

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

---

**INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS DE LA CIANOBACTERIA *Synechococcus* sp.  
PARA REMOVER NUTRIENTES DE EFLUENTES DE CULTIVOS ACUÍCOLAS**

**TESIS**

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

Presenta:

**BILY AGUILAR MAY**

Ensenada, Baja California, México, Agosto de 2006

TESIS DEFENDIDA POR  
**Bily Aguilar May**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

*Director del Comité*

---

Dra. María Lucila del Carmen Lares  
Reyes

*Miembro del Comité*

---

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez

*Miembro del Comité*

---

Dr. Francisco Martín Goycoolea  
Valencia

*Miembro del Comité*

---

Dr. Juan Gabriel Correa Reyes

*Miembro del Comité*

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

*Coordinador del Programa de  
Posgrado en Ciencias con  
Orientación en Acuicultura y  
Biotecnología Marina*

---

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla

*Director de Estudios de Posgrado*

Agosto de 2006

**RESUMEN** de la tesis que presenta **Bily Aguilar May**, como requisito parcial para la obtención del grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** con orientación en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California, México. Agosto de 2006.

**Inmovilización de células de la cianobacteria *Synechococcus* sp. para remover nutrientes de efluentes de cultivos acuícolas**

Resumen aprobado por:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Director de Tesis

Uno de los principales problemas que presenta la utilización de cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, es la recuperación de la biomasa producida. Para resolver este problema, se han diseñado sistemas en donde se utilizan microalgas inmovilizadas en polímeros como sustrato. Los sustratos más comunes para la inmovilización de células vivas son el carragenano y el alginato. Este trabajo presenta un nuevo procedimiento para la inmovilización de células de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. utilizando quitosano obtenido de exoesqueletos de camarón. El espesor de la pared de las cápsulas de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en quitosano, depende del tiempo de contacto con el NaOH y está relacionado directamente con el crecimiento del cultivo. Después de una fase de acondicionamiento, y probablemente causado por el daño celular, las cápsulas obtenidas después de 80 segundos en una solución 0.1 N NaOH muestran mejor crecimiento que las obtenidas para cultivos de células libres (6.90 y 5.16 divisiones en 10 días respectivamente). El efecto de la temperatura respecto al crecimiento de *Synechococcus* sp. inmovilizado en quitosano, fue bajo en comparación con los cultivos de células libres. La mayor cantidad de inóculo favorece una mayor producción de biomasa de *Synechococcus* sp. El total del nitrógeno incorporado (amonio y nitratos) de células libres fue 98% y para las células inmovilizadas fue 68%. La incorporación de fósforo fue más eficiente en células libres (88%) que para células inmovilizadas (77%). La tasa fotosintética y la actividad de la nitrato reductasa de las células, no fue modificada por el proceso de inmovilización. La tasa de fotosíntesis disminuye con la edad del cultivo en ambas condiciones. La actividad de la nitrato reductasa no fue inhibida por la concentración de amonio en el medio (25.5 mgL<sup>-1</sup>), en ambas condiciones. Este trabajo muestra que las células de *Synechococcus* sp. pueden ser inmovilizadas en cápsulas de quitosano, y que mantienen similar tasa de crecimiento comparado con los cultivos de células libres y que esta especie remueve eficientemente nitrógeno y fósforo de aguas residuales.

**Palabras clave:** *Synechococcus* sp., inmovilización, quitosano, remoción de nutrientes, fotosíntesis.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Bily Aguilar May** as a partial requirement to obtain the **DOCTOR IN SCIENCE** degree with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, México. August 2006.

**Immobilization of cyanobacteria *Synechococcus* sp. cells to remove nutrients from aquaculture wastewater**

Abstract approved by:

---

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra  
Thesis Supervisor

One of the main problems for the utilization of cultured microalgae during waste water treatment is the harvest of the produced biomass. To solve this problem, a number of systems have been designed immobilizing the microalgae in polymers as substrates. The most common substrates for the immobilization of live cells are carrageenan and alginate. This work presents a new procedure to immobilize cells of the marine cyanobacteria *Synechococcus* sp. using chitosan obtained from shrimp exoskeletons. The thickness of the walls of the capsules of chitosan-immobilized *Synechococcus* cultures depended on contact time with NaOH and was directly related to culture growth. After an initial lag phase, probably caused by cell damage, the capsules obtained after 80 seconds in a 0.1 N NaOH solution showed better growth than that of free cell cultures (6.90 and 5.16 divisions in 10 days, respectively). The effect of temperature on the growth of *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan was lower in comparison to free cells in culture. Large initial inocula favored higher production of biomass of *Synechococcus* sp. Total nitrogen uptake (ammonium and nitrates) of free cell was 98% and for immobilized cells 68%. Phosphorus uptake was more efficient in free cells (88%) than in immobilized cells (77%). Photosynthetic rates and nitrate reductase activity of cells were not modified by the immobilization process. The photosynthetic rate decrease with age culture in both conditions. Nitrate reductase activity was not inhibited by the effect of ammonia concentration in media ( $25.5 \text{ mgL}^{-1}$ ) of both conditions. This work shows that the *Synechococcus* sp. cells can be immobilized in chitosan capsules, they maintain a similar growth rate compared to free cells in culture and that this species efficiently removes nitrogen and phosphates from waste waters.

