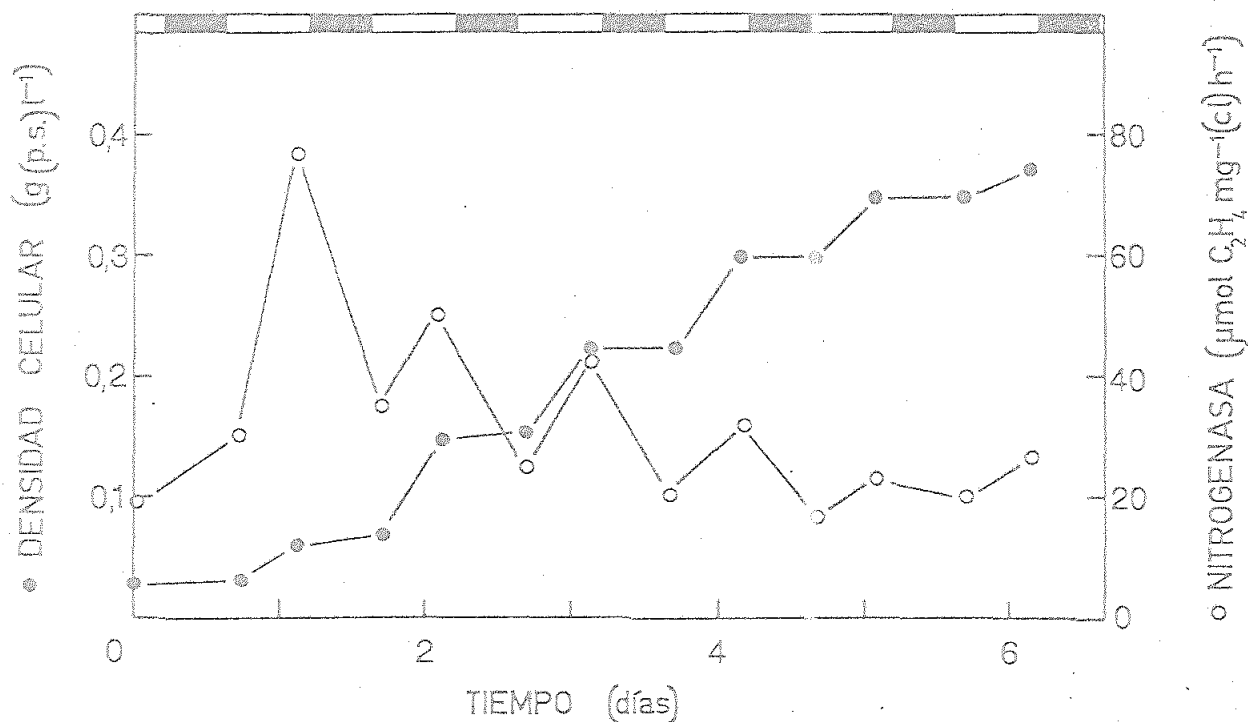


Figura 38. Relación entre el crecimiento y evolución de la actividad nitrogenasa de *A. variabilis* al aire libre en cultivo estanco. Las células se cultivaron durante el mes de Junio en las condiciones descritas en la Figura 36. A los tiempos indicados se determinaron la clorofila y el peso seco y se ensayó la actividad nitrogenasa.

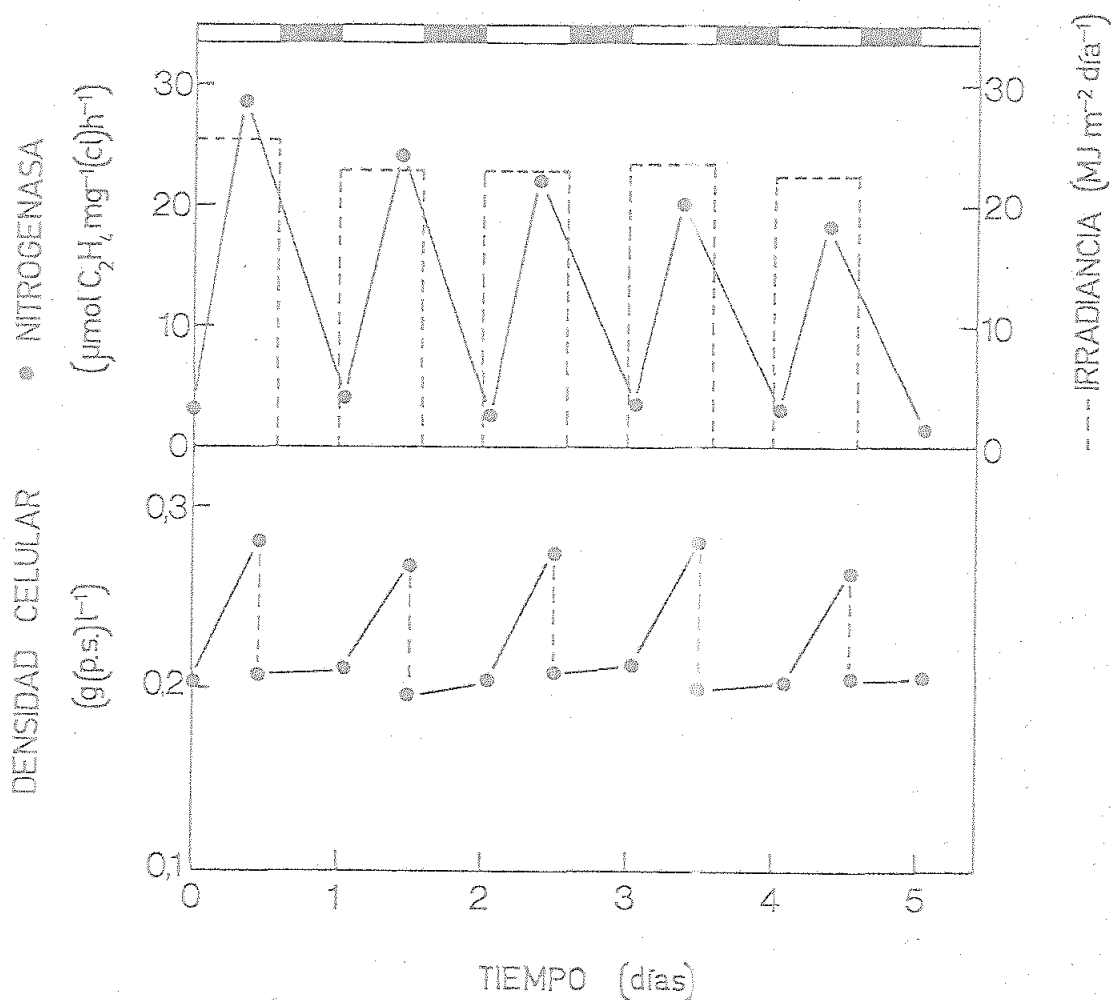


Figura 39. Relación entre crecimiento y evolución de la actividad nitrogenasa de *A. variabilis* al aire libre en cultivo se micontinuo. Las células se cultivaron durante el mes de Agosto en un recipiente de 25 cm de profundidad y 0,25 m² de superficie. La temperatura del cultivo se mantuvo aproximadamente a 30°C, y se burbujeó a través de la suspensión celular aire suplementado con CO₂ al 2% (v/v) a un caudal de 50 l l⁻¹h⁻¹. Cada tarde se midió la densidad celular del cultivo y se retiró una parte del mismo, suplementándose con medio fresco para mantener la densidad en un valor mínimo de 0,2 g de peso seco por litro. A los tiempos indicados se determinó el peso seco y se ensayó la actividad nitrogenasa de las células. Los valores de irradiancia corresponden a la cantidad total de energía solar recibida cada día.

La variación de la irradiancia solar a lo largo del día incidió también sobre la actividad de fijación de N_2 . En efecto, a primeras horas del día, cuando la irradiancia es débil, la actividad nitrogenasa de A. variabilis presentó un nivel bajo, que aumentó progresivamente con la irradiancia, hasta alcanzar un máximo a mediodía. A partir de este momento, tanto la irradiancia solar como la actividad nitrogenasa comenzaron a descender (Figura 40). Este comportamiento ocurrió tanto cuando la suspensión se burbujeó con aire como con aire enriquecido en CO_2 , si bien en este último caso los niveles de actividad nitrogenasa fueron algo mayores.

III.C.3. EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

En las experiencias hasta ahora descritas el aire constituía la única fuente de nitrógeno de que disponían las células. Esto supone, a priori, una notable ventaja desde el punto de vista económico, en el supuesto de que la productividad de estos cultivos sea similar a la resultante cuando se añade nitrógeno combinado al medio de cultivo. En la Tabla VIII se presentan los resultados correspondientes al efecto de la fuente de nitrógeno y del suplemento de CO_2 sobre la productividad de A. variabilis en cultivos semicontinuos al aire libre. Como puede observarse, los valores obtenidos no se incrementan significativamente cuando se suplementa el aire con CO_2 ni cuando se añade al medio de cultivo nitrógeno combinado, bien en forma de nitrato o de amonio.

III.C.4. EFECTO DE LA AIREACION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

Para que las tasas de crecimiento de un alga cultivada con aire como única fuente de carbono puedan emular a las obtenidas con cultivos suplementados con CO_2 ha de cumplirse, como condición sine qua non, que el aire insuflado al cultivo aporte una cantidad de carbono suficiente para poder sustentar el pertinente incremento de biomasa.

En la Figura 41 se presentan los resultados correspondientes al crecimiento en cultivos estancos al aire libre de A. variabilis en condiciones de diferente caudal de aire, desde 0 a $120 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$, así como a un control con aire enriquecido en CO_2 al 2% (v/v) burbujeado a razón de $60 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$. El cultivo sin burbujear

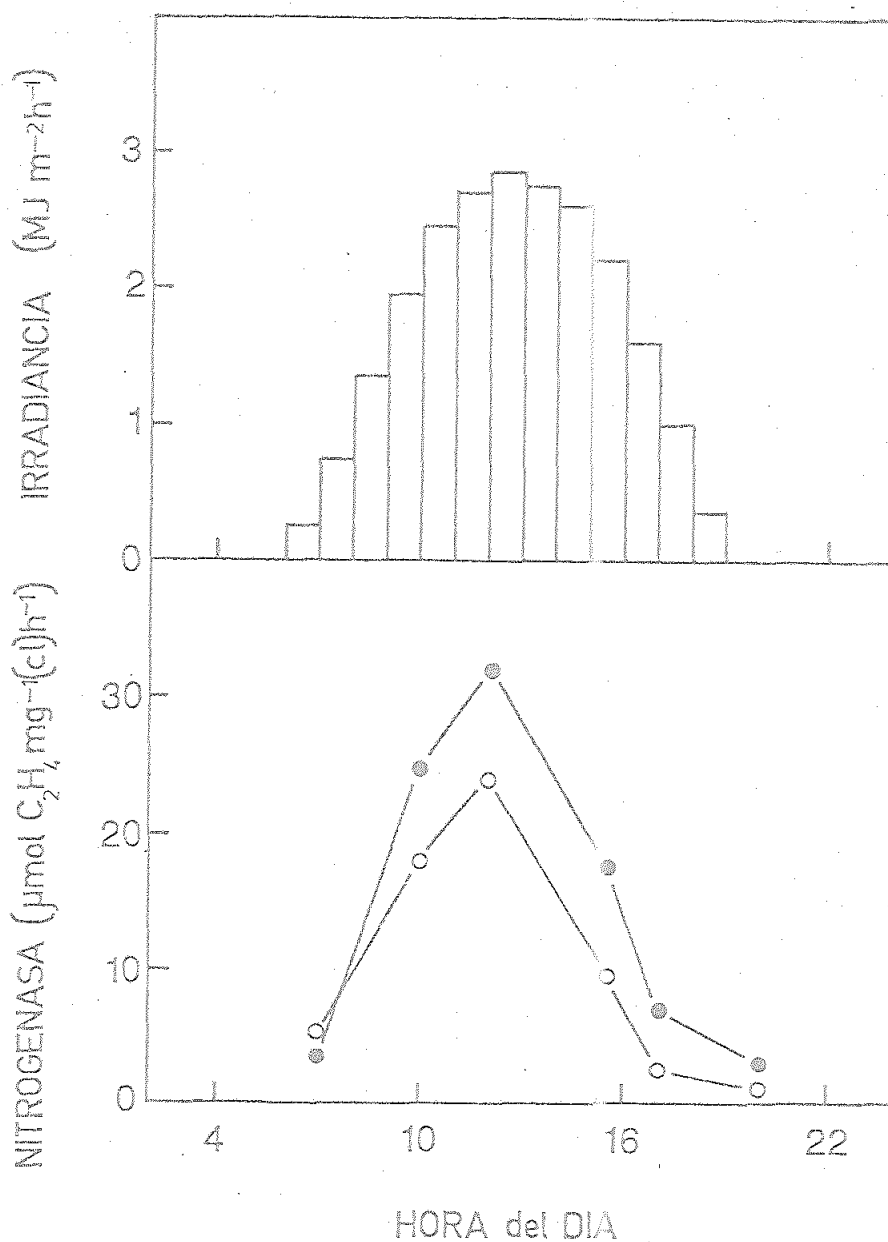


Figura 40. Evolución a lo largo del día de la actividad nitrogenasa de *A. variabilis* en cultivo semicontinuo al aire libre. Efecto del CO₂. Los cultivos se llevaron a cabo durante el mes de Agosto en las condiciones descritas en la Figura 36. Un cultivo se burbujó con 50 l de aire por litro de suspensión y hora (○), y el otro con aire al mismo caudal pero suplementado con CO₂ al 2% (v/v) (●). La radiación solar se midió durante el día a intervalos de una hora. A los tiempos indicados se ensayó la actividad nitrogenasa de las células. El tiempo se expresa en horario GMT.

TABLA VIII

EFFECTO DE LA ADICION DE NITROGENO COMBINADO Y DEL SUPLEMENTO DE ANHIDRIDO CARBONICO EN LA PRODUCTIVIDAD DE A. variabilis EN CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE

Fuente de nitrogeno	Productividad	
	aire	aire, 1% CO ₂
	(g (peso seco) m ⁻² día ⁻¹)	
N ₂ (aire)	13,6±3,2	13,2±3,8
KNO ₃ (10 mM)	14,2±3,1	13,6±3,7
NH ₄ Cl (5 mM)	14,4±3,0	13,5±3,1

Las células se cultivaron durante los meses de Mayo y Junio en recipientes de 25 cm de profundidad y 0,25 m² de superficie, burbujeando a través de la suspensión celular aire o aire suplementado con CO₂ a un caudal de 60 l l⁻¹h⁻¹. La temperatura de los cultivos se mantuvo aproximadamente a 30°C mediante calefactores eléctricos. La densidad de los cultivos se mantuvo a 3,5 mg(cl) l⁻¹ mediante diluciones diarias de la suspensión celular. Los valores de productividad mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cuatro días consecutivos.

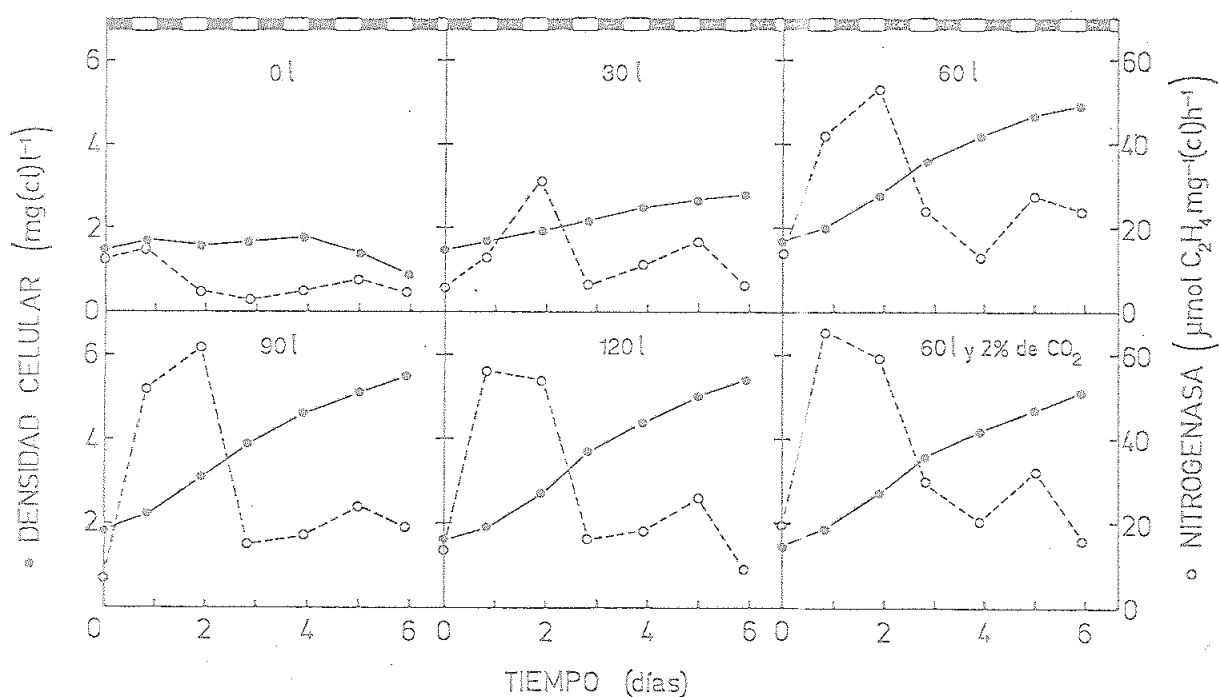


Figura 41. Efecto del caudal de aire (suplementado o no con CO₂) sobre el crecimiento y la actividad nitrogenasa de *A. variabilis* en cultivo estanco al aire libre. Las células se cultivaron durante el mes de Mayo en recipientes de 25 cm de profundidad y 0,25 m² de superficie. Las suspensiones celulares se mantuvieron a 30°C y se burbujearon, según se indica, con aire, o aire más CO₂, a los caudales de 0, 30, 60 (±CO₂ al 2%, v/v), 90 y 120 litros por litro de cultivo y hora. A los tiempos indicados se determinó la clorofila y se ensayó la actividad nitrogenasa de las células.

y, por tanto, sin agitación, no experimentó crecimiento alguno. El cultivo burbujeado con un caudal de $30 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$ permitió cierto crecimiento de las algas, aunque insuficiente, tanto por lo que se refiere al tiempo de generación (cercano a los 6 días) como a la densidad celular final alcanzada. Por el contrario, caudales de aire iguales o superiores a $60 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$ proporcionaron suficiente CO_2 y agitación para lograr niveles de crecimiento similares a los del control suplementado con CO_2 , que presentaba un tiempo de generación de 2 días.

La actividad nitrogenasa de los cultivos siguió un comportamiento análogo al observado para el crecimiento. Así, el cultivo sin burbujear no sobrepasó los niveles basales de actividad, que aumentó con el caudal de aire alcanzando un máximo a $60 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$, valor que no se rebasó al doblar el caudal ni al suplementar el aire con CO_2 al 2% (Figura 41).

Para evaluar los efectos de la aireación sobre el crecimiento y la productividad se llevó a cabo una serie de cultivos semicontínuos manteniendo los flujos antes mencionados (Tabla IX). De nuevo se encontró que tanto la velocidad específica de crecimiento como la productividad aumentaron con el caudal, alcanzando prácticamente sus máximos a $60 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$. Al incrementar el caudal sobre este valor, la velocidad específica de crecimiento y la productividad mejoraron sólo ligeramente. Así con un caudal de $120 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$, la productividad llegó a ser de $11,6 \text{ g (peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$.

III.C.5. EFECTO DEL SUPLEMENTO DE ANHIDRIDO CARBONICO SOBRE LA COMPOSICION ELEMENTAL Y MOLECULAR DE LAS CELULAS

La composición molecular de las células es un factor fundamental a la hora de determinar su posible aplicabilidad. Aunque ya se disponían de datos de composición para A. variabilis, éstos correspondían a células cultivadas en laboratorio (apartados III.A.4 y III.B.2). Por ello, se llevó también a cabo el análisis tanto elemental como molecular de la biomasa de A. variabilis obtenida en cultivos semicontínuos al aire libre. Como se resume en la Tabla X, las células de A. variabilis poseen un elevado contenido en proteína neta, superior al 50% del peso seco, tanto si se cultivan con sólo aire como con aire enriquecido en CO_2 al 1% (v/v), si

TABLA IX

EFFECTO DEL CAUDAL DE AIRE SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCTIVIDAD
DE A. variabilis EN CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE

Caudal de aire	Velocidad específica de crecimiento	Productividad
(l l ⁻¹ h ⁻¹)	(día ⁻¹)	(g(peso seco)m ⁻² día ⁻¹)
0	0	0
30	0,11	3,9±0,6
60	0,29	10,1±1,9
90	0,31	10,9±2,2
120	0,33	11,6±2,2

Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Figura 41. La densidad celular de los cultivos se mantuvo a 2 mg(cl) l⁻¹ mediante diluciones diarias de la suspensión celular. Los valores de productividad mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de tres días consecutivos del mes de Mayo.

TABLA X

COMPOSICION MOLECULAR DE A. variabilis EN CULTIVO SEMICONTINUO AL
AIRE LIBRE. EFECTO DEL ANHIDRIDO CARBONICO

Componente	Porcentaje del peso seco	
	aire	aire, CO ₂
Proteínas	51,9±2,5	54,8±3,6
Carbohidratos	22,7±2,4	21,4±1,9
Lípidos	9,2±0,8	8,7±1,1
Acidos nucleicos		
ADN	1,2±0,2	1,4±0,5
ARN	7,5±1,3	7,6±0,8
Clorofila	1,2±0,2	1,4±0,3
Cenizas	4,2±0,9	3,8±0,8

El experimento se llevó a cabo durante el mes de Mayo en las condiciones descritas en la Tabla VIII. Los análisis corresponden a células de cultivos burbujeados bien con sólo aire, bien con aire enriquecido en CO₂ al 1% (v/v). Los valores mostrados con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de cuatro determinaciones a lo largo de cuatro días consecutivos.

bien en este último caso el contenido en proteína fue ligeramente mayor. Por el contrario, los carbohidratos se encontraban en mayor porcentaje en las células cultivadas con sólo aire, siendo su contenido próximo al 23% del peso seco. En cuanto a los lípidos y ácidos nucleicos no hubo diferencia significativa entre uno y otro tipo de cultivos, situándose los respectivos contenidos alrededor del 9% para ambos componentes.