**Keywords:** *Synechococcus* sp., immobilization, chitosan, nutrients removal, photosynthesis.

*A mi madre*

*Lilia May Chuc*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, mi más profundo agradecimiento por su dirección en este trabajo, por compartir sus conocimientos, por su paciencia y por todo el apoyo brindado a lo largo de todos estos años, tanto en el aspecto intelectual como moral.

A la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes, por el tiempo invertido en las revisiones, sugerencias hechas a este trabajo y su paciencia.

Al Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez, quien con su dinamismo, preguntas y sugerencias enriqueció este trabajo.

Al Dr. Francisco Martín Goycoolea Valencia, gracias por aceptar trabajar con nosotros en este proyecto, por sus acertados comentarios y por su disposición a compartir sus conocimiento.

Al Dr. Juan Gabriel Correa Reyes, por todos sus comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Jaime Lizardí Mendoza, por el apoyo en esta tesis, revisiones y comentarios al manuscrito de la publicación. Pero sobre todo por su amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para financiar mis estudios de Doctorado.

Mi estancia en Ensenada todo este tiempo desde la Licenciatura hasta el Doctorado no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi mamá Lilia May Chuc. Mil gracias!!

Al M. en C. Eduardo Talamás Rohana por su apoyo y respaldo durante todo este tiempo aun a distancia y en especial por las noches de desvelo haciendo “bolitas con microalgas”.

Al Dr. Benjamín Barón, Dr. Domenico Voltolina, Dra. Beatríz Cordero, Dr. Miguel A. del Río, Dr. Fernando Díaz, Dr. Jorge Olmos, Dr. Alexei Licea, Dr. Facundo Márquez por sus enseñanzas y apoyo.

A mis amigos: Alejandro Campa, Alejandro Ruiz, Alejandro Franco, Benjamín Casillas, Carmen Álvarez, D. Alejandra Munro, Galdy Hernández, Gissel Tinoco, Glenda Liz, Idalia Sandoval, Johanna Bernáldez, Jorge Simental, José A. Olivas, Juan P. G. Hermoso, Lizza Sáenz, Leonel Ochoa, Lorena Fraire, Magali Zacarías, Marcela Saracco, Mildred Herrera, Miriam Carbajal, Paty Ascencio, Ricardo Anaya, Ricardo Cruz, Yanet Guerrero, y Zarina Medina por su amistad y buenos momentos compartidos.

A los Técnicos Carmen Copalcúa, Rafael Zamarripa y Norberto Flores por su apoyo durante todo este tiempo.

Al personal administrativo por su buena disposición de siempre en especial a Ivonne Best, Cecilia Loera, Bibiana Medina, Citlali Romero, Dolores Sarracino, Norma Fuentes, Guadalupe Morales, Amelia Chávez y Cecilia González.

A los Sonoritas (Jorge, Marcos y Guillermo) por aguantarme y por divertirme juntos.

A todas las personas que de manera directa e indirecta apoyaron en la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
I.1. Polímeros utilizados como soporte en la inmovilización de células	6
I.1.1. Quitosano	7
I.2. Antecedentes relevantes de trabajos realizados con microalgas inmovilizadas	9
I.3. Efectos fisiológicos producidos en células inmovilizadas	11
<b>II. Objetivo</b>	<b>14</b>
II.1. <a href="#">Objetivos Particulares</a>	14
<b>III. Materiales y Métodos</b>	<b>16</b>
III.1. <a href="#">Características de la especie</a>	16
III.2. <a href="#">Cultivos de <i>Synechococcus</i> sp.</a>	16
III.3. <a href="#">Obtención del quitosano</a>	17
III.4. <a href="#">Elaboración de cápsulas de quitosano</a>	17
III.5. <a href="#">Viabilidad y crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano comparado con el crecimiento de células libres</a>	19
III.5.1. <a href="#">Viabilidad de <i>Synechococcus</i> sp.</a>	19
III.5.2. <a href="#">Efecto del tiempo de contacto de las cápsulas de quitosano con el NaOH</a>	20
III.5.3. <a href="#">Crecimiento a distinta temperatura para células inmovilizadas y libres</a>	21
III.5.4. <a href="#">Crecimiento con distintas densidades de inóculo de células inmovilizadas y libres</a>	22
III.5.5. <a href="#">Crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en forma inmovilizada y libres</a>	23
III.6. <a href="#">Difusión iónica con cápsulas de quitosano elaboradas a distintas temperaturas</a>	24
III.7. <a href="#">Remoción de nitrógeno y fósforo en cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en forma inmovilizada y libre</a>	25
III.7.1. <a href="#">Crecimiento con distintos aportes de nitrógeno</a>	25
III.7.2. <a href="#">Remoción de nitrógeno y fósforo</a>	26