Por otra parte, el análisis elemental también arrojó valores muy similares para las células procedentes de ambos tipos de cultivos (Tabla XI) siendo los valores para los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno alrededor del 49%, 10% y 7% del peso seco, respectivamente. El contenido en oxígeno, sin embargo, fue ligeramente superior -próximo al 28%- en las células cultivadas con CO₂ suplementario.

A partir de los datos de estos análisis elementales pudieron determinarse las fórmulas y grados de reducción de la biomasa de células de A. variabilis cultivadas al aire libre. En la Tabla XII se resumen estos datos, así como los valores estimados para los calores de combustión, habiéndose encontrado un valor de 5,4 kcal g⁻¹ (peso seco), tanto para las células cultivadas con sólo aire como para las cultivadas con aire enriquecido en CO₂ al 1% (v/v).

TABLA XI

COMPOSICION ELEMENTAL DE A.variabilis EN CULTIVO SEMICONTINUO AL
AIRE LIBRE. EFECTO DEL ANHIDRIDO CARBONICO

Componente	Porcentaje del peso seco	
	aire	aire, CO ₂
Carbono	49,6±0,5	49,2±0,5
Oxígeno	25,9±0,3	27,9±0,2
Nitrógeno	10,0±0,2	10,7±0,4
Hidrógeno	6,9±0,1	7,0±0,1
Cenizas	4,2±0,9	3,8±0,8

Los análisis corresponden a células de los mismos cultivos utilizados para la determinación de la composición molecular (Tabla X). Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las cuatro determinaciones realizadas a lo largo de cuatro días consecutivos.

TABLA XII

FORMULA EMPIRICA, GRADO DE REDUCCION Y CALOR DE COMBUSTION DE LA
BIOMASA DE A.variabilis EN CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE

Parámetro	aire	aire, CO ₂
Fórmula empírica	C _{5,79} H _{9,66} O _{2,27} N	C _{5,37} H _{9,16} O _{2,28} N
Grado de reducción	4,89	4,86
Calor de combustión (kcal g ⁻¹)	5,46	5,38

Los valores de los diferentes parámetros se han estimado a partir de los datos recogidos en la Tabla XI.

III.C.6. EFECTO DE LA DENSIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

La densidad celular es uno de los parámetros decisivos en la determinación de la productividad de los cultivos de microalgas. Esta variable es especialmente importante en los cultivos en condiciones ambientales, siendo además una de las pocas manipulables para la optimización de los mismos. En la Figura 42 se representa el efecto de la densidad celular sobre la productividad y la velocidad específica de crecimiento de las células en cultivos semicontinuos desarrollados en dos épocas distintas. Tanto en Invierno como en Verano, la velocidad específica de crecimiento disminuyó al aumentar la densidad de los cultivos, si bien la más alta irradiancia en Verano permitió mayores velocidades de crecimiento para la misma densidad celular. Así, para una densidad celular de 2,5 mg de clorofila por litro de suspensión la velocidad específica de crecimiento fue de $0,28 \text{ día}^{-1}$ en Verano y de sólo $0,11 \text{ día}^{-1}$ en Invierno.

En lo que se refiere al efecto de la densidad celular sobre la productividad, en Verano se encontró un óptimo en forma de meseta para valores de densidad entre 2 y 3,5 mg de clorofila por litro, equivalente a $0,2-0,3 \text{ g(peso seco) l}^{-1}$, con un valor de productividad del orden de $12 \text{ g(peso seco) m}^{-2} \text{ día}^{-1}$. A densidades celulares superiores la productividad disminuyó, posiblemente debido al ensombrecimiento mutuo entre las células. En Invierno la densidad óptima fue de 1,5 mg de clorofila por litro, con una productividad de $5,8 \text{ g(peso seco) m}^{-2} \text{ día}^{-1}$; a 1 y a 2 mg(cl) l^{-1} las productividades fueron próximas a este valor, pero a partir de 2 mg(cl) l^{-1} de densidad celular la productividad disminuyó gradualmente.

III.C.7. EFECTO DE LA PROFUNDIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

Otro parámetro que influye notablemente sobre la productividad de un cultivo es la profundidad de la suspensión celular. En la Figura 43 se representan los valores medios de productividad obtenidos en Verano para cultivos semicontinuos de profundidades entre 15 y 55 cm, en los que la densidad celular mínima se

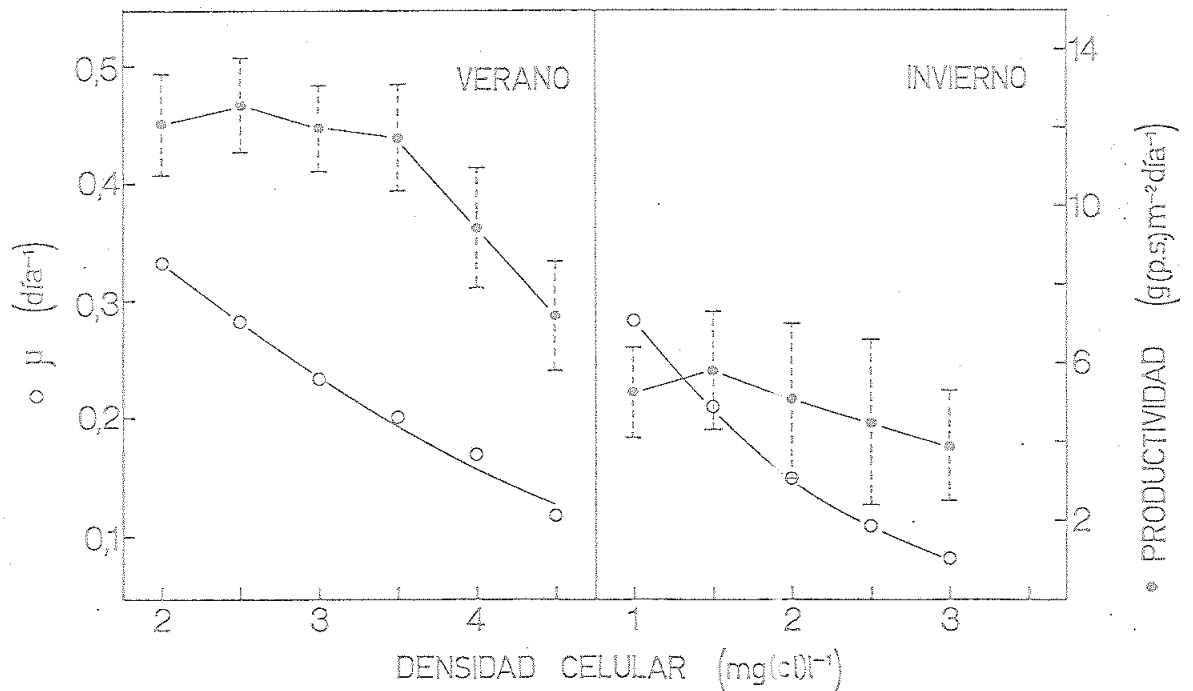


Figura 42. Efecto de la densidad celular sobre el crecimiento y la productividad de *A. variabilis* en cultivo semicontinuo al aire libre. Los cultivos se llevaron a cabo durante los meses de Julio y Diciembre en recipientes de 25 cm de profundidad y 0,25 m² de superficie. La temperatura de las suspensiones celulares mantuvo un nivel mínimo de 30°C y los cultivos se burbujearon con aire suplementado con CO₂ al 1% (v/v) a un caudal de 60 l l⁻¹h⁻¹. Los valores mostrados con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de seis (Verano) y cuatro (Invierno) días consecutivos.

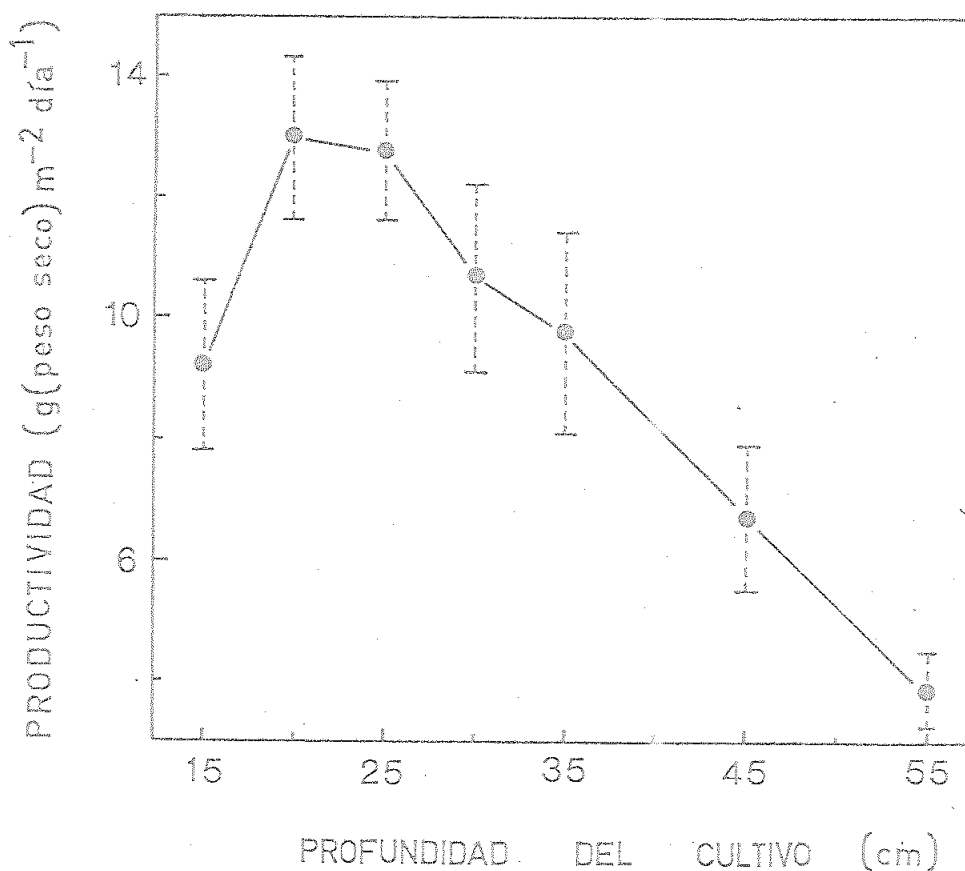


Figura 43. Efecto de la profundidad del cultivo sobre la productividad de *A. variabilis* en cultivo semicontinuo al aire libre durante el Verano. El experimento se llevó a cabo durante los meses de Julio y Agosto en las condiciones descritas en la Figura 42, salvo que se emplearon recipientes de distinta profundidad. La densidad mínima de las suspensiones celulares se mantuvo a 2 mg(cl) l^{-1} . Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cuatro días consecutivos.

mantuvo alrededor de $2 \text{ mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$ en todos los casos. Los máximos de productividad se registraron para profundidades entre 20 y 25 cm, con valores de alrededor de $13 \text{ g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2}\text{día}^{-1}$. A profundidades de 15, 30 ó 35 cm las productividades fueron inferiores, oscilando entre 9 y $11 \text{ g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2}\text{día}^{-1}$, y descendiendo considerablemente cuando la profundidad fue mayor de 35 cm.

Durante el Invierno, y para una densidad celular mínima de 2 mg de clorofila por litro, los valores óptimos de profundidad se encontraron entre 15 y 20 cm, con productividades medias próximas a los $6 \text{ g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2}\text{día}^{-1}$ (Figura 44). Profundidades superiores a 25 cm resultaron en una acusada disminución de la productividad.

III.C.8. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

III.C.8.1. Temperatura Óptima

Uno de los mayores condicionantes que presenta la productividad de los cultivos de microalgas al aire libre es la temperatura ambiente, por lo que ha sido interesante conocer el intervalo de temperaturas en que el cultivo de A.variabilis procede con un rendimiento satisfactorio. Para estudiar este efecto se llevaron a cabo cultivos semicontinuos de A.variabilis durante el Invierno en condiciones de temperatura controlada entre 15 y 40°C (Figura 45).

La productividad aumentó con la temperatura del cultivo desde 15 a 35°C , obteniéndose entonces el valor máximo de $6,1 \text{ g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2}\text{día}^{-1}$. A partir de 35°C la productividad disminuyó más bruscamente, siendo de $4,7 \text{ g m}^{-2}\text{día}^{-1}$ a 40°C .

III.C.8.2. Crecimiento a temperatura ambiente

La Figura 46 muestra el crecimiento de A.variabilis en cultivos estancos llevados a cabo durante el mes de Agosto tanto a temperatura ambiente como a temperatura controlada a un nivel máximo de 30°C . Ambos cultivos exhibieron crecimiento similar, a pesar de sufrir fuertes oscilaciones de temperatura, alrededor de

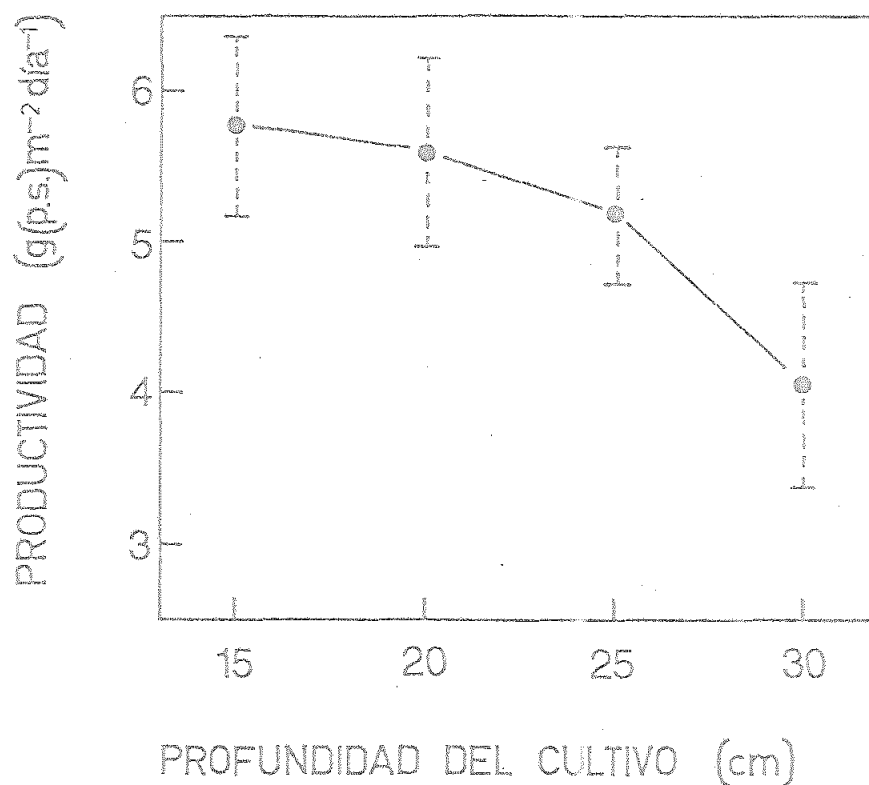


Figura 44. Efecto de la profundidad del cultivo sobre la productividad de *A. variabilis* en cultivo semicontinuo al aire libre durante el Invierno. El experimento se llevó a cabo durante el mes de Diciembre en las condiciones descritas en la Figura 43. Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cuatro días consecutivos.

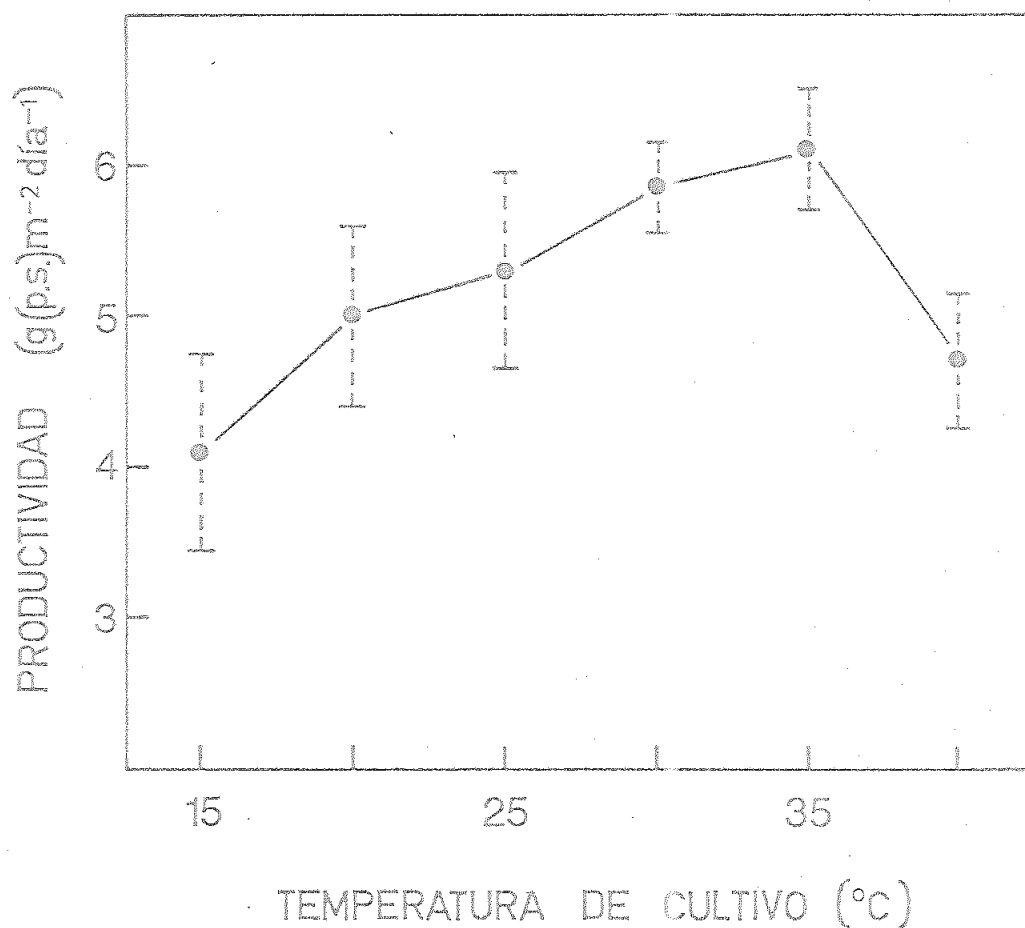


Figura 45. Efecto de la temperatura sobre la productividad de A. va riabilis en cultivo semicontinuo al aire libre. Los cul tivos se llevaron a cabo durante el mes de Febrero en las condiciones descritas en la Figura 42, pero contro lando la temperatura de cada uno de ellos mediante cale factores eléctricos. La densidad celular mínima de los cultivos se mantuvo a $1,5 \text{ mg(ol)} \text{ l}^{-1}$ mediante diluciones diarias. Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinacio nes realizadas a lo largo de cuatro días consecutivos.

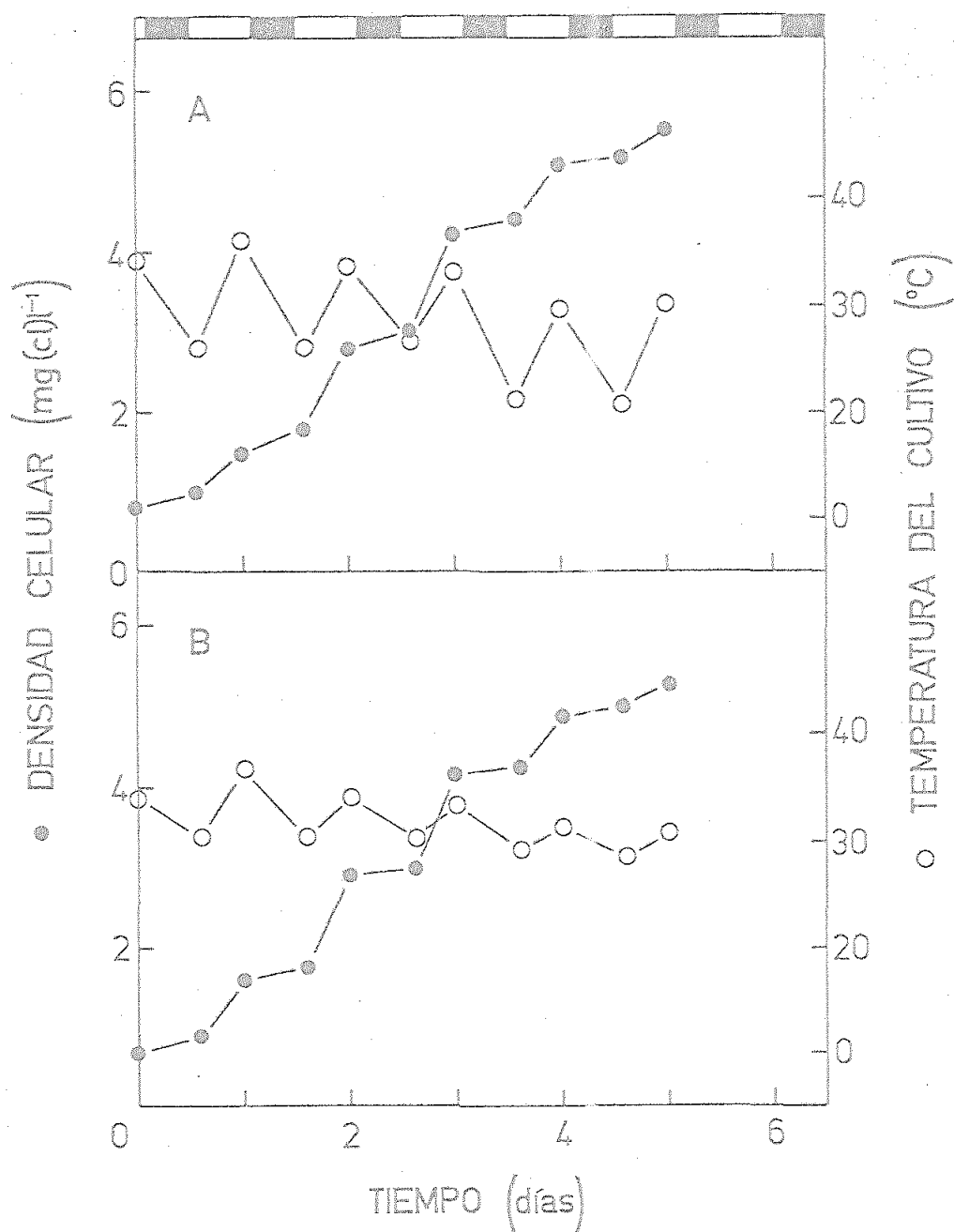


Figura 46. Crecimiento de *A. variabilis* a la temperatura ambiente estival en cultivo estanco al aire libre. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado durante el mes de Agosto en las condiciones descritas en la Figura 42, pero controlando sólo el nivel mínimo de temperatura (30°C) de uno de los cultivos (B). A los tiempos indicados se midió la temperatura de la suspensión celular y se determinó la concentración de clorofila.