III.8.	Efecto del proceso de inmovilización en la respuesta fisiológica de <i>Synechococcus</i> sp.	29
III.8.1.	Curvas fotosintéticas (P-I)	29
<b>CONTENIDO (Continuación)</b>		<b>Página</b>
III.8.2.	Actividad de la nitrato reductasa (NR)	30
III.9.	Tratamiento estadístico de los datos	32
III.9.1.	Elaboración de cápsulas y crecimiento de <i>Synechococcus</i> sp.	32
III.9.2.	Remoción de nitrógeno, fósforo, fotosíntesis y actividad de la NR	33
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b>	<b>34</b>
IV.1.	Elaboración de cápsulas de quitosano	34
IV.2.	Viabilidad y crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano comparado con el crecimiento de células libres	34
IV.2.1.	Viabilidad de <i>Synechococcus</i> sp.	34
IV.2.2.	Efecto del tiempo de contacto de las cápsulas de quitosano con el NaOH	35
IV.2.3.	Crecimiento a distintas temperaturas para células inmovilizadas y libres	37
IV.2.4.	Crecimiento con distintas densidades de inóculo de células inmovilizadas y libres	41
IV.2.5.	Crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en forma inmovilizada y libre	45
IV.3.	Difusión iónica con cápsulas de quitosano elaboradas a distintas temperaturas	47
IV.4.	Remoción de nitrógeno y fósforo con cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en forma inmovilizada y libres	49
IV.4.1.	Crecimiento con distintos aportes de nitrógeno	49
IV.4.2.	Remoción de nitrógeno y fósforo	50
IV.5.	Efecto del proceso de inmovilización en la respuesta fisiológica de <i>Synechococcus</i> sp.	58
IV.5.1.	Curvas fotosintéticas (P-I)	58
IV.5.2.	Actividad de la nitrato reductasa (NR)	61
<b>V.</b>	<b>Discusión</b>	<b>63</b>
V.1.	Elaboración de cápsulas de quitosano	64
V.2.	Viabilidad y crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano comparado con el crecimiento de células libres	66
V.2.1.	Viabilidad de <i>Synechococcus</i> sp.	66

V.2.2.	Efecto del tiempo de contacto de las cápsulas de quitosano con el NaOH	69
--------	--	----

<b>CONTENIDO (Continuación)</b>		<b>Página</b>
V.2.3.	Crecimiento a distintas temperaturas con células inmovilizadas y libres	70
V.2.4.	Crecimiento con distintas densidades de inóculo de células inmovilizadas y libres	72
V.2.5.	Crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en forma inmovilizadas y libres	74
V.3.	Difusión iónica con cápsulas de quitosano elaboradas a distintas temperaturas	76
V.4.	Remoción de nitrógeno y fósforo con cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en forma inmovilizada y libre	77
V.4.1.	Crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. con distintos aportes de nitrógeno	77
V.4.2.	Remoción de nitrógeno y fósforo	81
V.5.	Efecto del proceso de inmovilización en la respuesta fisiológica de <i>Synechococcus</i> sp.	93
V.5.1.	Curvas fotosintéticas (P-I)	93
V.5.2.	Actividad de la nitrato reductasa (NR)	95
<b>VI.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>98</b>
<b>VII.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>101</b>
<b>VIII.</b>	<b>Literatura citada</b>	<b>102</b>

#### **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 1.	Estructura de la molécula de quitosano.	8
Figura 2.	Cápsulas de quitosano. (a) cápsulas de quitosano sin células. (b) cápsulas de quitosano con células de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizadas.	35
Figura 3.	Valores promedio de la densidad óptica de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizada en cápsulas	37

de quitosano, con diferentes tiempo de contacto en NaOH 0.1 N: 80 s (—), 140 s (- - -) y 300 s (—). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