10°C a lo largo del día, el no sometido a control. De hecho la productividad en régimen semicontinuo fue similar en ambos casos ($10 \text{ g(peso seco) m}^{-2} \text{ día}^{-1}$).

III.C.9. EFECTO DEL pH DEL MEDIO SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

Otro de los factores que influyen decisivamente sobre el crecimiento y la productividad es el pH del medio de cultivo. En la Figura 47 se presentan las curvas de crecimiento de A. variabilis obtenidas a varios valores de pH, que se establecieron en cada caso añadiendo diversas cantidades de bicarbonato sódico. Los mejores crecimientos se obtuvieron a pH entre 7,4 y 8,6. A valores de pH alrededor de 9 el crecimiento celular fue significativamente menor, no prosperando las células a pH próximos a 9,5.

La Tabla XIII recoge los valores medios de productividad obtenidos en cultivos semicontinuos a diferentes valores de pH. El valor óptimo de productividad, hacia $8,5 \text{ g(peso seco) m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, se alcanzó a valores de pH entre 8,2 y 8,4, siendo ligeramente inferior a pH 7,4-7,8. A pH entre 9,0 y 9,4 la productividad descendió significativamente, siendo nula por encima de pH 9,7.

III.C.10. VARIACION DEL pH DEL MEDIO CON LA RADIACION SOLAR

El crecimiento fotoautotrófico de A. variabilis con lleva la incorporación del carbono inorgánico disponible en el medio de cultivo. Este proceso asimilatorio dependiente de la luz se traduce, durante los periodos de iluminación, en un aumento del pH cuando el aporte de CO_2 es insuficiente. En efecto, la Figura 48 muestra la variación del pH, a lo largo del día y de la noche, de sendos cultivos de A. variabilis, burbujeados con aire y con aire enriquecido en CO_2 . En tanto que el pH de este último cultivo apenas experimentó oscilaciones, el cultivo burbujeado sólo con aire sufrió cambios significativos de pH a lo largo de los ciclos luz-oscuridad, respondiendo el cambio de pH producido, con máximos al mediodía, al nivel de irradiancia.

En relación con el efecto de la irradiancia sobre el pH puede verse en la Figura 49 que el pH de un cultivo burbujeado con aire enriquecido en CO_2 se mantuvo prácticamente constante

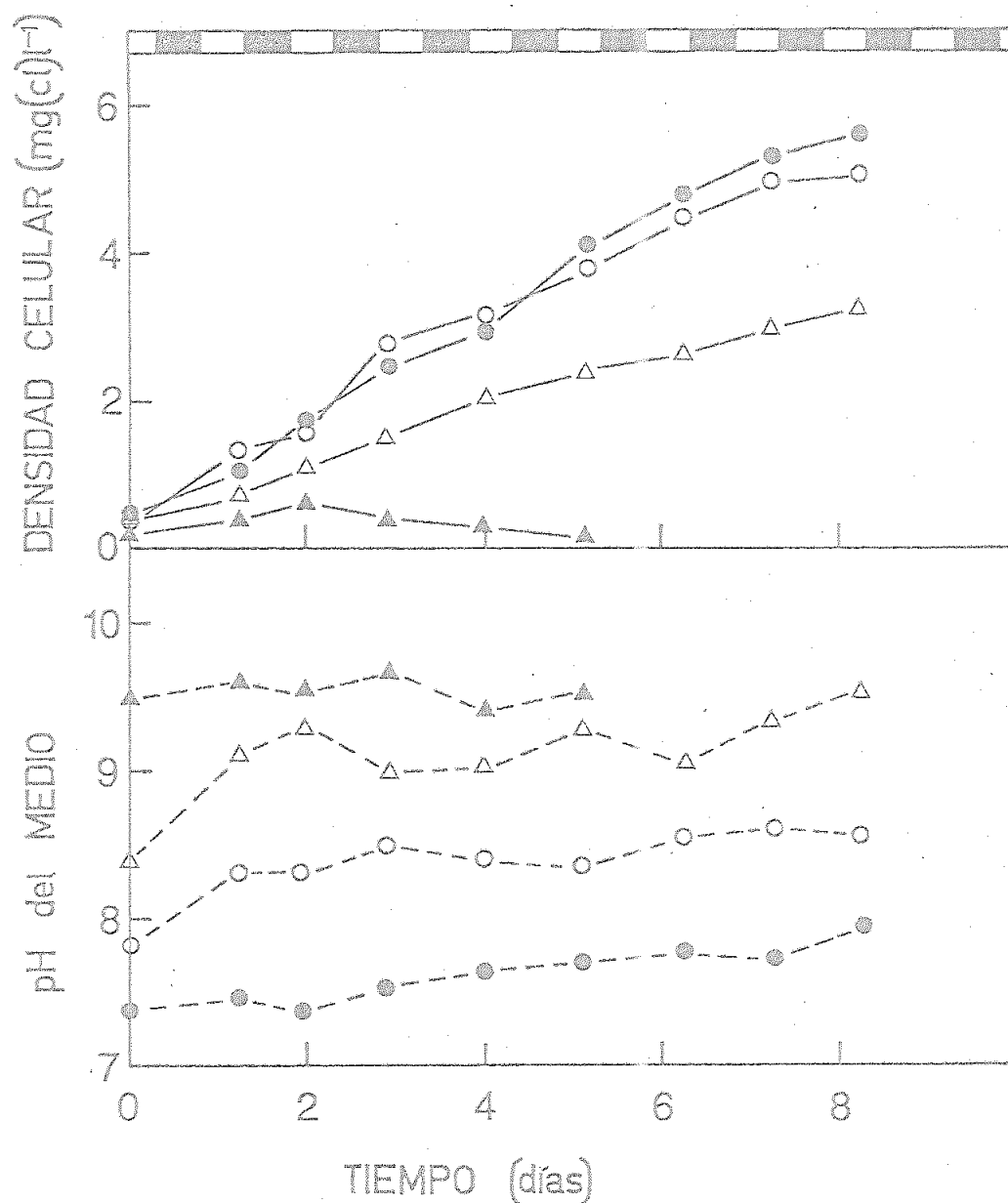


Figura 47. Efecto del pH del medio sobre el crecimiento de *A. variabilis* en cultivo estanco al aire libre. Las células se cultivaron durante el mes de Abril en las condiciones descritas en la Figura 42, excepto que el aire se suplementó con CO_2 al 0,5% (v/v). Los inóculos utilizados procedían de cultivos adaptados previamente a las diferentes concentraciones de bicarbonato sódico que se indican: 0 (●); 5 mM (○); 10 mM (△), y 20 mM (▲).

TABLA XIII

EFFECTO DEL pH DEL MEDIO SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE A. variabilis EN
CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE

pH del medio	NaHCO ₃ añadido	Productividad
	(mM)	(g(peso seco) m ⁻² día ⁻¹)
7,4-7,8	0	7,9±2,2
8,2-8,4	5	8,5±1,8
9,0-9,4	10	4,8±0,6
9,7-9,9	20	0

Los cultivos se llevaron a cabo durante el mes de Abril en las condiciones descritas en las Figuras 42 y 47. la densidad mínima de los cultivos se mantuvo a 2 mg(cl) l⁻¹ mediante diluciones diarias de la suspensión celular. Los valores de productividad mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cuatro días consecutivos.

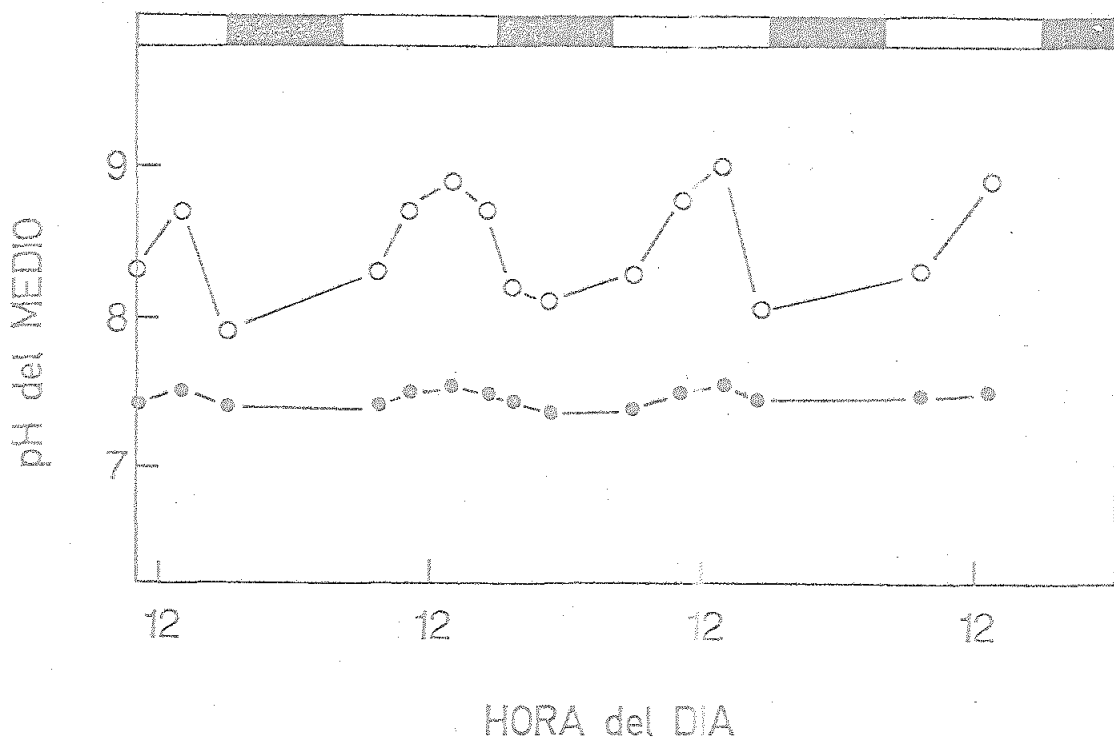


Figura 48. Efecto de los ciclos luz-oscuridad y del suministro de CO_2 sobre el pH de un cultivo semicontinuo de *A. variabilis* al aire libre. El experimento se llevó a cabo durante el mes de Agosto en las condiciones descritas en la Figura 42. Uno de los cultivos (○) se burbujeó con sólo aire, y el otro (●) con aire enriquecido en CO_2 al 1% (v/v). A los tiempos indicados se midió el pH de ambas suspensiones celulares. El tiempo se expresa en horario GMT.

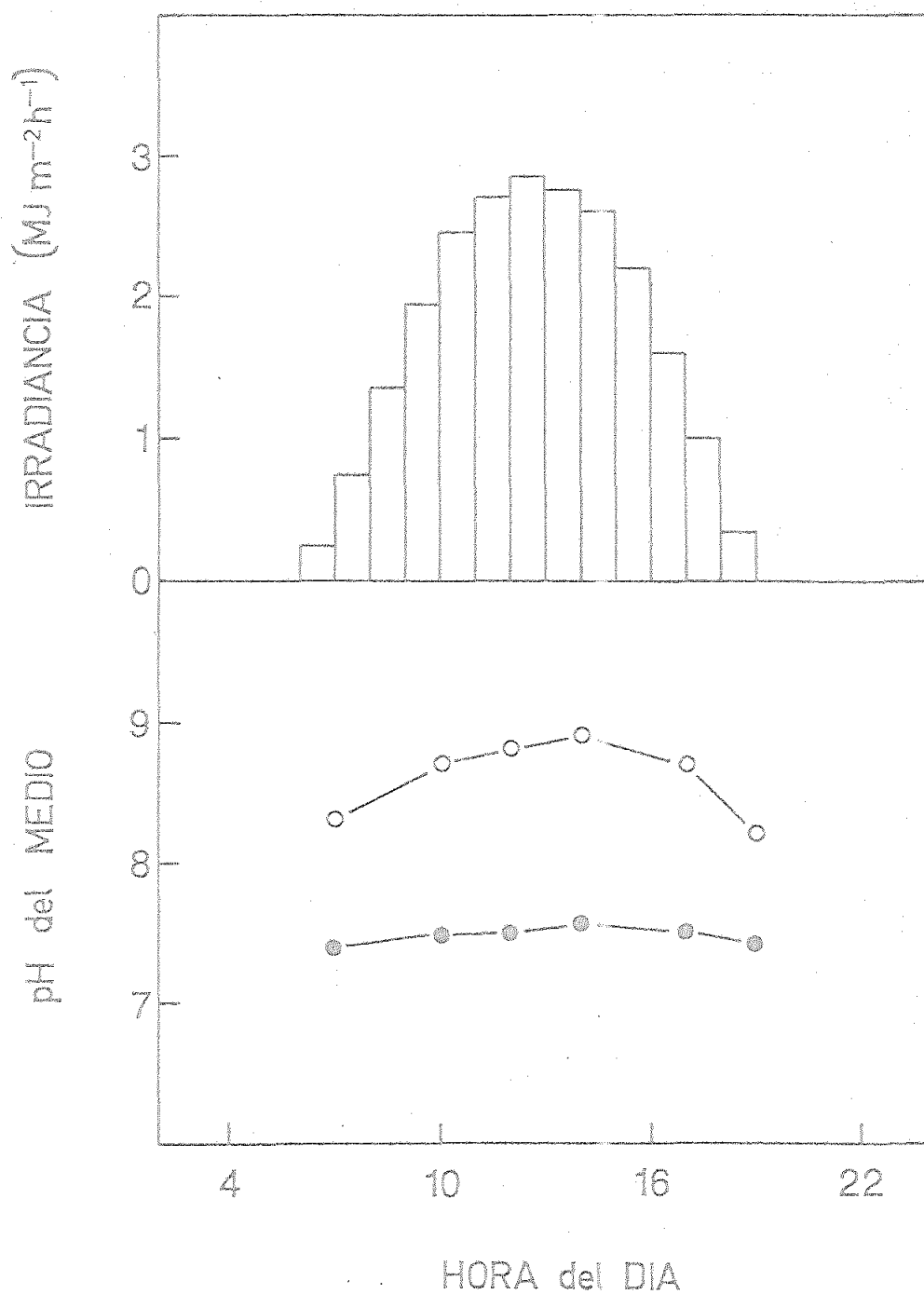


Figura 49. Evolución del pH de un cultivo semicontinuo de *A. variabilis* con la radiación solar a lo largo del día. Los datos corresponden a los valores de pH de los cultivos descritos en la Figura 48 y a los de irradiancia a que estuvieron expuestos. El tiempo se expresa en horario GMT.

entre 7,4 y 7,6. Por el contrario, en otro cultivo cuyo aire de gaseo no se suplementó con CO_2 el pH aumentó al no poder suplir el aire por sí solo el requerimiento en carbono inorgánico -tanto mayor conforme aumenta la irradiancia- y hacer uso del bicarbonato. Cuando la irradiancia solar empieza a decaer también lo hace el pH. Los datos presentados en la Figura 49 muestran el fenómeno con mayor detalle, especificando no sólo los valores del pH de los cultivos, sino los de la irradiancia solar a lo largo de un día. Se ha de constatar que las oscilaciones de pH son de casi una unidad durante el día, habiéndose obtenido en ciertas condiciones de cultivo cambios de hasta casi dos unidades.

III.C.11. EFECTO DE OTROS FACTORES SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

El cultivo de microalgas a gran escala exige también el estudio de otros factores que pueden incidir sobre la productividad o bien disminuir los costos de producción o recogida de la biomasa.

III.C.11.1. Efecto de la interrupción de la aireación durante la noche

Los experimentos hasta ahora descritos se llevaron a cabo manteniendo constante el burbujeo de aire durante el día y la noche. Sin embargo, y puesto que la asimilación fotosintética del carbono sólo puede realizarse durante los periodos de luz, se planteó también una serie de experimentos en los que se interrumpía la aireación durante la noche a fin de conocer el comportamiento de los cultivos en dichas condiciones y de economizar electricidad y CO_2 .

Para cuantificar el efecto de la interrupción de la aireación sobre la productividad se realizaron sendos cultivos interrumpiendo la aireación en uno de ellos durante la noche (desde las 18 h a las 7 h del día siguiente), y manteniendo el otro aireado permanentemente. El crecimiento de ambos cultivos fue similar durante los cuatro primeros días, y sólo a partir de una densidad de 3 mg de clorofila por litro comenzó a haber cierta diferencia a favor del cultivo constantemente aireado (Figura 50). Por otra parte la actividad de fijación de N_2 siguió una evolución paralela en

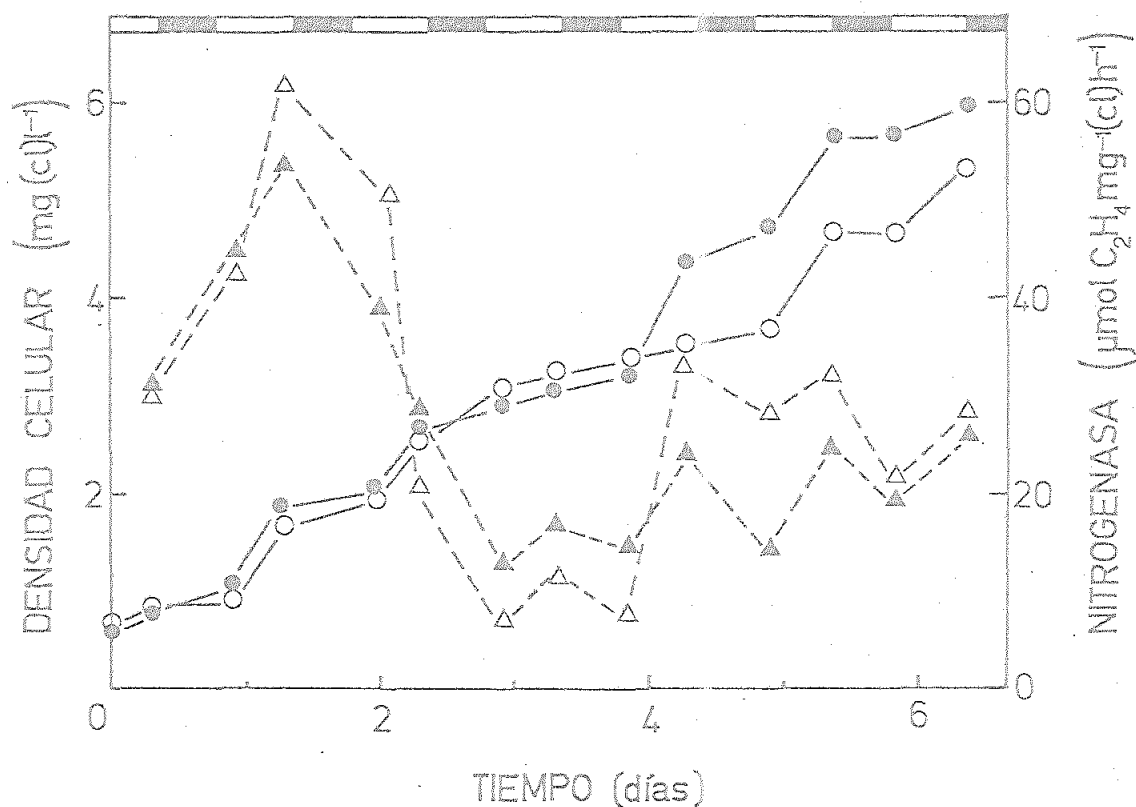


Figura 50. Efecto de la interrupción de la aireación durante la noche sobre el crecimiento y la actividad nitrogenasa de *A. variabilis* en cultivo estanco al aire libre. Los cultivos se llevaron a cabo durante el mes de Junio en las condiciones descritas en la Figura 36. Uno de ellos se burbujeó continuamente con aire enriquecido en CO_2 al 2% (símbolos negros), mientras que el otro se dejó de airear durante la noche (símbolos blancos). A los tiempos indicados se determinó la clorofila (círculos) y se ensayó la actividad nitrogenasa (triángulos).

ambos cultivos, alcanzándose los niveles máximos durante la fase diurna a baja densidad celular, hacia el primer día de cultivo (Figura 50).