- |           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 4. | Valores promedio de la concentración celular de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano y cultivada a distintas temperaturas: 15 °C (—), 25 °C (- - -) y 30 °C (—). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.                   | 38 |
| Figura 5. | Valores promedio de la concentración celular de <i>Synechococcus</i> sp. en forma libre y cultivada a distintas temperaturas: 15 °C (—), 25 °C (- - -) y 30 °C (—). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.  | 39 |
| Figura 6. | Valores promedio y $\pm 1$ desviación estándar de la tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) en 10 días de cultivo a distintas temperaturas para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano. | 40 |
| Figura 7. | Valores promedio de la concentración celular de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano y cultivada con distintas densidades de inóculo: baja (—), media (- - -) y alta (—). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.          | 42 |
| Figura 8. | Valores promedio de la concentración celular de <i>Synechococcus</i> sp. en forma libre y cultivadas con distintas densidades de inóculo: baja (—), media (- - -) y alta (—). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.                                | 43 |

#### LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- |            |   | <b>Página</b> |
|------------|---|---------------|
| Figura 9.  | Valores promedio y $\pm 1$ desviación estándar de la tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) en 10 días de cultivo con distintas densidades de inóculo de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano. | 44            |
| Figura 10. | Promedio de la tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) por día, de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre (----) e inmovilizada (—) en cápsulas de quitosano. Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.                 | 46            |

Figura 11	Valores promedio de conductividad en micro siemens ( $\mu\text{S}$ ) evaluados para distintas temperaturas de elaboración de cápsulas de quitosano (a) y distintas temperaturas de medición (b). Las cápsulas elaboradas a 24 °C contenían células de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizadas. Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	48
Figura 12	Valores promedio la densidad óptica de cultivos de células libres de <i>Synechococcus</i> sp., con diferentes aportes de nitrógeno: fertilizante agrícola (—), nitrato de amonio (—), nitrato de sodio (----) y urea (—). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	49
Figura 13	Valores promedio de la suma del porcentaje (%) de remoción de N-NH <sub>3</sub> y N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (—). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -).	51
Figura 14	Valores promedio de la concentración de N-NH <sub>3</sub> en mg L <sup>-1</sup> (a) y el porcentaje de remoción (b) de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (—). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -).	52

#### LISTA DE FIGURAS (Continuación)

		<b>Página</b>
Figura 15	Valores promedio de la concentración de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en mg L <sup>-1</sup> (a) y el porcentaje de remoción (b) de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (—). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -).	53
Figura 16	Valores promedio de la concentración de N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en mg L <sup>-1</sup> (a) y el porcentaje de producción (b) de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (—). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -).	54

Figura 17	Valores promedio de la concentración de $\text{PO}_4^{3-}$ en $\text{mg L}^{-1}$ (a) y el porcentaje de remoción (b) de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (—). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -).	56
Figura 18	Valores promedio de la variación del pH en los cuatro tratamientos para células de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidas en forma libre (—), inmovilizada (—) medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	56
Figura 19	Valores promedio de la concentración de clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i> ) para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre (■) e inmovilizadas en cápsulas de quitosano (■). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	57
Figura 20	Valores promedio del porcentaje de proteína para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre (■) e inmovilizadas en cápsulas de quitosano (■). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	58
Figura 21	Curvas de fotosíntesis vs irradiancia (P-I) para cultivos de células de <i>Synechococcus</i> sp. inmovilizadas en cápsulas de quitosano. Valores evaluados a distintas fechas de cultivo: día 3 (■), día 6 (●) y día 9 (▲).	59
<b>LISTA DE FIGURAS (Continuación)</b>		
Figura 22	Curvas de fotosíntesis vs irradiancia (P-I) para cultivos de células de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidas en forma libre. Valores evaluados a distintas fechas de cultivo: día 3 (■), día 6 (●) y día 9 (▲).	60
Figura 23	Actividad de la nitrato reductasa (NR) durante distintas fechas de medición en cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre (■) e inmovilizados en cápsulas de quitosano (■). Las barras indican $\pm 1$ desviación estándar.	62

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
Tabla I.	Algunos ejemplos de polímeros naturales y sintéticos utilizados como material de soporte en la inmovilización de microorganismos.	6
Tabla II.	Soluciones alcalinas utilizadas para precipitar las cápsulas de quitosano.	18
Tabla III.	Concentración final de cada uno de los compuesto químico en 100 mL de medio de incubación, empleado para determinar la actividad de la nitrato reductasa (NR) <i>in situ</i> .	32
Tabla IV.	Valores promedio de las características de las cápsulas de quitosano gelificadas con distintos tiempos de contacto: espesor de la pared de las cápsulas (mm), porcentaje de precipitación (%), densidad óptica (DO) inicial y final, y tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) del día 2 al 12 de cultivo. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; $a < b$ ).	36
Tabla V.	Valores promedio de la densidad celular ( $\times 10^8$ células mL <sup>-1</sup> ) y la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) en 10 días de cultivo de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidas en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano a tres temperaturas. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en una misma columna indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; $a < b < c$ ).	41
Tabla VI.	Valores promedio de la densidad celular inicial y final (en $10^8$ células mL <sup>-1</sup> ) y la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ), en 10 días de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano y con tres densidades de inóculo. Los valores entre paréntesis	45

indican la desviación estándar; las letras iguales en una misma columna indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b < c$ ).

### LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla VII	Valores promedio de la densidad celular inicial y final ( $10^8$ células $\text{mL}^{-1}$ ), tasa de crecimiento durante la fase exponencial ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) en 10 días y tiempo de la fase exponencial de cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba Tukey; $\alpha = 0.05$ ; $a < b$ ).	46
Tabla VIII	Valores promedio de conductividad inicial y final, a 15, 25 y 40 °C, con cápsulas elaboradas a 15, 24, 25 y 40 °C. Las cápsulas elaboradas a 24 °C contenían células de <i>Synechococcus</i> sp. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; $a < b$ ).	47
Tabla IX	Valores promedio de la densidad óptica inicial y final, tasa de crecimiento durante la fase exponencial ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) en 10 días de cultivo para <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre y con diferentes aportes de nitrógeno. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ ; $a < b$ ).	50
Tabla X	Valores promedio de la eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ), fotosíntesis máxima por célula ( $P$ máx), índice de saturación lumínica ( $I_k$ ) y coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de las curvas P-I para cultivos de <i>Synechococcus</i> sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano durante distintas fechas de medición. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias	61

significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b < c$ ).

Tabla XI Trabajos de inmovilización de microalgas y cianobacterias de agua dulce que se han realizado con quitosano. 75

Tabla XII Capacidad de algunas cepas de *Synechococcus* para incorporar distintos aportes de nitrógeno. 79

#### **LISTA DE TABLAS (Continuación)**

Tabla XIII Bioenergética de la asimilación de distintos aportes de nitrógeno, tipo de enzima utilizada, forma nitrogenada reducida, número de electrones utilizados y número de moléculas de ATP utilizadas. 81

Tabla XIV Valores promedio de remoción de nitrógeno y fósforo con microalgas y cianobacterias en diferentes polímeros. 86

## **Inmovilización de Células de la Cianobacteria *Synechococcus* sp. para Remover Nutrientes de Efluentes de Cultivos Acuícolas**

### **I. Introducción**

La acuicultura es una industria que se ha desarrollado rápidamente en todo el mundo. En 1970, el aporte mundial de productos pesqueros por acuicultura fue del 3.9%, mientras que en 2002, el aporte fue del 29.9%. Este aumento es en respuesta a la demanda de alimento, la disminución de la pesca y el crecimiento poblacional (Jones y Preston, 1999; FAO, 2004). El incremento de esta actividad trae consigo distintos tipos de problemas ambientales (Páez-Osuna, 2005), hacia los ecosistemas dulceacuícolas, salobres y marinos, tales como: destrucción de manglares y marismas, producción de suelo salino, alteración del patrón de drenaje, deterioro de la calidad de las aguas receptoras, brotes de enfermedades, contaminación de los mantos acuíferos, y desarrollo de resistencia entre los organismos patógenos, entre otros principalmente (Phillips *et al.*, 1993; EVS Environment Consultants, 2000; Páez-Osuna, 2001b; Jiménez-Montealegre, 2001). Por lo anterior, para satisfacer la demanda de alimento de origen acuícola, es necesario desarrollar nueva tecnología y manejo sustentable de la zona costera con procesos que no dañen el medio ambiente.

En países como China, Tailandia, India, Indonesia, Filipinas, Malasia, Ecuador, México, Honduras, Panamá y Nicaragua, el cultivo de Peneidos es una industria rentable, aunque en algunos de estos países, el crecimiento de esta industria ha alcanzado un grado de desarrollo que se a comenzado a causar un impacto desfavorable en el ambiente (Páez-Osuna, 2005). Uno de los impactos más frecuentes encontrados en estos ambientes, es la eutroficación de los cuerpos de agua aledaños a las granjas y el subsecuente incremento de

la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Enander y Hasselstrom, 1994; Hopkins *et al.*, 1996; Páez-Osuna, 2001a).

México, al igual que otras partes del mundo, exhibe algunos de estos problemas de eutrofización, debido a que en la mayoría de las granjas de producción se descargan los efluentes de los estanques camaronícolas a los cuerpos de agua cercanos sin ningún tratamiento (Abeysinghe *et al.*, 1996; Dierberg y Kiattisimkul, 1996). Sin embargo, el efecto negativo provocado por los efluentes acuícolas sobre la calidad del agua de los cuerpos de agua receptores, depende de varios factores tales como: la magnitud de la descarga, la composición química del efluente, las características físicas y geológicas del cuerpo de agua receptor, además de la dinámica de los procesos biogeoquímicos.

Los efluentes de la industria camaronícola generalmente están enriquecidos con sólidos suspendidos, nutrientes y muestran una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO), en concentraciones que dependen del manejo de la granja (Hill *et al.*, 1997; Páez-Osuna *et al.*, 1999; Páez-Osuna, 2005). Por lo tanto, una de las preocupaciones ecológicas que existen en la actualidad, son las relacionadas con el impacto ambiental originado por la actividad acuicultural (Weston, 1991; Beveridge *et al.*, 1997; Phillips, 1998; Páez-Osuna, 2001a). Lo anterior ha generado la implementación de regulaciones sobre sus propias operaciones, además de diversas reglamentaciones relacionadas con la salud y uso de la zona costera. En México existe las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) NOM-001 y 002-SEMARNAT-1996, que establecen: (1) los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales y (2) los límites máximos permisibles de contaminación en las descargas de agua a los sistemas de alcantarillado

urbano o municipal. En nuestro país estos efluentes no se evalúan sistemáticamente, y se desconoce si existen en el territorio nacional algunas granjas de cultivo que atiendan a las disposiciones indicadas en la NOM en beneficio del ambiente acuático y de los mismos productores (Domínguez, 1999; Páez-Osuna, 2001b).

Para mitigar el impacto de los efluentes de cultivos acuícolas se han considerado numerosas alternativas, algunas de ellas son: (1) el policultivo de peces y camarón utilizando los efluentes para alimentar bivalvos y macroalgas (Jones y Preston, 1999; Jones *et al.*, 2001b; Jones *et al.*, 2002; Miranda-Baeza, 2005); (2) la disminución del contenido de proteína en el alimento suministrado (Hopkins *et al.*, 1995); (3) la disminución del porcentaje de recambio de agua (Hopkins *et al.*, 1993) y, (4) la utilización de organismos como biofiltros o removedores de productos nitrogenados y fosfatados, tales como: manglares, halófilas, macroalgas, microalgas, cianobacterias y bacterias (Lincoln y Earle, 1990; Neori *et al.*, 2000; Chopin *et al.*, 2001; Msuya y Neori, 2002; Neori *et al.*, 2004; Schuenhoff *et al.*, 2006).

La utilización del tratamiento biológico se considera un método eficiente y con un bajo costo económico, comparado con los métodos físicos y químicos. Uno de los métodos biológicos más comúnmente utilizados, es mantener a los microorganismos que biodegradarán en sistemas comunes con el material de desecho. En este tipo de procedimientos los organismos descomponen el material y éste es convertido a biomasa y energía, por ejemplo el mantenimiento de lodos activados en plantas de tratamiento de desechos urbanos y que son ampliamente utilizados en nuestro país (Daigger *et al.*, 1988; Wanner, 1994).

El tratamiento biológico de aguas de desecho, es un área que ha tenido un amplio desarrollo en varios países durante los últimos cincuenta años. Los trabajos dentro de esta especialidad han dedicado sus esfuerzos principalmente al estudio del uso potencial del cultivo de bacterias, microalgas y cianobacterias (Lincoln y Earle, 1990).

Las microalgas y cianobacterias son organismos que tienen alta capacidad de remoción de distintas formas de nitrógeno y fósforo del medio (Cañizares-Villanueva y Casas-Campillo, 1991).

La remoción de nutrientes por medio de microalgas, tiene la desventaja de que al final del tratamiento, es necesario remover la biomasa de microalgas producida. Además, que este tipo de sistema incrementa el área de suelo requerida para el tratamiento y por consiguiente causa problemas debido a la gran área utilizada para el cultivo de microalgas (Lau *et al.*, 1997).

Para contribuir a resolver el problema de las grandes áreas requeridas para el cultivo de microalgas al ser utilizadas en el tratamiento terciario, se está investigando la remoción de nutrientes por medio de biofiltración usando organismos (bacilos, bacterias, cianobacterias y microalgas) inmovilizados en distintos tipos de soportes (Yang y Wang, 1990). Los materiales usualmente utilizados como soporte para la construcción de matrices son polímeros que incluyen polisacáridos: carragenina, quitosano, alginato, agar y otros de tipo sintético tales como poliuretano, poliestireno entre otros. Uno de los principales requisitos que deben cumplir este tipo de soportes o matrices es que sean capaces de mantener la viabilidad y el crecimiento de los organismos que realizarán la biofiltración (Chevalier y de la Noüe, 1985a; Becker, 1994; Howland, 1998). Además las matrices

poliméricas deben ser: no tóxicas, fototransparentes, estables en el medio de cultivo, así como exhibir eficiente retención de la biomasa y resistencia al crecimiento de ésta, entre otras características (Mallick, 2002).