A partir de los datos de la Figura 42 se eligieron tres densidades, a saber 2,5, 3,5 y 4,5 $\text{mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$, para estudiar en cultivos semicontinuos la incidencia de la interrupción del burbujeo de aire sobre la densidad óptima. En la Tabla XIV se comparan las productividades alcanzadas, pudiendo comprobarse que en ambos tipos de cultivos las mejores densidades oscilaron entre 2,5 y 3,5 $\text{mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$. Las productividades medias oscilaron aproximadamente entre 9 y 12 $\text{g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ para los cultivos con aireación interrumpida, y entre 13 y 16 $\text{g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ para los de aireación continua.

En cuanto a la profundidad, la óptima para ambos tipos de cultivo resultó ser de 25 cm. Las productividades medias fluctuaron entre 9 y 12 $\text{g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ para los cultivos con aireación interrumpida, y entre 12 y 16 $\text{g}(\text{peso seco}) \text{ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ para los de aireación permanente (Tabla XV).

III.C.11.2. Efecto de la densidad inicial del cultivo

En principio, tanto la densidad inicial de la suspensión celular tras la inoculación como la hora del día en que se realiza el inóculo juegan un papel importante en el buen comienzo del cultivo. Un cultivo de algas de baja población celular puede sufrir al ser expuesto a una irradiancia elevada un proceso de blanqueamiento que acarrea su deterioro. La luz solar alcanza valores de irradiancia elevados a determinadas horas del día como en algunas épocas anuales. Para profundidades de 20 cm es suficiente inocular la suspensión celular a 0,4 $\text{mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$. En efecto, dos cultivos en cubetas de dicha profundidad inoculados en idénticas condiciones a 0,4 y 1 $\text{mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$, presentaron crecimientos paralelos y tiempos de generación próximos a dos días. Por otro lado, la actividad de fijación de N_2 del cultivo más diluido fue mayor al comienzo, pero exhibió valores similares una vez alcanzadas densidades superiores a 2 $\text{mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$. Utilizando profundidades de 25-30 cm se logró desarrollar cultivos partiendo de densidades iniciales todavía más bajas, de hasta 0,1 $\text{mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$ (datos no presentados).

TABLA XIV

EFFECTO DE LA INTERRUPCION DE LA AIREACION DURANTE LA NOCHE SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE A. variabilis EN CULTIVOS SEMICONTINUOS AL AIRE LIBRE DE DISTINTA DENSIDAD CELULAR

Densidad celular (mg(cl) l ⁻¹)	Productividad (g(peso seco) m ⁻² día ⁻¹)	
	aireación continua	aireación interrumpida
2,5	15,5±1,6	12,2±1,4
3,5	15,6±2,0	11,8±1,6
4,5	12,6±1,8	9,2±1,1

Los cultivos se llevaron a cabo durante el mes de Julio en las condiciones descritas en la Figura 42, pero interrumpiendo, donde se indica, la aireación desde las 18 hasta las 7 h. Los valores de productividad mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas durante seis días consecutivos.

TABLA XV

EFFECTO DE LA INTERRUPCION DE LA AIREACION DURANTE LA NOCHE SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE A. variabilis EN CULTIVOS SEMICONTINUOS AL AIRE LIBRE DE DISTINTA PROFUNDIDAD

Profundidad (cm)	Productividad (g(peso seco) m ⁻² día ⁻¹)	
	aireación continua	aireación interrumpida
15	12,2±1,4	10,6±1,5
20	14,4±1,9	11,1±1,7
25	15,6±2,0	11,8±1,6
30	12,1±2,3	8,6±1,7

Los cultivos se llevaron a cabo durante el mes de Julio en las condiciones descritas en la Figura 42, pero interrumpiendo, donde se indica, la aireación desde las 18 hasta las 7 h. La densidad se mantuvo a 3,5 mg(cl) l⁻¹ mediante diluciones diarias de la suspensión celular. Los valores de productividad mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de seis días consecutivos.

III.C.11.3. Efecto del horario de recogida de las células

La hora del día en que se realiza la recogida del material celular incide también sobre la productividad. El experimento desmotrativo de este efecto consistió en comparar los valores de productividad alcanzados durante el mes de Julio, en cultivos cuyas células se recolectaron por la mañana temprano o al atardecer. Para este fin se dispusieron en paralelo, en sendas cubetas de 25 cm de profundidad, dos cultivos de *A. variabilis* regulados a 30°C y burbujeados constantemente con aire enriquecido en CO₂ al 1% v/v. La recogida de las células y la pertinente dilución de los cultivos se efectuó a las 7-8 horas en un caso, y a las 18-19 horas en el otro. Tras cinco diluciones consecutivas la productividad del cultivo reciclado por la mañana fue de 15,4±2,7 g(peso seco) m⁻² día⁻¹ frente a 12,7±3,8 g(peso seco) m⁻² día⁻¹ la del cultivo reciclado por la tarde, lo que evidencia que es favorable la realización del reciclaje al inicio del día.

III.C.12. EFECTO DE LA IRRADIANCIA, PROFUNDIDAD Y DENSIDAD CELULAR SOBRE EL CONTENIDO EN CLOROFILA Y NITROGENO DE LAS CELULAS

La variación de la irradiancia solar a lo largo del día promueve diversos efectos que pueden provocar respuestas adaptativas por parte de las células del cultivo. Como muestra la Figura 51, uno de los primeros efectos que se aprecia al pasar al aire libre un cultivo desarrollado en condiciones controladas de laboratorio es el descenso en el contenido en clorofila de las células. Cuando el nivel celular de clorofila se analiza cada día a la misma hora se observa que disminuye progresivamente respecto al peso seco durante los 3-4 primeros días de cultivo, hasta estabilizarse.

Además de esta adaptación progresiva de las células a la luz ambiental a lo largo del tiempo, también se observan oscilaciones periódicas en el contenido en clorofila como consecuencia de la adaptación celular a los ciclos luz-oscuridad. En efecto, la Figura 52 muestra que el contenido en clorofila alcanza su máximo a primeras horas de la mañana, posiblemente como resultado de la adaptación de las células a la falta de luz durante la noche, lo que se traduce en una síntesis extra de pigmentos.

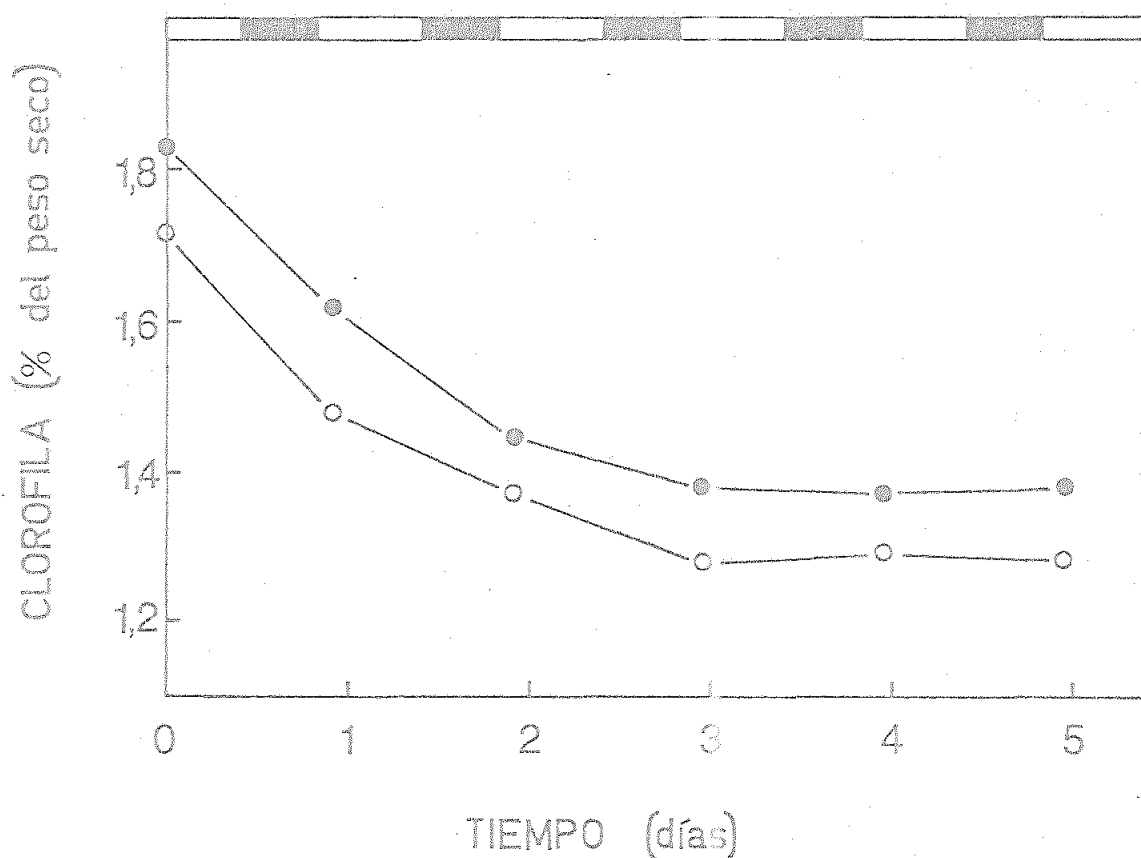


Figura 51. Evolución del contenido en clorofila de un cultivo de la
laboratorio de A. variabilis como consecuencia de su adapta
ción a condiciones exteriores. Se inocularon dos botello
 nes conteniendo 20 l de medio con células de A. variabi
lis y se cultivaron en cámara a 30°C con luz de 40 W m⁻²,
 burbujeando uno de ellos con aire suplementado con CO₂
 al 1% (v/v) (●), y el otro con sólo aire (○), ambos a un
 caudal de 60 l l⁻¹h⁻¹. Cuando la densidad celular alcan
 zó un valor entre 4 y 5 mg(cl) l⁻¹ se trasvasaron ambos
 cultivos a sendos recipientes de 0,25 m² de superficie,
 situados al aire libre, y se les añadió medio fresco has
 ta una altura de 25 cm. El experimento se realizó durante
 el mes de Agosto, impidiéndose que la temperatura de las
 suspensiones celulares descendiera por debajo de 30°C y
 manteniendo las condiciones de agitación y el enriqueci
 miento en CO₂ al mismo régimen de caudal usado previamen
 te en el laboratorio. A los tiempos indicados tras la
 transferencia al aire libre se determinó la clorofila y
 el peso seco.

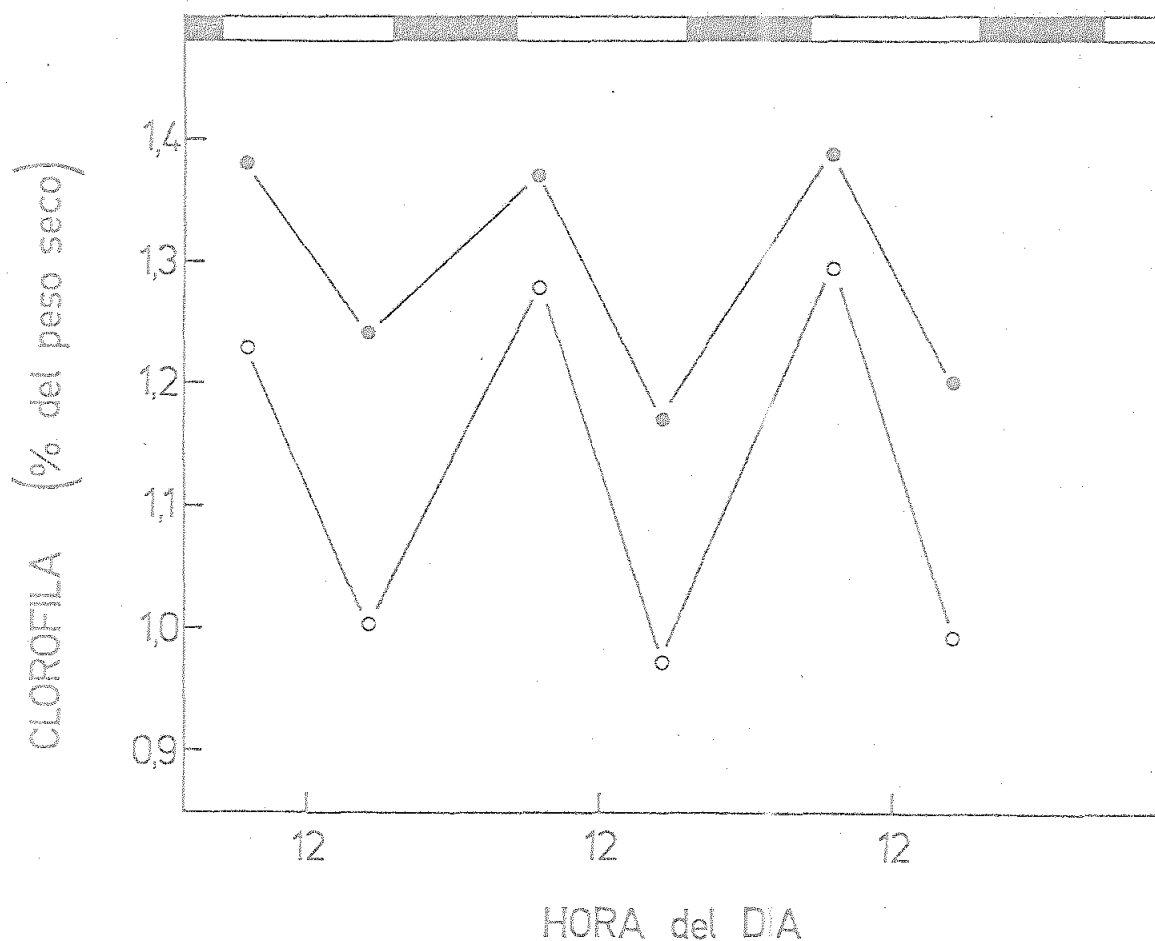


Figura 52. Efecto de los ciclos luz-oscuridad sobre el contenido en clorofila de *A. variabilis* en cultivo semicontinuo al aire libre. Los cultivos se llevaron a cabo durante el mes de Agosto en las condiciones descritas en la Figura 42. Uno de ellos se burbujeó con aire suplementado con CO₂ al 1% (v/v) (●), mientras que el otro se burbujeó con sólo aire (○). La densidad celular se mantuvo a un nivel mínimo de 3 mg(cl) l⁻¹ mediante diluciones de los cultivos cada mañana. La clorofila y el peso seco se determinaron cada día por la mañana (antes de cada dilución) y por la tarde. El tiempo se expresa en horario GMT.

Si este comportamiento celular respecto al contenido en clorofila a lo largo del día se relaciona con la irradiancia solar se observa que la concentración de clorofila comienza a disminuir tras el amanecer, como consecuencia del aumento de la irradiancia solar, alcanzando su valor mínimo al atardecer, es decir, tras la recepción de prácticamente toda la energía solar diaria. Hacia las 20 h se inicia una recuperación hasta lograr nuevamente, a la mañana siguiente, el nivel máximo original de clorofila en las células (Figura 53). En correspondencia directa con el contenido en clorofila, las células presentaron también mayor contenido en nitrógeno por la mañana (9,8% en peso seco, a la 7 h) que por la tarde (9,1% en peso seco, a las 19 h).

La profundidad y densidad celular de los cultivos ejercen también un marcado efecto sobre el contenido en clorofila de las células. Como muestra la Figura 54 A, el contenido en clorofila respecto al peso seco aumenta con la profundidad del cultivo, pasando de 0,92% para una profundidad de 15 cm a 1,58% para 55 cm. Análogamente, la Figura 54 B muestra que al aumentar la densidad celular de la suspensión se incrementa también el contenido en clorofila en relación al peso seco, que pasa de 1,21%, para una densidad celular de $2 \text{ mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$, a 1,61%, para una densidad de $4,5 \text{ mg}(\text{cl}) \text{ l}^{-1}$.

La profundidad del cultivo tiene también un efecto notable no sólo sobre la concentración celular de clorofila, sino sobre el contenido en nitrógeno de las células. Como muestra la Figura 55, el contenido en clorofila respecto al peso seco de las células aumenta del 1,25% al 1,47% y el de nitrógeno de 9,39 a 10,20, al incrementar la profundidad de la suspensión de 15 a 30 cm. Los hechos mencionados parecen reflejar una adaptación celular a la disminución de la luz disponible, tanto al ser los cultivos más profundos como al aumentar la densidad. El contenido en nitrógeno puede relacionarse con el incremento en el nivel de pigmentos fotosintéticos bajo condiciones de escasa disponibilidad de luz, puesto que los pigmentos antena mayoritarios en las cianobacterias son las ficobiliproteínas.

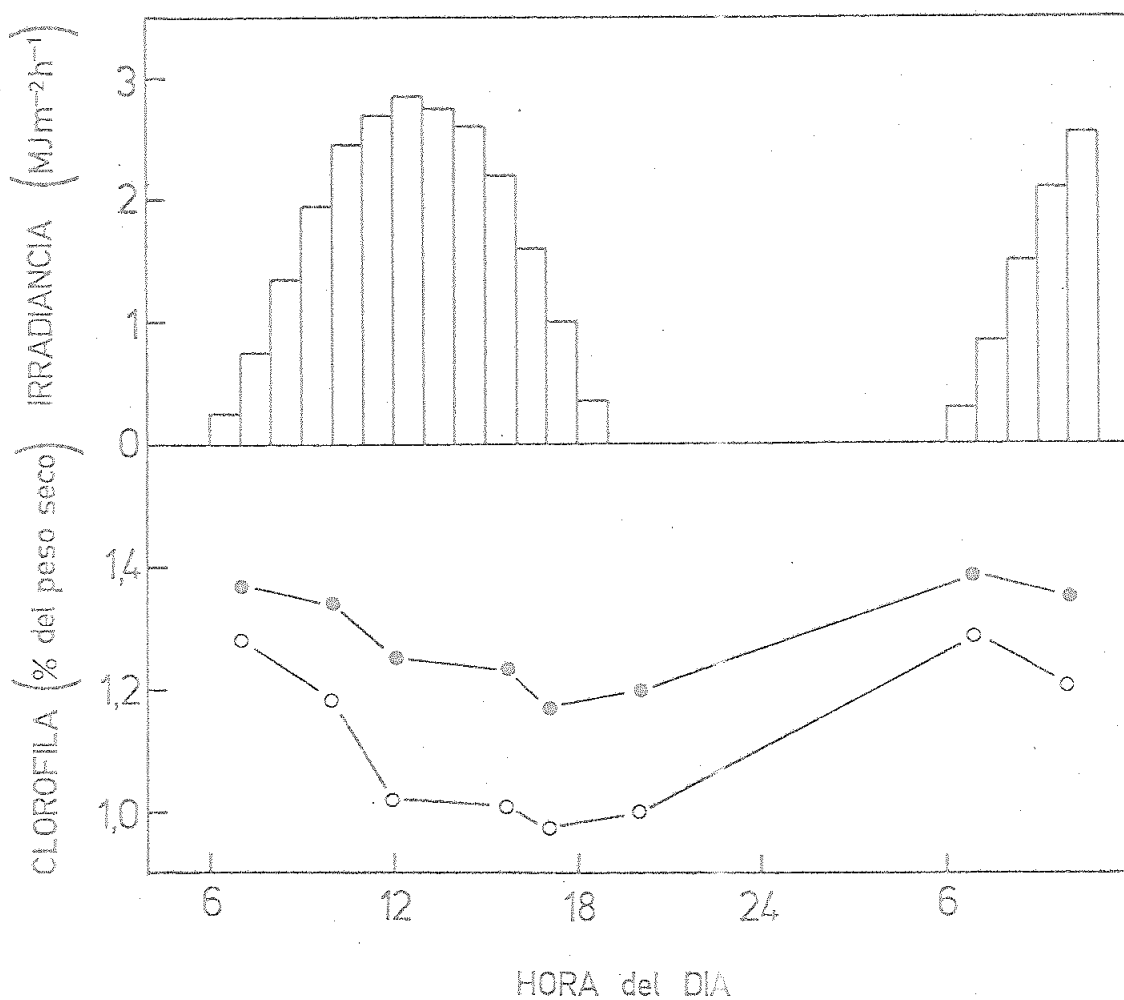


Figura 53. Evolución del contenido en clorofila de un cultivo semi-
continuo de A.variabilis con la radiación solar a lo lar
go del día. Los datos corresponden a los valores del con
 tenido en clorofila de los cultivos descritos en la Figu
 ra 52, a lo largo del día, así como a los de la irradian
 cia a que estuvieron expuestos. El tiempo se expresa en
 horario GMT.

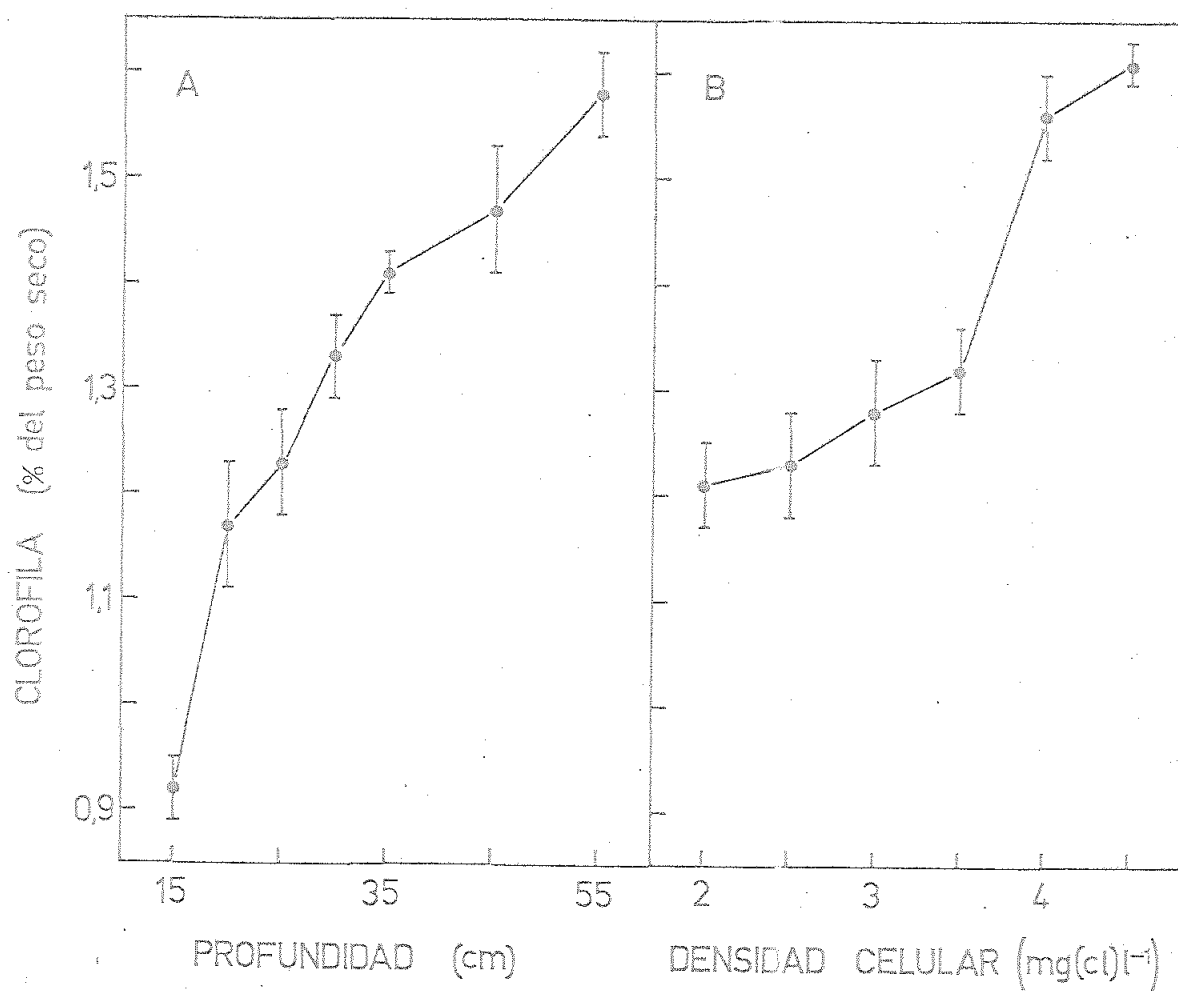


Figura 54. Variación del contenido en clorofila de *A. variabilis* en relación con la profundidad y densidad de la suspensión celular en cultivos semicontinuos al aire libre. Los datos presentados corresponden a los experimentos estivales descritos en las Figuras 42 y 43. Los valores mostrados, con sus respectivas desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cuatro (A) y seis (B) días consecutivos.

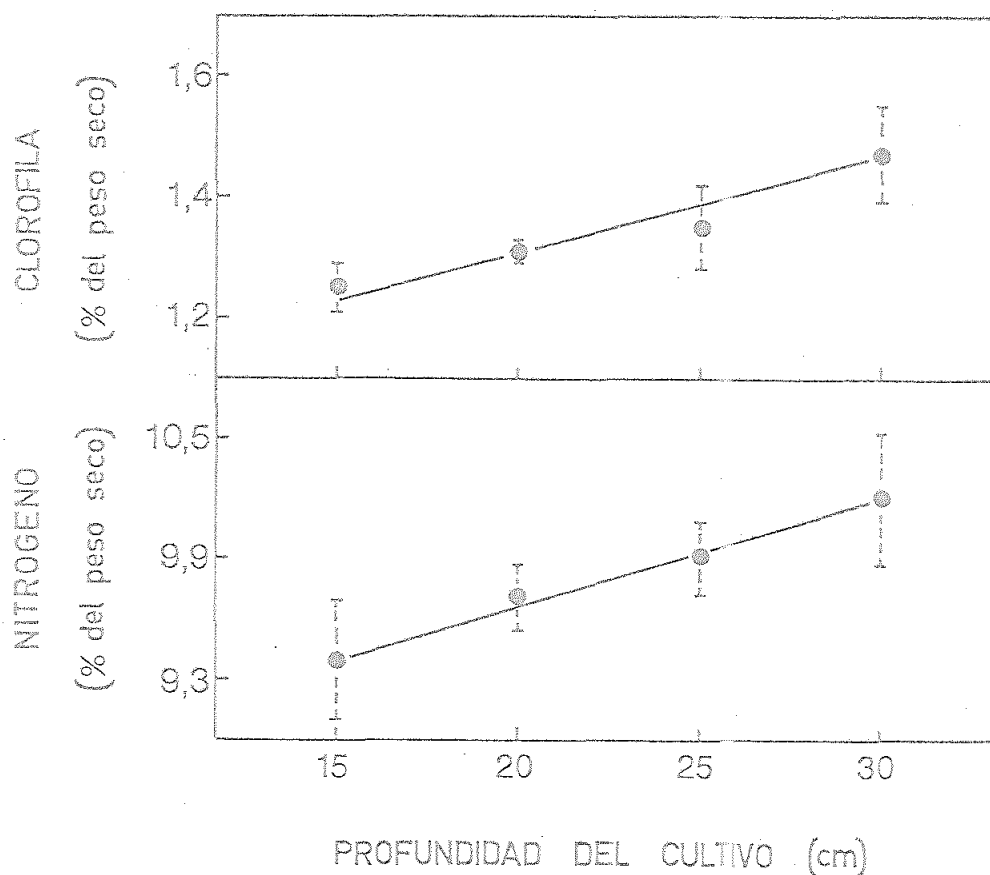


Figura 55. Efecto de la profundidad del cultivo sobre el contenido en clorofila y nitrógeno de las células de *A. variabilis* en cultivo semicontinuo al aire libre. El experimento se realizó durante el mes de Julio en recipientes de $0,25 \text{ m}^2$ de superficie. La densidad mínima de las suspensiones celulares se mantuvo a $3,5 \text{ mg(cl) l}^{-1}$, y la profundidad se varió según se indica. Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de tres días consecutivos.

III.C.13. PRODUCTIVIDAD DE CULTIVOS SEMICONTINUOS EN ESTANQUES DE 10 m²

Como paso previo e indispensable para poder emprender el cultivo masivo de cianobacterias en grandes extensiones, se instaló un estanque de 10 m² de superficie, que, al igual que las cubetas de menor tamaño, disponía en su fondo de un entramado tubular para el gaseo de aire. Utilizando este estanque de cultivo se realizaron una serie de experimentos con el fin de optimizar el crecimiento y la productividad de A. variabilis a esta nueva escala.

La Figura 56 muestra los datos obtenidos en un experimento sobre productividad, realizado durante el mes de Septiembre, en el que se mantuvo la densidad del cultivo, por ser la óptima en las condiciones del ensayo, entre 2 y 2,5 mg de clorofila por litro. La productividad media alcanzada fue de $9,6 \pm 2,4$ g(peso seco) m⁻²día⁻¹.

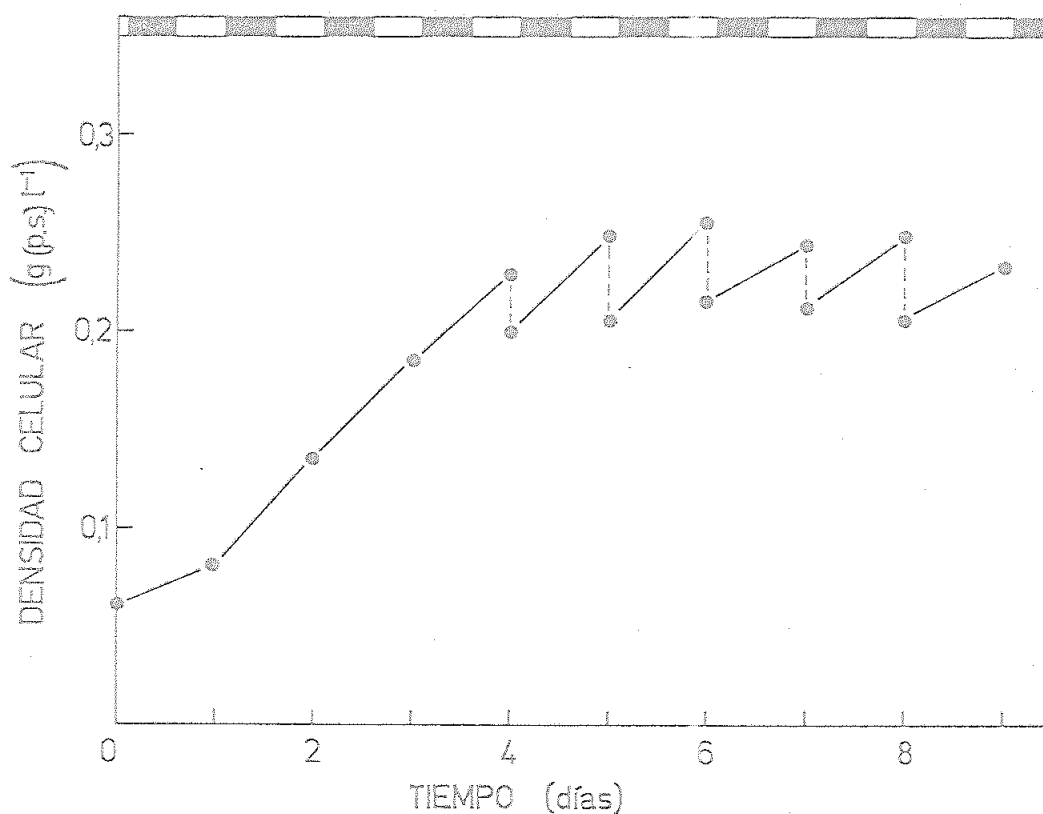


Figura 56. Cultivo semicontinuo al aire libre de *A. variabilis* con aireación forzada en un estanque de 10 m² de superficie. El experimento se llevó a cabo durante el mes de Septiembre, utilizando 2500 l de medio (25 cm profundidad). La temperatura mínima se controló a 30°C y la suspensión se agitó durante el día con aire suplementado en CO₂ al 1% (v/v). El cultivo se inició con un inóculo de 360 litros de una suspensión celular previamente cultivada en las mismas condiciones en seis recipientes conteniendo 60 l cada uno. A los tiempos indicados se determinó la clorofila y el peso seco. Una vez alcanzada una densidad de 2,5 mg(cl) l⁻¹ (0,2 g peso seco por litro) se realizaron diluciones diarias sucesivas con medio de cultivo fresco (rayas discontinuas) para mantener la suspensión celular a esa densidad.

III.D. CULTIVO DE Anabaena variabilis A LA INTEMPERIE CON AGITACION MEDIANTE PALETAS

III.D.1. PRODUCTIVIDAD EN CULTIVO SEMICONTINUO. EFECTO DEL CO₂

Uno de los principales problemas que presenta el sistema de agitación por aireación en el cultivo de microalgas es el elevado costo económico en sus tres vertientes de instalación, uso y mantenimiento. Por ello, y con vistas a una aplicación a mayor escala, hubo que plantear su sustitución por otro más rentable, que permitiera alcanzar, al menos, los valores de productividad ya logrados. El nuevo sistema elegido fue el de agitación por paletas giratorias sumergidas en la suspensión celular.

En el apartado III.C.4. se puso de manifiesto que un caudal de aire igual o superior a $60 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$ basta para suministrar el N₂ y CO₂ necesarios para conseguir una alta productividad. Puesto que el aporte de CO₂ suministrado exclusivamente por el movimiento de las paletas podía ser insuficiente en el nuevo sistema, se ensayó el efecto de suplementar los cultivos con CO₂ puro a un caudal de 20 ml por litro de suspensión y hora. Estos experimentos se realizaron en Invierno y en Verano, comprobándose que el suministro de CO₂ al régimen de caudal citado se traduce en un aumento apreciable en la productividad de A. variabilis (Tabla XVI).

III.D.2. COMPARACION ENTRE LOS SISTEMAS DE AGITACION CON PALETAS Y DE AIREACION FORZADA

Para tener un conocimiento real de cuál de los dos sistemas de agitación ensayados -aireación forzada o paletas- es más conveniente para su posible aplicabilidad a gran escala, se realizaron experimentos con ambos sistemas y en dos épocas del año a fin de comparar las productividades alcanzadas. En la Tabla XVII se resumen los valores de productividad logrados con uno y otro sistema, destacando el hecho de que, tanto en Invierno como en Verano, la agitación por paletas permitió mayores productividades, del orden de 8 y 22 g(peso seco) m⁻²día⁻¹, respectivamente.

A partir de los mencionados datos de productividad (Tabla XVII) y de irradiancia, y teniendo en cuenta que el calor de

TABLA XVI

PRODUCTIVIDAD DE A. variabilis EN CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE
CON UN SISTEMA DE AGITACION POR PALETAS EN VERANO E INVIERNO. EFECTO
DEL SUMINISTRO DE CO₂

Estación	Productividad	
	(g(peso seco) m ⁻² día ⁻¹)	
	<u>sin CO₂</u>	<u>con CO₂</u>
Verano	21,1±2,3	24,7±2,5
Invierno	6,5±0,8	9,8±1,3

Los cultivos se llevaron a cabo a 30°C durante los meses de Agosto (Verano) y Diciembre (Invierno) en recipientes de 0,25 m² de superficie y 25 cm de profundidad y se agitaron por el sistema de paletas (19 rpm). Donde se indica se suministró CO₂ a un caudal de 20 ml l⁻¹h⁻¹. La densidad mínima de los cultivos se mantuvo a 3 y 1,5 mg(cl) l⁻¹ en Verano e Invierno, respectivamente, mediante diluciones diarias. Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cinco (Verano) y tres (Invierno) días consecutivos.

TABLA XVII

PRODUCTIVIDAD DE A. variabilis EN CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE
CON DOS SISTEMAS DIFERENTES DE AGITACION

Sistema de agitación	Productividad	
	(g(peso seco) m ⁻² día ⁻¹)	
	<u>Verano</u>	<u>Invierno</u>
Aireación forzada	16,8±2,1	5,8±1,5
Paletas	22,1±1,9	8,2±2,3

Los cultivos se llevaron a cabo paralelamente a 30°C, en recipientes de 0,25 m² de superficie y 25 cm de profundidad, con los dos sistemas de agitación indicados durante los meses de Julio (Verano) y Diciembre (Invierno). Para ambos cultivos se empleó el mismo inóculo, previamente desarrollado en el laboratorio a 30°C, burbujeando aire enriquecido en CO₂ al 1% (v/v). Los cultivos con aireación forzada se burbujearon durante el día con aire enriquecido con CO₂ al 1% (v/v) a un caudal de 60 l l⁻¹h⁻¹, mientras que a los agitados por paletas (19 rpm) se les suministró entre 20 y 30 ml de CO₂ puro por litro y h, también durante el periodo diurno, oscilando su pH entre 7,5 y 8,3. Los cultivos se mantuvieron a una densidad mínima de 3 y 1,5 mg(cl) l⁻¹ en Verano e Invierno, respectivamente, mediante diluciones diarias. Los valores mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cinco (Verano) y tres (Invierno) días consecutivos.

combustión de la biomasa de A. variabilis es de 5,4 kcal (22,6 kJ) g^{-1} (peso seco), se han calculado los valores de la eficiencia de conversión de la energía solar en energía química almacenada en la biomasa. La eficiencia de conversión se sitúa, dependiendo de la estación del año y del sistema de agitación, entre 1,6 y 3,1% del total de la energía solar incidente (Tabla XVIII). Así, en Verano la eficiencia es de 1,6% con el sistema de aireación forzada y de 2,1% con el de agitación por paletas. En Invierno la eficiencia con ambos sistemas es más alta, alcanzando un valor de 2,2% el de agitación por aire y 3,1% el de paletas.

TABLA XVIII

EFICIENCIAS DE CONVERSION DE LA ENERGIA SOLAR EN BIOMASA POR CELU-
LAS DE A. variabilis CON DOS SISTEMAS DE AGITACION

Parámetro	Verano		Invierno	
	aireación <u>forzada</u>	<u>paletas</u>	aireación <u>forzada</u>	<u>paletas</u>
Energía almacena da en la biomasa (kJ m ⁻² día ⁻¹)	380±47	499±43	131±34	185±52
Eficiencia de conversión (%)	1,6	2,1	2,2	3,1

Las condiciones experimentales son las descritas en la Tabla XVII. La irradiancia solar ($23,3 \pm 0,7$, en Verano, y $6,0 \pm 0,7$, en Invierno, MJ m⁻²día⁻¹) es la media correspondiente a los días en que se llevaron a cabo los experimentos. La energía almacenada en biomasa se ha calculado a partir de los valores medios de productividad y del calor de combustión estimado para la biomasa de A. variabilis.

III.E. CULTIVO DE Anabaena ATCC 33047 A LA INTEMPERIE

Para los estudios de productividad se consideró el empleo de otra de las estirpes ensayadas cuyo cultivo pudiera en principio presentar ventajas frente a A. variabilis. A este fin se seleccionó Anabaena ATCC 33047, por tratarse de una estirpe con altos valores de velocidad de crecimiento y contenido en proteína, que posee además mayor tolerancia a la salinidad y pH óptimo más alcalino que A. variabilis.

III.E.1. EFECTO DE LA DENSIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

En relación con la densidad celular, el efecto de este parámetro sobre la productividad de Anabaena 33047 se ensayó durante el Verano en estanques de 1 m^2 de superficie y 20 cm de profundidad, obteniéndose productividades próximas a $20 \text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$ para una densidad celular de 1 a $1,5 \text{ mg(cl) l}^{-1}$ (Tabla XIX). La productividad disminuyó a $17 \text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$ al aumentar la densidad hasta $2,5 \text{ mg}$ de clorofila por litro.

III.E.2. EFECTO DE LA PROFUNDIDAD DE LA SUSPENSION SOBRE LA PRODUCTIVIDAD

En la Tabla XX se recogen las productividades durante el mes de Junio de distintos valores de profundidad (10, 15, 20 y 25 cm) de cultivos de Anabaena 33047 en estanques de 1 m^2 , cuya densidad mínima se mantuvo a $2,5 \text{ mg(cl) l}^{-1}$ de suspensión. La profundidad óptima resultó ser de 10 cm, con una productividad de $22,2 \text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$. La productividad descendió gradualmente con la profundidad, hasta un valor mínimo de $16,6 \text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$ para 25 cm.

III.E.3. CULTIVO EN ESTANQUE DE 10 m^2 CON AGITACION MEDIANTE PALETAS

La Figura 57 muestra los resultados obtenidos a temperatura ambiente con cultivos semicontinuos de Anabaena 33047 realizados durante el Verano en estanques de 10 m^2 , la productividad media fue de $17,8 \pm 2,8 \text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$.

TABLA XIX

EFFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE Anabaena
ATCC 33047 EN CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE CON UN SISTEMA
DE AGITACION POR PALETAS

Densidad celular	Productividad
(mg(cl) l ⁻¹)	(g(peso seco) m ⁻² día ⁻¹)
1	19,9±3,4
1,5	19,7±1,2
2	18,5±1,8
2,5	17,3±2,4

Los cultivos se llevaron a cabo a 30°C durante el mes de Junio en cuatro estanques de 1 m² de superficie. Las suspensiones celulares, con una profundidad de 20 cm y de densidad mínima variable, se agitaron mediante el sistema de paletas (19 rpm), suministrándoseles CO₂ puro durante el periodo luminoso a un caudal entre 10 y 20 ml l⁻¹h⁻¹ a fin de mantener el pH entre 8,5 y 9. Los valores de productividad mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas durante cuatro días consecutivos.

TABLA XX

EFFECTO DE LA PROFUNDIDAD SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE Anabaena ATCC 33047 EN CULTIVO SEMICONTINUO AL AIRE LIBRE CON UN SISTEMA DE AGITACION POR PALETAS

Profundidad	Productividad
(cm)	(g(peso seco) m ⁻² día ⁻¹)
10	22,2±1,3
15	18,2±0,9
20	17,4±1,8
25	16,6±3,6

Los cultivos se llevaron a cabo a 30°C durante el mes de Junio en las condiciones descritas en la Tabla XIX, excepto que la densidad mínima se mantuvo a 2,5 mg(cl) l⁻¹. Los valores de productividad mostrados, con sus correspondientes desviaciones estándar, son la media de las determinaciones realizadas a lo largo de cuatro días consecutivos.