La biofiltración se distingue de otros tratamientos biológicos principalmente por la separación entre los organismos utilizados como biofiltro y el fluido a tratar. En los biofiltros la biomasa usualmente es inmovilizada en un sustrato y el fluido tratado es móvil. En los sistemas de biofiltración los contaminantes pueden ser removidos del fluido por diferentes métodos de inmovilización. La inmovilización de microorganismos dentro de matrices puede ser dividida en dos procesos principales: (1) por colonización, la cual se efectúa por la adhesión natural de microorganismos a la matriz y, (2) por inmovilización artificial en la matriz. Existe una gran variedad de tipos de inmovilización artificial de microorganismos utilizando diferentes materiales de soporte. Uno de los tipos de inmovilización que tiene un gran potencial de aplicaciones, es la inmovilización de microorganismos en matrices poliméricas tridimensionales (Cohen, 2001), el cual consiste en atrapar organismos en matrices en donde los poros tienen que ser más pequeños que el organismo a inmovilizar para no permitir pérdida de biomasa y que ésta pueda crecer en el fluido a tratar. Sin embargo, se debe determinar la porosidad de la matriz para permitir la entrada del sustrato a degradar por los organismos y un adecuado intercambio gaseoso (Mallick, 2002).

La principal desventaja que se produce al inmovilizar células en matrices poliméricas, es que puede existir una disminución en la difusión a través de la matriz, esta limitante es característica de este método. Sin embargo, este método comparado con otros

permite mantener una alta concentración de biomasa viable, una mayor resistencia a compuestos tóxicos y además ofrece la oportunidad de co-inmovilizar, diferentes especies de microorganismos separados físicamente entre sí (Cohen, 2001).

### I.1. Polímeros utilizados como soporte en la inmovilización de células

Los polímeros que son ampliamente utilizados como soporte o matriz pueden ser de tipo natural o sintético (Tabla I). Los polímeros naturales más usados para la inmovilización de células de microalgas y cianobacterias son polisacáridos, principalmente alginato y  $\kappa$ -carragenano (Robinson, 1995; Chen, 2001; Cohen, 2001; Mallick, 2002). No obstante, la inmovilización de células en alginato tiene la desventaja de que este polímero tiene baja estabilidad fisicoquímica en presencia de quelantes como fosfato y citrato (Kierstan y Coughlan, 1985). Por otra parte, el  $\kappa$ -carragenano es inestable en presencia de iones de  $\text{Na}^+$  y las condiciones para la inmovilización requieren de 30 a 50 °C de temperatura, además que es un polímero con alto costo económico.

Tabla I. Algunos ejemplos de polímeros naturales y sintéticos utilizados como material de soporte en la inmovilización de microorganismos.

Polímeros	
Naturales	Sintéticos
Carragenano	Poliacrilamida
Alginato	Polivinil alcohol
Quitosano	Polipropilen glicol
Agar	Poliuretano
Agarosa	Poliestireno
Celulosa	Polimetano

Los polímeros naturales son los que se utilizan con mayor frecuencia, ya que permiten un mayor crecimiento celular debido a que no son tóxicos. Mientras que en los polímeros sintéticos el uso de altas concentraciones de monómeros y el entrecruzamiento de agentes químicos pueden producir residuos tóxicos para las células y que esto influya negativamente en la viabilidad celular (de la Noüe *et al.*, 1990; Kaya y Picard, 1996).

Debido a las desventajas del uso del alginato y el  $\kappa$ -carragenano, se ha sugerido como alternativa el uso de quitosano para la inmovilización de cianobacterias y microalgas. A continuación se revisan algunas de las propiedades principales de este polisacárido.

### **I.1.1. Quitosano**

El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina que es ubicua en la naturaleza y existe en la pared celular de hongos, cutícula de insectos y en el exoesqueleto de crustáceos. Este biopolímero tiene características funcionales, que permiten generar matrices que han sido utilizadas con éxito como encapsulante de biomoléculas y células además de ser un polielectrolito catiónico, biocompatible y biodegradable, que presenta, entre otras, propiedades bacteriostáticas e inmunoestimulantes (Rodríguez-Sánchez y Rha, 1981; McKnight *et al.*, 1988; Kim y Rha, 1989; Polk *et al.*, 1994; Nussinovich *et al.*, 1996; Hirano, 1996).