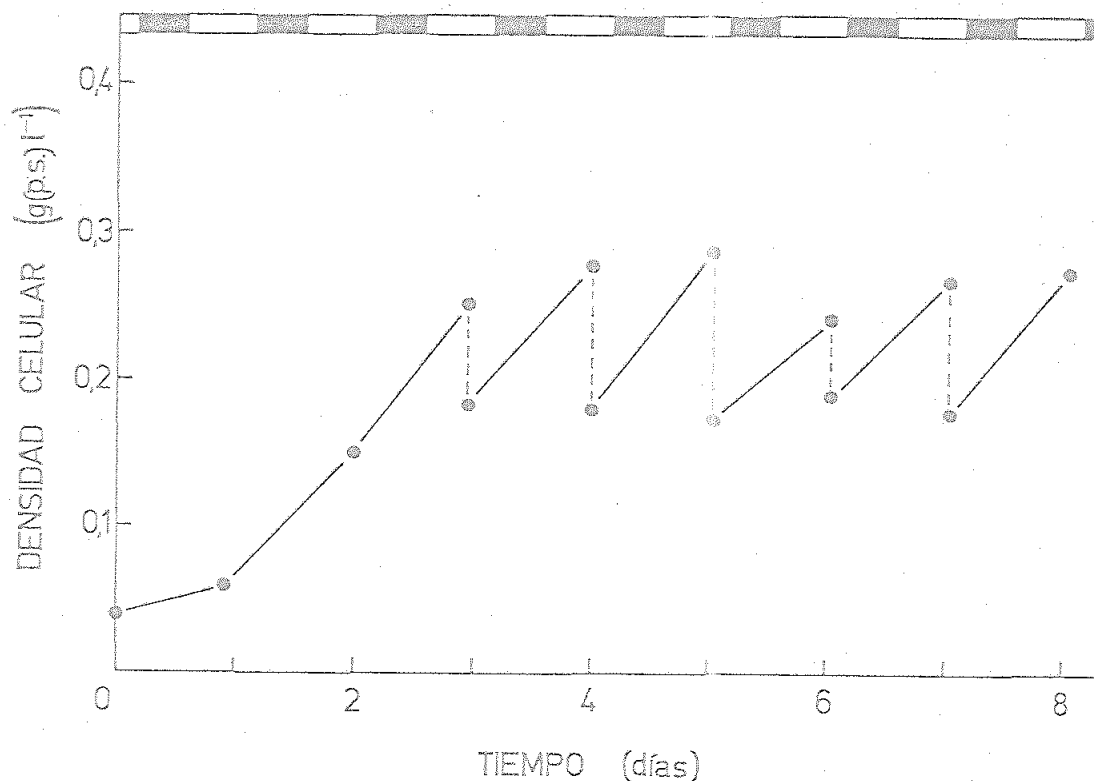


Figura 57. Cultivo semicontinuo al aire libre de Anabaena 33047 con agitación por paletas en un estanque de 10 m² de superficie. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente durante el mes de Junio, utilizando 2000 l de medio (20 cm de profundidad). La suspensión celular se agitó mediante el sistema de paletas (12 rpm) y el estanque se cubrió con un toldo de plástico transparente. El cultivo se inició con un inóculo de 400 l de una suspensión celular previamente cultivada en las mismas condiciones en dos cubetas conteniendo 200 l cada una y se burbujeó CO₂ puro durante el período luminoso a un caudal de 15 ml l⁻¹h⁻¹. A los tiempos indicados se determinó la clorofila y el peso seco. Una vez alcanzada la densidad de 2,5 mg(cl) l⁻¹ (0,2 g de peso seco por litro) se retiraba diariamente parte de la suspensión celular, se separaban las células por decantación y se retornaba el medio al estanque con el fin de mantener la densidad mínima del cultivo a 2,5 mg(cl) l⁻¹.

IV. DISCUSSION

Durante las tres últimas décadas se han dedicado crecientes esfuerzos al estudio del cultivo de microalgas a gran escala con el fin de optimizar las condiciones que permitan una explotación económicamente viable. El presente trabajo representa una contribución en esta línea y se concreta en la utilización de cianobacterias fijadoras de N_2 para la producción de biomasa rica en proteína. Estos microorganismos poseen la doble capacidad de utilizar la energía solar y de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aeróbicas, lo que les confiere características únicas en la biosfera.

Cuando las cianobacterias fijadoras de N_2 se cultivan en un medio exento de nitrógeno combinado, la actividad de la enzima nitrogenasa puede ser factor limitante del crecimiento y, por ende, de la productividad. En efecto, para A. variabilis se ha puesto de manifiesto que existe una estrecha correlación entre la tasa de fijación de N_2 y la velocidad específica de crecimiento (Figura 25), y que el nivel celular de actividad nitrogenasa se afecta por diversos factores. En primer lugar, destaca la caída de actividad que tiene lugar una vez que se inicia la fase exponencial de crecimiento (Ohmori y Hattori, 1972) (apartado III.B.1). Esta pérdida de actividad podría deberse, en principio, a la liberación extracelular de ciertos productos orgánicos nitrogenados (Magee y Burris, 1954; Hood et al., 1969), que al alcanzar cierta concentración en el medio de cultivo, darían lugar a la inhibición de la síntesis o de la actividad de la nitrogenasa. La Figura 19 muestra, sin embargo, que el medio de cultivo no parece contener ningún producto con estas características. En segundo lugar, la oscuridad provoca una drástica disminución de la actividad fijadora de N_2 (apartados III.B.3.2 y III.C.2). Por último, la actividad nitrogenasa aumenta con la irradiancia a que se exponen los cultivos (Figura 24), existiendo una clara correlación entre el nivel de fijación de N_2 y el de la radiación solar en cultivos al aire libre (Figura 40).

Un factor común en los tres casos descritos es la disponibilidad de luz por las células, como lo demuestra la recuperación en los niveles de actividad nitrogenasa que tiene lugar tanto al diluir los cultivos de alta densidad celular como al reiluminar las células mantenidas en la oscuridad. La luz suministra energía química y poder reductor tanto para la reacción catalizada por

la nitrogenasa como para la síntesis de la propia enzima, cuyo nivel viene determinado por el balance entre su velocidad de síntesis y de degradación e inactivación. A este respecto es importante señalar que la nitrogenasa se inactiva irreversiblemente en presencia de O_2 (Stewart y Pearson, 1970; Rippka y Stanier, 1978) y que, bajo condiciones aeróbicas, está continuamente inactivándose por el O_2 y resintetizándose (Murry et al., 1983). En consecuencia, la acción negativa que ejerce la oscuridad puede atribuirse a que, en esas condiciones, se favorece la degradación de la nitrogenasa por el O_2 , sin que esta pérdida de actividad se vea compensada por síntesis de nueva enzima. De hecho, en condiciones de oscuridad y anaerobiosis se han conseguido mantener niveles de actividad nitrogenasa similares a los de un control en la luz (Stewart et al., 1982).

El hecho de que a lo largo del día la actividad nitrogenasa de las cianobacterias presente variaciones de nivel muy acusadas, no es óbice para que se alcancen productividades del mismo orden empleando aire como única fuente de nitrógeno que nitrato o amonio, lo que de por sí supone un considerable ahorro de fertilizantes nitrogenados (apartado III.C.3). En efecto -sobre la base de un contenido en nitrógeno del 10% del peso seco- la producción de 20 g (peso seco) $m^{-2} día^{-1}$ corresponde a la fijación de 2 g de N por m^2 y día. Es decir, aunque el cultivo sólo se llevara a cabo durante 6 meses al año se habrían fijado del orden de 4 toneladas de N por hectárea y año en la biomasa fotosintetizada.

El papel positivo que ejercen los carbohidratos sobre la actividad nitrogenasa -ya comentado por otros autores (Fay, 1965; Watanabe y Yamamoto, 1967; Ernst et al., 1984)- queda claramente demostrado por el hecho de que la presencia de fructosa en el medio permite mantener, en cultivos densos, valores máximos de dicha actividad tanto en la luz como en la oscuridad. Por otro lado existe un cierto paralelismo entre el nivel intracelular de carbohidratos y la actividad nitrogenasa (apartado III.B.2.2).

El efecto de los carbohidratos sobre el nivel de fijación de N_2 podría ejercerse a varios niveles. En primer lugar, los azúcares sintetizados en las células vegetativas que se transportan a los heterocistos (Wolk, 1968), se degradan generando el poder reductor que necesita la nitrogenasa para su actividad. Además

los carbohidratos sirven también como fuente de energía en algunas circunstancias, pues, aunque en la luz el ATP necesario para la actividad nitrogenasa se genera en el heterocisto por fotofosforilación cíclica (Bottomley y Stewart, 1976 y 1977), en la oscuridad el ATP debe sintetizarse por fosforilación oxidativa, a expensas de los electrones que suministra la degradación de los carbohidratos y del oxígeno molecular (Weare y Benemann, 1973 a y b; Fay, 1976).

Otro factor de importancia en el establecimiento de los niveles de actividad nitrogenasa viene determinado por el suplemento de carbono a los cultivos, que exhiben menor actividad cuando se aporta sólo aire que cuando éste se suplementa con CO_2 . Este efecto positivo del CO_2 es particularmente evidente en condiciones de elevada irradiancia (apartado III.3.2).

El aporte adecuado de carbono inorgánico es también de primordial interés para el cultivo de las microalgas. Las cianobacterias presentan una elevada afinidad por el CO_2 (Marcus *et al.*, 1982; Marcus *et al.*, 1983), pudiendo captarlo del medio a concentraciones tan bajas como $10 \mu\text{M}$, que corresponden al CO_2 de la atmósfera (0,03% en volumen) disuelto a 30°C . Cuando las células retiran CO_2 del medio con gran rapidez, por ejemplo en los cultivos de elevada densidad celular o en presencia de alta irradiancia, la disponibilidad de CO_2 libre puede convertirse en factor limitante si la transferencia del CO_2 de la atmósfera no es suficientemente eficaz. Esta limitación puede obviarse bien suministrando aire a caudales elevados o bien enriqueciéndolo en CO_2 . Con aire enriquecido en CO_2 se consiguen elevadas concentraciones de CO_2 disuelto, pero se produce, en principio, una pérdida permanente de CO_2 del cultivo hacia la atmósfera. Por otro lado, si el bicarbonato fuese la única fuente de carbono, el consumo de CO_2 determinaría que el pH del cultivo se elevase y que la concentración de CO_2 se hiciera limitante. El carácter tampón del par $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ permite, mediante la adición conveniente de una y otra especie, mantener la concentración adecuada de CO_2 libre y el pH óptimo del medio para el crecimiento (Goldman *et al.*, 1982; Azov, 1982).

En el sistema de agitación por aireación forzada se logran prácticamente las máximas productividades - $10 \text{ g (peso seco) m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ - a un caudal de $60 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabla IX), que, al cabo

de 12 h de burbujeo diurno, suministra aproximadamente 50 l de CO_2 (2,2 moles = 26 g C) por m^2 (250 l de suspensión celular). Puesto que la biomasa de A. variabilis contiene hacia 50% de carbono, con el caudal antes citado, podrían sintetizarse 52 g (peso seco) $\text{m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, si se asimilase todo el CO_2 burbujeado. Sin embargo, los resultados indican que sólo se aprovecha un 20% del CO_2 aportado (apartado III.C.4).

El aporte de CO_2 , que necesariamente ha de suministrarse a los cultivos para alcanzar su máxima productividad, debe permitir, además, que el pH del medio se mantenga dentro del intervalo óptimo del microorganismo. Si el suministro de CO_2 es insuficiente, las microalgas consumen CO_2 procedente del bicarbonato durante la fase luminosa, con la consiguiente acumulación de carbonato y aumento del pH del medio. Este aumento del pH se correlaciona con la irradiancia recibida (apartado III.C.10). Si se prolonga el periodo de iluminación o la irradiancia es elevada pueden alcanzarse valores tan altos de pH que hagan inviable el crecimiento celular. Durante la noche, el gaseo con aire puede reponer el equilibrio inicial entre las distintas formas de carbono inorgánico, descendiendo el pH de la suspensión celular y permitiendo de nuevo el incremento de biomasa al reiluminarse el cultivo. Cuando el aporte nocturno de aire es insuficiente, el pH no llega a recuperar sus valores iniciales, acentuándose en el siguiente periodo luminoso tanto el aumento de pH como la disminución de carbono inorgánico. Nuestros experimentos con cultivos a la intemperie en recipientes con una superficie libre de $0,25 \text{ m}^2$ demuestran que basta un burbujeo de aire durante la noche a un caudal de $60 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para restablecer los valores originales de pH. En cambio, en cultivos en laboratorio en frascos de Roux burbujeados con sólo aire, el pH del medio experimentó un paulatino incremento con el tiempo, sin que la subida pudiera ser plenamente compensada en los periodos de oscuridad. El mero enriquecimiento en CO_2 del aire burbujeado a través de los cultivos bastaba para evitar estas oscilaciones de pH y carbono inorgánico (apartado III.B.5.2).

La composición molecular de las diferentes estirpes de cianobacterias fijadoras de N_2 empleadas en este trabajo (Tabla II), es similar en términos generales a la descrita para otras cianobacterias (Aaronson et al., 1980). Es particularmente destaca

ble el elevado contenido en proteína (50-60%) que presenta A. variabilis cuando se cultiva con aire como única fuente de nitrógeno (apartados III.A.4, III.B.2.3 y III.C.5).

La composición elemental y molecular de A. variabilis varía a lo largo del crecimiento, afectándose además por factores tales como la temperatura, la irradiancia y el pH (apartados III.A.4, III.B.4.2, III.B.5.2 y III.C.12). Los resultados del análisis elemental de A. variabilis son análogos a los encontrados por Cobb y Myers (1964) para A. cylindrica. Por otro lado, también merece mencionarse el aumento a lo largo del crecimiento del contenido en nitrógeno, carbono e hidrógeno, concomitante con la disminución de oxígeno. Esta variación gradual con el crecimiento refleja ciertamente un incremento en el grado de reducción de la biomasa y, por tanto, en su calor de combustión (Tabla IV), que a partir de la fase exponencial alcanza un valor entre 5,1 y 5,5 kcal g⁻¹, similar al encontrado para otras microalgas (Thomas et al., 1984; Lee et al., 1984). En relación con la composición molecular, cabe señalar que tanto el contenido en proteína como en lípidos y clorofila aumenta al avanzar el crecimiento, a la par que disminuyen los carbohidratos y ácidos nucleicos (Figura 16).

Respecto a los factores que afectan a la composición de las células de A. variabilis, los más destacables son la temperatura y la irradiancia. El contenido en proteína disminuye al aumentar la temperatura del cultivo (Tabla VII, Figura 30), análogamente a lo descrito para Chlorella y Chlorogonium (Lee et al., 1985) y Skeletonema (Hitchcock, 1980). La disminución en el contenido en proteína con el incremento de la temperatura lleva parejo un aumento en carbohidratos (Tabla VII). El contenido en clorofila también disminuye con el aumento de la temperatura de cultivo, en paralelo con la disminución del contenido en nitrógeno y proteína.

La irradiancia a que están sometidas las células influye notablemente sobre su composición elemental y molecular, sobre todo en lo que se refiere al nitrógeno y a los pigmentos. Numerosos autores han puesto de manifiesto la relación inversa entre irradiancia y contenido en clorofila (Myers y Kratz, 1955; Thornber, 1975; Hitchcock, 1980). Nuestros resultados muestran efectivamente que tanto la disminución en la irradiancia como el aumento en

la profundidad o densidad de los cultivos se traduce en un mayor contenido en clorofila y nitrógeno (Figuras 52-55). El aumento en nitrógeno podría deberse a la síntesis extra de proteínas de carácter pigmentario, como la ficocianina. Diversos autores han hecho notar variaciones paralelas en los niveles de clorofila y ficocianina como respuesta a los cambios de irradiancia (Myers y Kratz, 1955; Raps et al., 1983; Healy, 1985).

Otro factor que aparentemente afecta a la composición de A. variabilis es el pH del medio. El valor óptimo de crecimiento encontrado (6,5-8,3) es coincidente en los experimentos realizados en cámara y al aire libre, y concuerda con el determinado por Kratz y Myers (1955) para cultivos de A. variabilis con nitrato como fuente de nitrógeno (apartados III.B.5.1 y III.C.9). Cuando se determina el contenido en clorofila y nitrógeno durante y al final de la fase exponencial de crecimiento, respectivamente, los valores máximos aparecen también localizados en el mismo intervalo de pH antes citado, siendo nuevamente pareja la relación entre ambos. Por el contrario, en la zona alcalina disminuye el contenido en clorofila y nitrógeno. (apartado III.B.5.3).

En relación con la fuente de carbono, el contenido en proteína es muy similar, tanto cuando se burbujean los cultivos sólo con aire como cuando éste se suplementa con CO₂ (Tabla V). Las células de A. variabilis muestran, en general, análoga composición cuando se cultivan a altos caudales de aire con y sin suplemento de CO₂, aunque difieren ligeramente según se cultiven a la intemperie o en el laboratorio (Tablas V y X). En uno y otro caso, tanto el contenido en proteína como en lípidos es muy similar. La constancia del contenido en lípidos revela la escasa capacidad de modificación para estos componentes que presentan las cianobacterias frente a las algas verdes (Piorreck et al., 1984). Los cultivos de laboratorio exhiben mayor contenido en clorofila, mientras que el de carbohidratos es menor. Lo más significativo y de indudable interés práctico es la disminución en ácidos nucleicos, que desciende marcadamente en los cultivos a la intemperie. Otros autores han descrito en Spirulina contenidos en ácidos nucleicos aún más bajos, si bien hay que hacer notar que los análisis fueron realizados tras secar la biomasa, lo que presumiblemente puede alterar su composición (Santillan, 1982; Becker y Venkataraman, 1984).

En la productividad de los cultivos de microalgas a la intemperie influyen fundamentalmente dos tipos de parámetros. En primer lugar, los factores ambientales, a saber, irradiancia solar y temperatura ambiente que vienen impuestos por la estación del año y cuya modificación implica un elevado coste económico. En segundo lugar, los parámetros físicos cuya optimización permite aprovechar al máximo la energía solar, a saber, entre otros, la densidad celular, la profundidad y la agitación o turbulencia de los cultivos. Por tanto, aunque los primeros son, en principio, los que determinan la producción de biomasa, los otros son también básicos, pues su manipulación posibilita optimizar el proceso. Una vez cubiertos los requerimientos nutricionales, la velocidad de crecimiento y, por ende, la productividad dependen en alto grado de estas cinco variables.

Entre los parámetros modificables, la densidad de la población es muy importante porque su adecuada variación a lo largo del año suponen una manera práctica de aprovechar eficientemente la energía luminosa incidente. La velocidad de crecimiento disminuye con la densidad celular, tanto en Invierno como en Verano (apartado III.C.6). Puesto que, para una profundidad de cultivo constante, la productividad viene dada por el producto de la densidad celular por la velocidad de crecimiento, la máxima productividad se alcanza combinando estos parámetros de modo que el aumento de uno compense la disminución del otro (Richmond y Vonshak, 1978).

Otro parámetro de interés es la profundidad de la suspensión, cuya optimización va estrechamente unida a la de la densidad celular. Su modificación es, sin embargo, más complicada porque implica cambios sustanciales en las condiciones del cultivo, que pueden incluso afectar a ciertas características de diseño, tales como altura de las paredes de los estanques, potencia de los motores de agitación, etc. La importancia de este factor es manifiesta, porque cuando se emplean densidades celulares óptimas la luz se absorbe casi completamente en los 2-3 cm superiores de la superficie del cultivo, dejando prácticamente en la oscuridad a la gran mayoría de las células durante un periodo más o menos largo, según el grado de turbulencia (Richmond et al., 1980). Por tanto, la profundidad del cultivo debe fijarse de acuerdo con la densidad celular y las características propias del sistema de agitación (apartado III.C.7).

La turbulencia es factor crítico en la optimización de la productividad de microalgas y viene condicionada por el sistema de agitación y el diseño del estanque. De hecho, la adecuación de las instalaciones de cultivo es de capital importancia. A lo largo de los últimos 30 años se han ensayado diversos sistemas de cultivo de microalgas, tanto de tipo cerrado como abierto (Goldman, 1979a). En este trabajo se han utilizado estanques abiertos al aire libre de sección cuadrada o rectangular y poca profundidad, provistos de sistemas de agitación por aireación forzada o por paletas (Figuras 5-8). En el sistema de aireación forzada el caudal de aire insuflado determina el grado de agitación de la suspensión celular, y el suministro al cultivo de nutrientes en estado gaseoso (N_2 y CO_2). Con un caudal de aire de $60 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$ se alcanzaron prácticamente las máximas productividades, que, en experimentos llevados a cabo en el mes de Mayo (apartado III.C.4), se cifraron en unos $10 \text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$, lo que suponen un aprovechamiento del 20% de todo el CO_2 insuflado. Mientras que el aumento de caudal hasta 90 e incluso $120 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$ no se tradujo en incrementos significativos de productividad, su reducción a $30 \text{ l l}^{-1}\text{h}^{-1}$ resultó en una disminución ostensible de la misma (Tabla IX). Estos resultados sugieren que el descenso en productividad originada por la disminución del caudal puede deberse más bien a una insuficiente turbulencia que a una limitación de carbono inorgánico. Por lo demás, este descenso en productividad no debe tampoco atribuirse a falta de N_2 como sustrato, pues la concentración de este gas en el agua a 30°C es del orden de $0,48 \text{ mM}$, es decir, unas 50 veces mayor que la del CO_2 , y que el contenido en nitrógeno de las células es unas 5 veces menor que el de carbono.

Aunque en el sistema de agitación por paletas la velocidad de giro determina fundamentalmente la agitación de la suspensión celular, su efectividad puede aumentarse mediante mejoras en su diseño o introduciendo en el estanque elementos auxiliares, tales como álabes, que promuevan vórtices en el desplazamiento laminar de la masa acuosa y, en consecuencia, redunden en un mejor aprovechamiento de la energía luminosa por toda la población celular.

El sistema de agitación por paletas permite alcanzar productividades mayores que el de aireación forzada (apartado

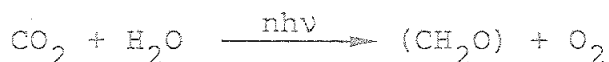
III.D), demostrando que, en ausencia de aire insuflado, el sistema de paletas puede de por sí aportar el N_2 y CO_2 requeridos para conseguir altas productividades de biomasa. A este respecto interesa resaltar que, en experimentos llevados a cabo en estanques de 10 m^2 , la productividad media alcanzada en periodos de una semana fue de $17,8\text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{ día}^{-1}$ con el sistema de paletas (apartado III.E.3), frente a la de $9,6\text{ g m}^{-2}\text{ día}^{-1}$ mediante el sistema de aireación forzada (apartado III.C.13). Aunque los experimentos se realizaron en Junio y Septiembre, respectivamente, y con diferentes estirpes de cianobacterias fijadoras de N_2 , los cultivos con el sistema de paletas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y empleando el propio medio de cultivo reciclado para realizar las diluciones diarias. La ventaja del sistema de paletas frente al de aireación forzada no atañe sólo al incremento en biomasa, sino también a la economía del proceso de cultivo. La mayor productividad del sistema de agitación por paletas puede residir en que facilita la adecuada turbulencia en el cultivo, permitiendo así el mejor aprovechamiento de la luz por las células, sin que puedan excluirse otros efectos beneficiosos, como podría ser el de reducir el grado de sobresaturación de O_2 en el medio y, en consecuencia, las pérdidas por fotorrespiración, particularmente acusadas a alta irradiancia y elevada tensión de oxígeno (Jackson y Volk, 1970; Richmond, 1983).

La productividad se afecta positivamente por el aumento de temperatura, hasta alcanzar un valor óptimo. La temperatura de la suspensión celular viene determinada básicamente por la ambiental, aunque también se influye por la humedad relativa del aire y por la duración de la fase diurna. Otros factores que afectan a este parámetro son la profundidad y superficie del estanque, así como el color de los materiales empleados en su construcción. A pesar de que en la mayoría de los experimentos realizados se mantuvo la temperatura alrededor de 30°C , hay indicios para pensar que en cultivos a temperatura ambiente puede ser necesario, tanto en Invierno como en Verano, el uso de toldos de plástico transparente de adecuado espectro (por ejemplo, polietileno) para preservar la temperatura de los estanques. Puesto que con las microalgas utilizadas las productividades que se alcanzan a $20\text{--}25^\circ\text{C}$ suponen el 80% de la óptima a 35°C (apartado III.C.8) es previsible que puedan también cultivarse a temperatura ambiente, en zonas climáticas como la de

Sevilla, al menos desde Abril a Octubre, con productividades no muy por debajo de las máximas de Verano.

Como es evidente, el empleo de toldos disminuye además notablemente las pérdidas de agua por evaporación. En relación con este punto es interesante señalar que, en contra de lo que en principio pudiera pensarse, el cultivo de microalgas requiere menos agua por kg de proteína producida que los cultivos agrícolas convencionales (Castillo et al., 1980). En efecto, aunque los cultivos de microalgas consumen en todo el proceso de producción entre 20000 y 90000 m³ de agua por hectárea y año, dependiendo de la zona climática del cultivo, su producción en proteína puede estimarse, según cálculos realistas, en 20 toneladas por hectárea y año, es decir, unos 4 m³ de agua por kg de proteína. Sin embargo, cultivos agrícolas de especies con alto contenido en proteína, como la alfalfa o la soja, necesitan entre 30000 y 40000 m³ de agua por hectárea y año, lo que, para una producción anual de proteína de 5 toneladas por hectárea y año, suponen un requerimiento de agua por kg de proteína sintetizada doble que en el caso de las microalgas (Ciferri, 1983).

La eficiencia fotosintética define la fracción de energía solar que queda almacenada como energía química en la biomasa producida y el oxígeno molecular desprendido, de acuerdo con la siguiente ecuación general simplificada para el caso de la asimilación del anhídrido carbónico a carbohidrato:



La energía libre almacenada durante el proceso fotosintético es de aproximadamente 5 eV por molécula de CO₂ asimilada, esto es, de 114 kcal por mol. La reacción global implica la transferencia de 4 electrones procedentes de 2 moléculas de agua (E₀ⁱ, pH 7, +0,82 V) hasta el CO₂ (E₀ⁱ, pH 7, -0,42 V), con el consiguiente desprendimiento de O₂ y síntesis de azúcar. La transferencia de un electrón desde el agua hasta la ferredoxina implica una serie de reacciones, de las cuales dos son fotoquímicas. Por tanto, el requerimiento es de 8 fotones, es decir, 8 einsteins mol⁻¹.

Las microalgas, al igual que las plantas verdes, so

lo pueden utilizar en fotosíntesis la luz de longitud de onda entre 400 y 700 nm. Esta radiación fotosintéticamente activa supone aproximadamente el 43% del total de la radiación solar que incide sobre la superficie terrestre y equivale energéticamente a luz monocromática de 575 nm (Bassham, 1977 a y b; Hall, 1980). Como la luz de 575 nm tiene una energía de 2,16 eV por fotón, es decir, de 49,74 kcal por einstein, se necesita 8 veces esta cantidad, o sea 17,28 eV ó 398 kcal para reducir una molécula o mol de CO_2 a carbohidrato. La máxima eficiencia fotosintética es, pues, de 28,6%, y referida a la radiación solar incidente de 12,3% ($0,43 \times 28,6$). Sin embargo, hay factores intrínsecos al sistema que disminuyen la capacidad de absorción de luz. Así los procesos de reflexión, transmisión y absorción inespecífica suponen una pérdida del 20%, con lo que la eficiencia fotosintética se reduce al 9,84%. Existen además pérdidas de energía química almacenada, como las que tienen su origen en procesos de respiración y fotorrespiración, que, aunque difíciles de evaluar, implican una disminución del 33% (Bassham, 1980). Por tanto, la eficiencia fotosintética neta sería del 6,6% ($28 \times 0,43 \times 0,8 \times 0,67$) de la radiación solar total incidente.

La estimación de la eficiencia fotosintética ha sido y es objeto de activa investigación, siendo necesario en el caso de la producción de biomasa evaluarla en función del peso seco obtenido y de su contenido energético. A este respecto pueden no ser válidos otros parámetros más fáciles o cómodos de medir, tales como el desprendimiento de O_2 o el incremento en clorofila.

En relación con nuestros resultados, se han obtenido valores de eficiencia fotosintética, estimados en base a productividad en peso seco, de hasta el 3,1% de la radiación total incidente (Tabla XVIII). Esto supone el 25% del valor máximo teórico calculado según los supuestos arriba discutidos, y es de los rendimientos más altos obtenidos al aire libre hasta la fecha (Goldman, 1979 b; Bassham, 1980). Con el sistema de paletas se consigue una mejor eficiencia que con el de aireación forzada. Por otro lado, ambos sistemas de agitación, exhiben mayor eficiencia en Invierno que en Verano (apartado III.D). La elevada irradiancia favorece procesos tales como la fotorrespiración y puede provocar una inhibición de la actividad fotosintética, aspecto que ha sido estudiado por varios autores (Myers y Burr, 1940; Ryther, 1956; Abeliovich y Shi

lo, 1972). De hecho, las máximas eficiencias fotosintéticas descrititas en condiciones de laboratorio se han conseguido empleando sistemas limitados de luz (Goedheer y Hammans, 1975; Pirt et al., 1980; Thomas et al., 1984).

El cultivo de microalgas a gran escala no debe enfocarse exclusivamente bajo el punto de vista de producción de alimentos, sino que su potencialidad permite augurar múltiples aplicaciones (Figura 58). Nosotros pensamos que, entre las microalgas, las cianobacterias son especialmente idóneas para llevar a cabo la bioconversión de la energía solar con alta eficiencia, tanto para la producción de compuestos de interés agrícola, industrial y alimenterio, como para la depuración de aguas residuales.

Este trabajo con estirpes seleccionadas de algas verde-azuladas fijadoras de nitrógeno atmosférico representa una contribución significativa a aspectos biológicos básicos de la Algicultura, rama de la Biotecnología que ahora inicia un prometedor desarrollo.

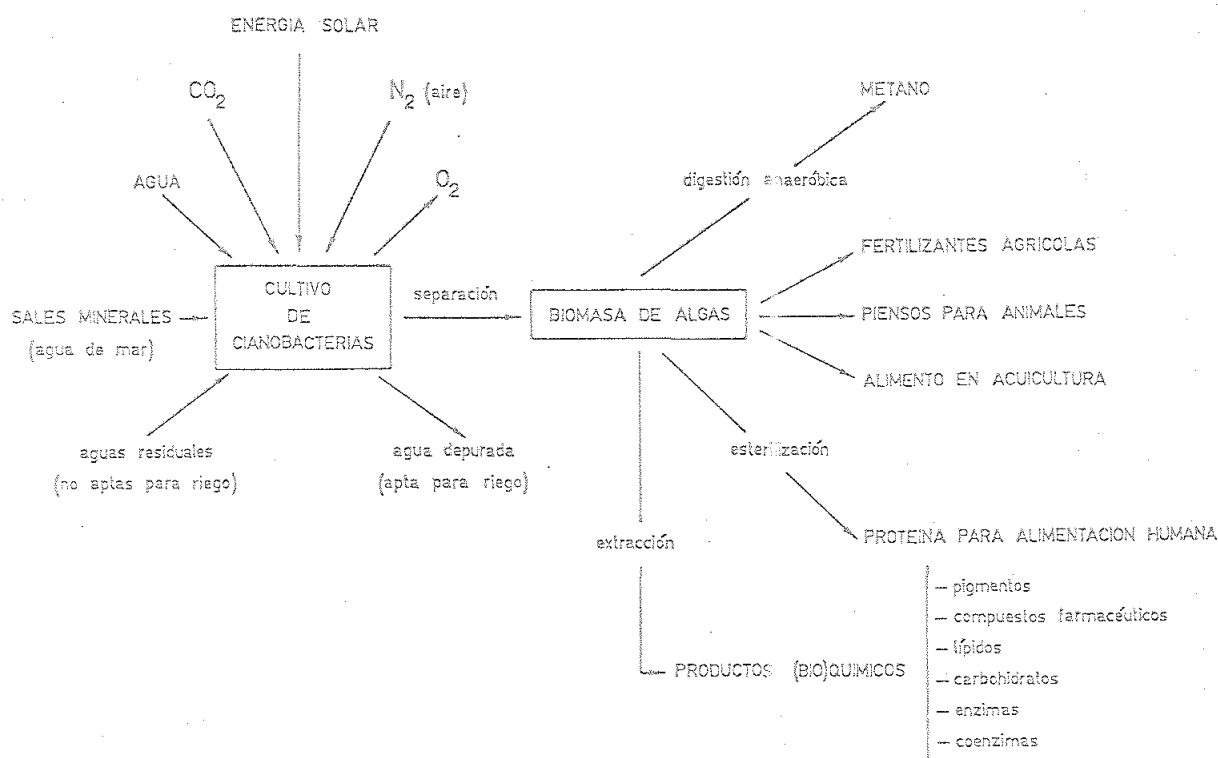


Figura 58. Posibles aplicaciones del cultivo en masa de cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico.

V. CONCLUSIONES

1. A partir de datos de cinéticas de crecimiento y de composición determinados para seis estirpes de cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno con heterocistos, se han seleccionado Anabaena variabilis y Anabaena ATCC 33047 para realizar un estudio detallado de su cultivo en condiciones de laboratorio y a la intemperie.
2. La composición elemental y molecular de las células de A. varia-
bilis evoluciona a lo largo del crecimiento, destacando el aumen
to en el contenido en proteína desde 34% del peso seco en la fa
se de aceleración al 52% en la de deceleración.
3. En cultivos estancos, las células experimentan un incremento muy acusado en la actividad de fijación de nitrógeno durante la fa
se de aceleración e inicio de la exponencial, seguido de un des
censo también muy marcado mediada esta segunda fase. La dismi
nución de la actividad nitrogenasa parece deberse al aumen
to de la densidad celular durante el crecimiento, puesto que di
cho efecto se revierte tanto por dilución del cultivo como por aumen
to de la irradiancia.
4. A lo largo de todo el crecimiento existe una correlación muy es
trecha entre la actividad nitrogenasa y la de asimilación de ni
trógeno por las células.
5. La fuente de carbono tiene un marcado efecto, particularmente a
alta irradiancia, sobre el crecimiento y el nivel celular de ac
tividad nitrogenasa, existiendo un paralelismo entre el conteni
do en carbohidratos de las células y su actividad nitrogenasa.
6. El aumento de la irradiancia se traduce en un incremento signi-
ficativo tanto del crecimiento como de la actividad fijadora de
nitrógeno de las células, encontrándose una estrecha correlación
entre el nivel máximo de actividad nitrogenasa y la velocidad
específica de crecimiento.

7. La oscuridad provoca una caída muy acusada de la actividad nitrógenasa celular, efecto que se revierte por la luz y que puede prevenirse parcial o totalmente por un adecuado suplemento de carbono.
8. La temperatura, cuyo óptimo puede situarse a 35°C, afecta al crecimiento, actividad nitrógenasa y composición de las células, especialmente en lo que se refiere a proteínas, carbohidratos y pigmentos.
9. El pH óptimo para el crecimiento de A. variabilis se encuentra entre 6,4 y 8,3, disminuyendo drásticamente la velocidad específica de crecimiento, así como el contenido en nitrógeno y clorofila de las células, al aumentar el pH.
10. El crecimiento celular durante la fase luminosa determina una notoria subida del pH del medio concomitante con la disminución en la concentración de carbono inorgánico, observándose el fenómeno inverso durante la fase oscura, en la que no hay crecimiento celular. Estas oscilaciones se amortiguan notablemente cuando se enriquece en CO₂ el aire que se burbueja a través de los cultivos.
11. Los experimentos realizados en la terraza de la Facultad de Biología de Sevilla han puesto de manifiesto la viabilidad del cultivo de A. variabilis y Anabaena ATCC 33047 a la intemperie en sistemas estancos y semicontinuos de 0,25, 1 y 10 m² de superficie libre.
12. La actividad fijadora de nitrógeno de las células en cultivos al aire libre evoluciona en función de la irradiancia solar, alcanzando su máximo a mediodía y su mínimo durante la noche.
13. Empleando un sistema de agitación por aireación forzada, el aire insuflado a un caudal igual o superior a 60 litros por litro de suspensión y hora aporta todo el nitrógeno y el carbono necesarios para producir del orden de 14 g (peso seco) m⁻² día⁻¹

de biomasa, sin que el suministro adicional de anhídrido carbónico o nitrógeno combinado se traduzca en aumento de productividad. Sin embargo, el suministro adicional de anhídrido carbónico afecta a la composición elemental y molecular, aumentando el contenido en nitrógeno y proteína de las células.

14. La densidad y la profundidad del cultivo, así como la temperatura y el pH, son parámetros que influyen decisivamente en la productividad. El aumento de la densidad conlleva siempre una disminución en la velocidad específica de crecimiento. Sin embargo, a efectos de productividad y para una profundidad de 25 cm, la densidad celular óptima fue de hasta $3,5 \text{ mg(cl) l}^{-1}$ en Verano y de $1,5 \text{ mg(cl) l}^{-1}$ en Invierno. Por otro lado, manteniendo la densidad de los cultivos a 2 mg(cl) l^{-1} , el óptimo de productividad se obtuvo para unas profundidades entre 20 y 25 cm en Verano y por debajo de 15 cm en Invierno. Al igual que en experimentos realizados en el laboratorio, los valores óptimos de temperatura y pH fueron de 35°C y alrededor de 8.
15. La irradiancia, la densidad celular y la profundidad de los cultivos afectan significativamente al contenido en clorofila y nitrógeno de las células, de modo que a menor disponibilidad de luz corresponden mayores niveles de ambos componentes.
16. En experiencias a la intemperie realizadas en Verano, con un sistema de agitación por paletas, la densidad celular óptima resultó ser de 1 a 2 mg(cl) l^{-1} para una profundidad de 20 cm, en tanto que la profundidad óptima fue de 10 cm para una densidad de $2,5 \text{ mg(cl) l}^{-1}$.
17. El sistema de agitación por paletas suministra, en ausencia de aire insuflado, el N_2 y CO_2 necesarios para conseguir productividades de biomasa superiores a $20 \text{ g(peso seco) m}^{-2}\text{día}^{-1}$, y es más eficiente que el de aireación forzada.

18. La eficiencia de conversión de energía solar en biomasa es más alta en Invierno que en Verano, alcanzándose con el sistema de paletas un valor del 3,1% de la energía solar incidente.

VI. BIBLIOGRAFIA

- AARONSON S., BERNER T. y DUBINSKY Z. (1980). Microalgae as a source of chemicals and natural products. En: Algae biomass. Production and use. (Shelef G. y Soeder C.J., eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 575-601.
- AARONSON S., y DUBINSKY Z. (1982). Mass production of microalgae. *Experientia* 38 : 36-40.
- ABELIOVICH A. y SHILO M. (1972). Photooxidative death in blue-green algae. *J. Bact.* 111 : 682-689.
- ARNON D.I., McSWAIN B.D., TSUJIMOTO H.Y. y WADA K. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 357 : 231-245.
- AZOV Y. (1982). Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 1300-1306.
- AZOV Y., SHELEF G., MORAINÉ R. y ORON G. (1980). Alternative operating strategies for high-rate sewage oxidation ponds. En: Algae biomass. Production and use. (Shelef G. y Soeder C.J., eds), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 523-529.
- BASSHAM J.A. (1977 a). Synthesis of organic compounds from carbon dioxide in land plants. En : Biological Solar Energy Conversion. (Mitsui A., Miyachi S., San Pietro A. y Tamura S., eds.), Academic Press, Londres, 151-165.
- BASSHAM J.A. (1977 b). Increasing crop production through more controlled photosynthesis. *Science* 197 : 630-638.
- BASSHAM J.A. (1980). Energy crops (Energy farming). En: Biochemical and photosynthetic aspects of energy production. (San Pietro A., ed.) Academic Press, Londres, 147-173.
- BECKER E.W. (1984). Biotechnology and exploitation of the green alga Scenedesmus obliquus in India. *Biomass* 4 : 1-19.

BECKER E.W. y VENKATARAMAN L.V. (1984). Production and utilization of the blue-green alga Spirulina in India. Biomass 4 : 105-125.

BEDELL G.W. (1985). Stimulation of commercial algal biomass production by the use of geothermal water for temperature control. Bio-technol. Bioeng. 27 : 1063-1066.

BEN-AMOTZ A. y AVRON M. (1981). Glycerol and β -carotene metabolism in the halotolerant alga Dunaliella : a model system for biosolar energy conversion. Trends Biochem. Sci. 6 : 297-299.

BEN-AMOTZ A., SUSSMAN I. y AVRON M. (1982). Glycerol production by Dunaliella. Experientia 38 : 49-52.

BENEMANN J.R. (1979). Production of nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing blue-green algae. Enzyme Microb. Technol. 1 : 83-90.

BENEMANN J.R. y WEISSMAN J.C. (1984). Chemicals from microalgae. En: Bioconversion systems. (Wise D.L., ed.), CRC Press, 59-70.

BOTHE, H. (1982). Nitrogen fixation. En : The Biology of Cyanobacteria. (Carr N.G. y Whitton B.A., eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 87-104.

BOTTOMLEY P.J. y STEWART W.D.P. (1976). ATP pools and transients in the blue-green alga Anabaena cylindrica. Arch. Microbiol. 108 : 249-258.

BOTTOMLEY P.J. y STEWART W.D.P. (1977). ATP and nitrogenase activity in nitrogen-fixing heterocystous blue-green algae. New Phytol. 79 : 625-638.

BOUSSIBA S. y RICHMOND A.E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga Spirulina platensis. Arch. Microbiol. 120 : 155-159.

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

BURLEW J.S. (ed.) (1953). Algal culture. From laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, Publicación n° 600, Washington D.C..

BURTON K. (1968). Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods. Enzymol. 12 B : 163-166.

CASTILLO J., MERINO F. y HEUSSLER P. (1980). Production and ecological implications of algae mass culture under peruvian conditions. En: Algae biomass. (Shelef G. y Soeder C.J. eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 123-134.

CIFERRI O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. Microbiol. Rev. 47: 551-578.

CIFERRI O. y TIBONI O. (1985). The biochemistry and industrial potential of Spirulina. Ann. Rev. Microbiol. 39 : 503-526.

CLEMENT G., GIDDEY C. y MENZI R. (1967). Amino acid composition and nutritive value of the alga Spirulina maxima. J. Sci. Food Agric. 18 : 497-501.

COBB H.D. y MYERS J. (1964). Comparative studies of nitrogen fixation and photosynthesis in Anabaena cylindrica. Amer. Jour. Bot. 51 : 753-762.

COOK P.M. (1951). Chemical engineering problems in large-scale culture of algae. Ind. Eng. Chem. 43 : 2385-2389.

DAVIES B.H. (1976). Carotenoids. En: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. (Goodwin T.W., ed.), Academic Press, Londres, Vol. 2, 38-165.

DOUGLAS A.G., DOURAGHI-ZADEH K. y EGLINTON G. (1969). The fatty acids of the Botryococcus braunii. Phytochem. 8 : 285-293.

DUBINSKY Z., BERNER T. y AARONSON T. (1978). Potential of large-scale algal culture for biomass and lipid production in arid lands. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8: 51-68.

DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. y SMITH F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 : 350-356.

DURAND-CHASTEL H. (1980). Production and use of Spirulina in Mexico. En : *Algae biomass. Production and use.* (Shelef G. y Soeder C.J., eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 51-64.

ERNST A., KIRSCHENLOHR H., DIEZ J. y BOGER P. (1984). Glycogen content and nitrogenase activity in Anabaena variabilis. *Arch. Microbiol.* 140 : 120-125.

FAY P. (1965). Heterotrophy and nitrogen fixation in Chlorogloea fritschii Mitra. *J. gen. Microbiol.* 39: 11-20.

FAY P. (1976). Factors influencing dark nitrogen fixation in a blue-green alga. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 : 376-379.

FONTES A.G. (1983). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la composición de la cianobacteria Anabaena variabilis ATCC 29413. II Congreso Luso-Español de Bioquímica, Barcelona, Resumen 823.

FONTES A.G., MORENO J., VARGAS M.A., GUERRERO M.G. y LOSADA M. (1985). Effect of different factors on the productivity of the nitrogen-fixing blue-green alga Anabaena variabilis under outdoor conditions. Third EC Conference on "Energy from Biomass", Venecia, Abstract PI/40.

FONTES A.G., RIVAS J., GUERRERO M.G. y LOSADA M. (1982). Production of high-quality biomass by nitrogen-fixing blue-green algae. Second EC Conference on "Energy from Biomass", Berlin, Abstract PI/36.

FONTES A.G., RIVAS J., GUERRERO M.G. y LOSADA M. (1983). Producción de biomasa de calidad por el alga verde-azulada fijadora de nitrógeno atmosférico Anabaena variabilis. II Reunión Científica de Microbiología Industrial, Sevilla, 135.

FONTES A.G. y ROSA F.F. de la (1981). Fotoproducción de biomasa de alto contenido proteico a partir de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. II Congreso de la FESBE, Madrid, Resumen 531.

GLAZER A.N. (1976). Phycocyanins : Structure and function. Photochem. Photobiol. Rev. 1 : 71-115.

GOEDHEER J.C. y HAMMANS J.W.K. (1975). Efficiency of light conversion by the blue-green alga Anacystis nidulans. Nature 256 : 333-335.

GOLDMAN J.C. (1979 a). Outdoor algal mass cultures. I. Applications. Water Research 13 : 1-19.

GOLDMAN J.C. (1979 b). Outdoor algal mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations. Water Research 13 : 119-136.

GOLDMAN J.C., AZOV Y., RILEY C.B. y DENNETT M.R. (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 57 : 1-13.

GOLDMAN J.C., RYTHER J.H. y WILLIAMS L.D. (1975). Mass production of marine algae in outdoor cultures. Nature 254 : 594-595.

GOLUEKE C.G. y OSWALD W.J. (1959). Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. Appl. Microbiol. 7 : 219-227.

GOLUEKE C.G., OSWALD W.J. y GOTAAS H.B. (1957). Anaerobic digestion of algae. Appl. Microbiol. 5 : 47-55.

GUERRERO M.G. y LOSADA M. (1983). Conversión biológica de la energía solar. Mundo Científico 3 : 616-630.

GUERRERO M.G., RAMOS J.L. y LOSADA M. (1982). Photosynthetic production of ammonia. Experientia 38 : 53-58.

GUMBERG F., MEFFERT M.E. y STRATMANN H. (1953). Nonsterile large-scale culture of Chlorella in greenhouse and open air. En : Algal culture. From laboratory to pilot plant. (Burlew J.S., ed.), Carnegie Institution of Washington, Publicación n°600, Washington D.C., 166-176.

HALL D.O. (1980). Biological and agricultural systems : an overview. En : Biochemical and photosynthetic aspects of energy production. (San Pietro A., ed.), Academic Press, Londres, 1-30.

- HALLENBECK P.C., KOCHIAN L.V., WEISSMAN J.C. y BENEMANN J.R. (1978). Solar energy conversion with hydrogen-producing cultures of the blue-green alga Anabaena cylindrica. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8 : 283-297.
- HARDER R. y von WITSCH H. (1942 a). Bericht über Versuche zur Fettsynthese mittels autotropher Mikroorganismen. Forschungsdienstst. Sonderh. 16 : 270-275.
- HARDER R. y von WITSCH H. (1942 b). Über Massenkultur von Diatomeen. Ber. deut. bot. Ges. 60 : 146-152.
- HAURY J.F. y SPILLER H. (1981). Fructose uptake and influence on growth of and nitrogen fixation by Anabaena variabilis. J. Bacteriol. 147 : 227-235.
- HEALEY F.P. (1985). Interacting effects of light and nutrient limitation on the growth rate of Synechococcus linearis (cyanophyceae). J. Phycol. 21 : 134-146.
- HITCHCOCK G.L. (1980). Diel variation in chlorophyll a, carbohydrate and protein content of the marine diatom Skeletonema costatum. Marine Biology 57 : 271-278.
- HOOD W., LEAVER A.G. y CARR N.G. (1969). Extracellular nitrogen and the control of arginine biosynthesis in Anabaena variabilis. Biochem. J. 114 : 12-13.
- HOUCHINS J.P. y HIND G. (1982). Pyridine nucleotides and H₂ as electron donors to the respiratory and photosynthetic electron-transfer chains and to nitrogenase in Anabaena heterocysts. Biochim. Biophys. Acta 682 : 86-96.
- JACKSON W.A. y VOLK R.J. (1970). Photorespiration. Ann. Rev. Plant Physiol. 21 : 385-432.
- JUTTNER J. (1983). ¹⁴C-labeled metabolites in heterocysts and vegetative cells of Anabaena cylindrica filaments and their presumptive function as transport vehicles of organic carbon and nitrogen. J. Bacteriol. 155 : 628-633.

- KANAZAWA T., FUJITA C. YUHARA T. y SASA T. (1958). Mass culture of unicellular algae using the open circulation method. J. gen. appl. Microbiol. 4 : 135-152.
- KETCHUM B.H., LILLICK L. y REDFIELD A.C. (1949). The growth and optimum yields of unicellular algae in mass culture. Jour. Cell. Comp. Physiol. 33 : 267-279.
- KETCHUM B.H. y REDFIELD A.C. (1949). Some physical and chemical characteristics of algae grown in mass culture. Jour. Cell. Comp. Physiol. 33 : 281-299.
- KHARASCH M.S. y SHER B. (1925). The electronic conception of valence and heats of combustion of organic compounds. J. Phys. Chem. 29 : 625-658.
- KRATZ W.A. y MYERS J. (1955). Nutrition and growth of several blue-green algae. Amer. J. Bot. 42 : 282-287.
- KRAUSS R.W. (1953). Inorganic nutrition of algae. En : Algal culture. From laboratory to pilot plant. (Burlew J.S., ed.), Carnegie Institution of Washington, Publicación n°600, Washington D.C., 85-102.
- LAMBERT G.R. y SMITH G.D. (1981). The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green algae). Biol. Rev. 56 : 589-660.
- LARGEAU C., CASADEVALL E., DIF D. y BERKALOFF C. (1980). Renewable hydrogen production from the alga Botryococcus braunii. En : Proceedings of the First EC Conference on Energy from Biomass. (Palz W., Chartier P. y Hall D.O., eds.), Applied Sciences Publishers, Londres, 653-658.
- LEE H.Y. y ERICKSON L.E. (1984). Characterization of algae using regularities. Biotechnol. Bioeng. 26 : 758-763.
- LEE H.Y., ERICKSON L.E. y YANG S.S. (1984). The estimation of growth yield and maintenance parameters for photoautotrophic growth. Biotechnol. Bioeng. 26 : 926-935.

- LEE Y., TAN H. y HEW C. (1985). The effect of growth temperature on the bionergetics of photosynthetic algal cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 27 : 555-561.
- LIN R.I. y SCHJEIDE O.A. (1969). Microestimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction. *Anal. Biochem.* 27 : 473-483.
- LITCHFIELD J.H. (1983). Single-Cell Proteins. *Science* 219 : 740-746.
- MACKINNEY G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140 : 315-322.
- MAGEE W.E. y BURRIS R.H. (1954). Fixation of N_2 and utilization of combined nitrogen by Nostoc muscorum. *Am. J. Bot.* 11 : 777-782.
- MARCUS Y., HAREL E. y KAPLAN A. (1983). Adaptation of the cyanobacterium Anabaena variabilis to low CO_2 concentration in their environment. *Plant Physiol.* 71 : 208-210.
- MARCUS Y., ZENVIRTH D., HAREL E. y KAPLAN A. (1982). Induction of HCO_3^- transporting capability and high photosynthetic affinity to inorganic carbon by low concentration of CO_2 in Anabaena variabilis. *Plant Physiol.* 69 : 1008-1012.
- MATELES R.I. y TANNENBAUM S.R. (eds.) (1968). *En : Single-Cell Protein*. M.I.T. Press, Cambridge, EEUU.
- MAXWELL J.R., DOUGLAS A.G., EGLINTON G. y MCCORMICK A. (1968). The botryococcenes-hydrocarbons of novel structure from the alga Botryococcus braunii Kutzling. *Phytochem.* 7 : 2157-2171.
- MAYER A.M., ZURI U., SHAIN Y. y GINZBURG H. (1964). Problems of design and ecological considerations in mass culture of algae. *Biotechnol. Bioeng.* 6 : 173-190.
- MINKEVICH I.G. y EROSHIN V.K. (1973). Productivity and heat generation of fermentation under oxygen limitation. *Folia Microbiol.* 18 : 376-385.

MITUYA A., NYUNOYA T. y TAMIYA H. (1953). Pre-pilot plant experiments on algal mass culture. En : Algal culture. From laboratory to pilot plant. (Burlew J.S., ed.), Carnegie Institution of Washington, Publicación n°600, Washington D.C., 273-281.

MORIMURA Y., NIHEI T. y SASA T. (1955). Outdoor bubbling culture of some unicellular algae. J. Gen. Appl. Microbiol. 1 : 173-182.

MURRY M.A., HALLENBECK P.C., ESTEVA D. y BENEMANN J.R. (1983). Nitrogenase inactivation by oxygen and enzyme turnover in Anabaena cylindrica. Can.J. Microbiol. 29 : 1286-1294.

MYERS J. (1953). Growth characteristics of algae in relation to the problems of mass culture. En : Algal culture. From laboratory to pilot plant. (Burlew J.S., ed.), Carnegie Institution of Washington, Publicación n°600, Washington D.C., 37-54.

MYERS J. y BURR G.O. (1940). Studies on photosynthesis: some effects of light of high intensity on Chlorella. J. gen. Physiol. 24 : 45-67.

MYERS J. y CLARK L.B. (1944). Culture conditions and the development of the photosynthetic mechanism. II. An apparatus for the continuous culture of Chlorella. J. gen. Physiol. 28 : 103-112.

MYERS J. y KRATZ K.A. (1955). Relation between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue-green alga. J. gen. Physiol. 39 : 11-22.

MYKLESTAD S. (1974). Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15 : 261-274.

MYKLESTAD S. (1977). Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by Chaetoceros affinis var. willei and Skeletonema costatum. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 29 : 161-179.

OHMORI M. (1984). Effects of preillumination on dark nitrogen fixation and respiration by Anabaena cylindrica. Plant Cell Physiol. 25 : 125-130.

- OHMORI M. y HATTORI A. (1972). Effect of nitrate on nitrogen-fixation by the blue-green alga Anabaena cylindrica. Plant Cell Physiol. 13 : 589-599.
- ONU (1967). International action to avert the impending protein crisis. United Nations Publications, Sales n°E 63, XIII 2.
- ONU (1974). Assessment of the World food situation. United Nations World Food Conference, Noviembre, FAO, Roma.
- OSWALD W.J. y BENEMANN J.R. (1980). Algal-bacterial systems. En: Biochemical and photosynthetic aspects of energy production. (San Pietro A., ed.), Academic Press, Londres, 59-80.
- OSWALD W. J. y GOLUEKE C.G. (1968). Large-scale production of algae. En : Single-Cell Protein (Mateles R.I. y Tannenbaum S.R., eds.), MIT Press, Cambridge, 271-305.
- OSWALD W. J., GOTAAS H.B., GOLUEKE C.G. y KELLEN W. R. (1957). Algae in waste treatment. Sewage Ind. Wastes 29 : 437-457.
- OSWALD W.J., GOTAAS H.B., LUDWIG H.F. y LYNCH V. (1953). Algal symbiosis in oxidation ponds. Sewage Ind. Wastes 25 : 692-705.
- PATEL S.A. y ERICKSON L.E. (1981). Estimation of heats of combustion of biomass from elemental analysis using available electron concepts. Biotechnol. Bioeng. 23 : 2051-2067.
- PIMENTEL D., DRITSCHILO W., KRUMMEL J. y KUTZMAN J. (1975). Energy and land constraints in food-protein production. Science 190: 754-761.
- PIMENTEL D. y PIMENTEL M. (1979). En : Food, Energy and Society. (Cottrell A. y Southwood T.R.E., eds.), Edward Arnold Ltd., 131-143.
- PIORRECK M., BAASCH K. y POHL P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytochem. 23 : 207-216.

- PIRT S.J., LEE Y.K., RICHMOND A. y PIRT M.W. (1980). The photosynthetic efficieng of Chlorella biomass growth with reference to solar energy utilization. J. Chem. Tech. Biotechnol. 30 : 25-34.
- PROVASOLI L., McLAUGHLIN J.J.A. y DROOP M.R. (1957). The development of artificial media for marine algae. Arch. Mikrobiol. 25:392-428.
- RAMACHANDRAN S. y MITSUI A. (1984). Effect of sea water quality on biomass and hydrogen photoproduction by a marine blue-green alga Oscillatoria sp. Advances in Photosynthesis Research (Sybesma C. ed.), 2 : 805-808.
- RAMOS J.L., GUERRERO M.G. y LOSADA M. (1984). Sustained photoproduction of ammonia from dinitrogen and water by the nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp. strain ATCC 33047. Appl. Environ. Microbiol. 48 : 114-118.
- RAMUS J. (1973). Cell surface polysaccharides of the red alga Porphyridium. En : Biogenesis of plant cell wall polysaccharides. (Loewus F., ed.), Academic Press, Nueva York, 333-359.
- RAPS S., WYMAN K., SIEGELMAN H.W. y FALKOWSKY P.G. (1983). Adaptation of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa to light intensity. Plant Physiol. 72 : 829-832.
- RICHMOND A. (1983). Phototrophic microalgae. En : Biotechnology. (Dellweg H., ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Vol.3, 109-143.
- RICHMOND A. y PREISS K. (1980). The biotechnology of algaculture. Interdiscipl. Sci. Rev. 5 : 60-70.
- RICHMOND A. y VONSHAK A. (1978). Spirulina culture in Israel. Arch. Hydrobiol. Beih. 11 : 274-280.
- RICHMOND A., VONSHAK A. y ARAD S. (1980). Environmental limitations in outdoor production of algal biomass. En : Algae biomass. Production and use. (Shelef G. y Soeder C.J., eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 65-72.

- RIPPKA R. y STANIER R.Y. (1978). The effects of anaerobiosis on ni trogenase synthesis and heterocyst development by nostocacean cyano bacteria. J. gen. Microbiol. 105 : 83-94.
- RYTHER J.H. (1956). Photosynthesis in the ocean as function of light intensity. Limnol. Oceanogr. 1 : 61-70.
- RYTHER J.H., DUNSTAN W.M., TENORE K.R. y HUGUENIN J.E. (1972). Controlled eutrophication-increasing food production from the sea by recycling human wastes. Bioscience 22 : 144-152.
- RYTHER J.H., GOLDMAN J.C., GIFFORD C.E., HUGUENIN J.E., WING A.S., CLARNER J.P., WILLIAMS L.D. y LAPOINTE B.E. (1975). Physical models of integrated waste recycling-marine polyculture systems. Aquaculture 5 : 163-177.
- SAMSON R. y LeDUY A. (1982). Biogas production from anaerobic diges tion of Spirulina maxima algal biomass. Biotechnol. Bioeng. 24 : 1919-1924.
- SANTILLAN C. (1982). Mass production of Spirulina. Experientia 38 : 40-43.
- SCHRAUTEMEIER B., BOHME H. y BOGER P. (1984). In vitro studies on pathways and regulation of electron transport to nitrogenase with a cell-free extract from heterocysts of Anabaena variabilis. Arch. Microbiol. 137 : 14-20.
- SCHRAUTEMEIER B., BOHME H. y BOGER P. (1985). Reconstitution of a light-dependent nitrogen-fixing and transhydrogenase system with heterocysts thylakoids. Biochim. Biophys. Acta 807 : 147-154.
- SHELEF G., AZOV Y., MORAIN R. y ORON G. (1980). Algal mass produc tion as an integral part of a wastewater treatment and reclamation system. En : Algae biomass. Production and use. (Shelef G. y Soeder C.J. eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 163-189.
- SHELEF G., MORAIN R., BERNER T., LEVI A. y ORON G. (1978). Solar energy conversion via algal wastewater treatment and protein produc tion. En : Proc. Pourth Intl. Cong. Photosynthesis. (Hall D.O., Coombs J. y Goodwin T. W., eds.), The Biochemical Society, Londres, 657-

SHELEF G., SCHWARTZ M. y SCHECHTER H. (1973). Prediction of photosynthetic biomass production in accelerated algal-bacterial wastewater treatment systems. En: Advances in Water Pollution Research. (Jenkins S.H., ed.), Pergamon Press, Oxford, 181-189.

SOEDER C. (1976). Zur Verwendung von Mikroalgen für Ernährungszwecke. Naturwissenschaften 63 : 131-138.

SOONG P. (1980). Production and development of Chlorella and Spirulina in Taiwan. En: Algae biomass. Production and use. (Shelef G. y Soeder C.J., eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 97-113.

SPOEHR H.A. (1951). Chlorella as a source of food. Proc. Amer. Phil. Soc. 95 : 62-67.

SPOEHR H.A. y MILNER H.W. (1949). The chemical composition of Chlorella; effect of environmental conditions. Plant Physiol. 24 : 120-149.

STEWART W.D.P. (1980). Some aspects of structure and function in N_2 -fixing cyanobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34 : 497-536.

STEWART W.D.P., FITZGERALD G.P. y BURRIS R.H. (1967). In situ studies on N_2 fixation using the acetylene reduction technique. Proc. Nat. Ac. Sci. 58 : 2071-2078.

STEWART W.D.P. y PEARSON H.W. (1970). Effects of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. Proc. R. Soc. London B 175 : 293-311.

STEWART W.D.P. y ROWELL P. (1975). Effects of L-methionine-D, L-sulfoximine on the assimilation of newly fixed NH_3 , acetylene reduction and heterocysts production in Anabaena cylindrica. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65 : 846-856.

STEWART W.D.P., ROWELL P., COSSAK J.D. y KERBY N.W. (1985). Physiological studies on N_2 -fixing cyanobacteria. En: Nitrogen fixation and CO_2 metabolism. (Ludden P.W. y Burris J. eds.), Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 269-279.

STEWART W.D.P., ROWELL P., HAWKESFORD M., SAMPAIO M.J. y ERNST A. (1982). Nitrogenase and aspects of its regulation in cyanobacteria. *Isr. J. Bot.* 31 : 168-189.

TAMIYA H. (1957). Mass culture of algae. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8 : 309-334.

THOMAS W.H., SEIBERT D.L.R., ALDEN M., NEORI A. y ELDRIDGE R. (1984). Yields, photosynthetic efficiencies and proximate composition of dense marine microalgal cultures. I. Introduction and Phaeodactylum tricornutum experiments. *Biomass* 5 : 181-209.

THORNER P.J. (1975). Chlorophyll-proteins : light harvesting and reaction center components of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26 : 127-158.

THORNTON W.M. (1917). The relation of oxygen to the heat of combustion of organic compounds. *Philos. Mag.* 33 : 196-203.

TSUKADA O., KAWAHARA T. y MIYACHI S. (1977). Mass culture of Chlorella in Asian countries. En : *Biological Solar Energy Conversion*. (Mitsui A., Miyachi S., San Pietro A. y Tamura S., eds.), Academic Press, Londres, 363-365.

VARGAS M.A., MORENO J., FONTES A.G., GUERRERO M.G. y LOSADA M. (1984). Utilización de cianobacterias fijadoras de nitrógeno para la producción de biomasa en ambientes naturales. XI Congreso de la SEB, Puerto de la Cruz, Tenerife, Resumen 3.8.

VARGAS M.A., MORENO J., FONTES A.G., GUERRERO M.G. y LOSADA M. (1985). Evaluation of two shaking systems for algal biomass photoproduction in outdoor cultures of Anabaena variabilis. XXIII Rencontre Internationale COMPLES, Sevilla, 62.

VENDLOVA J. (1969). Les problemes de la technologie de la culture des algues sur une grande echelle dans les installations au dehors. *Annali. Microbiol.* 19 : 1-12.

VONSHAK A., ABELIOVICH A., BOUSSIBA S., ARAD S. y RICHMOND A. (1982). Production of Spirulina biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass* 2 : 175-185.

WASLIEN C.I. (1975). Unusual sources of proteins for man. Crit.Rev. Food Sci. Nutr. 6 : 77-151.

WASSINK E.C., KOK B. y van OORSCHOT J.L.P. (1953). The efficiency of light-energy conversion in Chlorella cultures as compared with higher plants. En : Algal culture. From laboratory to pilot plant. (Burlew J.S., ed.), Carnegie Institution of Washington, Publicación n°600, Washington D.C., 55-62.

WATANABE A., HATTORI A., FUJITA Y. y KIYOHARA T. (1959). Large scale culture of a blue-green alga, Tolypothrix tenuis, utilizing hot spring and natural gas as heat and carbon dioxide sources. J. gen. appl. Microbiol. 5 : 51-57.

WATANABE A., NISHIGAKI S. y KONISHI C. (1951). Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants. Nature 168 : 748-749.

WATANABE A. y YAMAMOTO Y. (1967). Heterotrophic nitrogen fixation by the blue-green alga Anabaenopsis circularis. Nature 214 : 738.

WEARE N.M. y BENEMANN J.R. (1973 a). Nitrogen fixation by Anabaena cylindrica. I. Localization of nitrogen fixation in the heterocysts. Arch. Microbiol. 90 : 323-332.

WEARE N.M. y BENEMANN J.R. (1973 b). Nitrogen fixation by Anabaena cylindrica. II. Nitrogenase activity during induction and aging of batch-cultures. Arch. Microbiol. 93 : 101-112.

WOLK C.P. (1968). Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in Anabaena cylindrica. J. Bact. 96 : 2138-2143.

WOLK C.P. (1982). Heterocysts. En : The Biology of Cyanobacteria. (Carr N.G. y Whitton B.A., eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 359-386.

WOLK C.P. y SHAFFER P.W. (1976). Heterotrophic micro- and macrocultures of a nitrogen-fixing cyanobacterium. Arch. Microbiol. 110 : 145-147.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los doctores firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Agustín L. González Fontes de Albornoz
titulada "Cultivo de microalgas fijadoras de
nitrógeno atmosférico".

acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE

Sevilla, 29 de Abril

El Vocal

El Vocal

El Vocal

El Vocal

El Secretario

El Secretario



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672548