El quitosano tiene propiedades importantes para utilizarlo como matriz polimérica, tales como la gelificación, permite mantener una alta permeabilidad, es un compuesto biodegradable, no es tóxico, es maleable e insoluble en algunas soluciones como: el agua,

en soluciones alcalinas y en solventes orgánicos, además es soluble en ácidos diluidos (Lárez-Velásquez, 2003; Pastor de Abram, 2004).

El quitosano también tiene la propiedad de atraer compuestos cargados negativamente por ser un polímero orgánico. Químicamente, el quitosano representa a una familia de biopolímeros constituidos predominantemente por residuos de poli- $\beta$ -D-glucosamina y por una menor proporción de residuos de 2 acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucosa (N-acetilglucosamina). Debido al tamaño de la molécula y su estructura química (Figura 1), el quitosano puede formar redes tridimensionales gelificadas formada por la unión física o covalente de todas las cadenas de polímeros existentes en un sistema determinado hasta formar teóricamente una sola macromolécula. Por su estructura tridimensional el quitosano tiene la propiedad de ser un elemento de retención (Felse y Panda, 1999; Lárez-Velásquez, 2003).

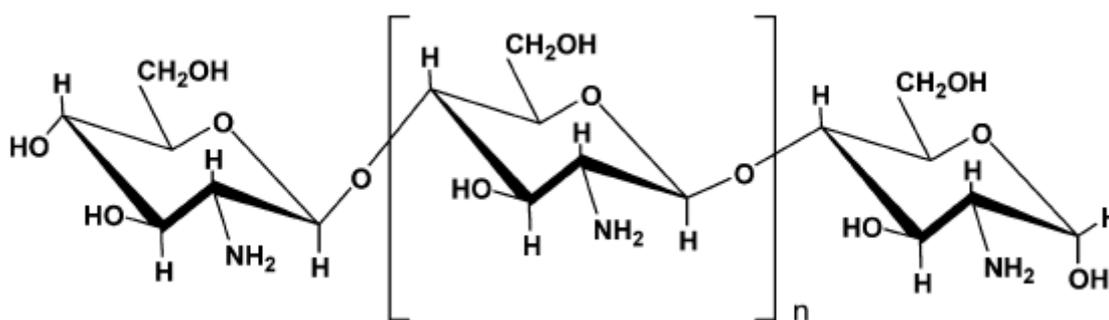


Figura 1. Estructura de la molécula de quitosano.

En nuestro país se está produciendo quitosano a nivel de planta piloto a partir de subproductos de la pesca del camarón, por el grupo de “Ingeniería de Biopolímeros” dependiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) ubicado en Hermosillo, Sonora, México. Este grupo ha desarrollando trabajos relacionados con la construcción de matrices con biopolímeros obtenidos de subproductos de la pesca y de la agroindustria (Brugnerotto *et al.*, 2001; Diaz-Rojas *et al.*, 2006).

## **I.2. Antecedentes relevantes de trabajos realizados con microalgas inmovilizadas**

de la Noüe y Proulx (1988a, b) observaron que *Phormidium* sp. inmovilizada en quitosano removía más del 80% de ortofosfato y cerca del 90% del amonio presente en un efluente secundario urbano. Sin embargo, estos autores determinaron que cerca del 60% de ortofosfato removido era precipitado debido a una alcalinización del medio causado por la liberación de iones de calcio por parte del quitosano.

Jeanfils *et al.* (1993) determinaron el efecto de la concentración de nitratos (2 y 4 mM de nitrato) con relación al crecimiento y la remoción de este ión utilizando células de *Chorella vulgaris* inmovilizadas en alginato al 4% y con células libres en el medio. Estos autores encontraron que la inmovilización de las células no afectó el crecimiento, ni la remoción de nitratos y que el mayor porcentaje de remoción de nitratos (0.46 µg de nitratos por hora por millón de células) ocurrió en el primer día de cultivo. Se encontró una tendencia similar de remoción de nitratos, entre los cultivos de células libres e inmovilizadas.

Lau *et al.* (1998) inmovilizaron células de *Chorella vulgaris* en esferas de carragenano y alginato para ser usadas en la remoción de nitrógeno y fósforo de aguas de desecho urbano. Encontraron que la tasa de crecimiento de *C. vulgaris* inmovilizada en ambos polímeros en forma individual, fue similar a la evaluada para las células libres. La fase de acondicionamiento fue mayor en las células inmovilizadas, además de que la actividad metabólica de asimilación de amonio fue mayor y contenían una mayor concentración de clorofila *a* con respecto a las células libres. La alta actividad metabólica de las células inmovilizadas en los dos tipos de polímero, permitió remover el 95% de nitrógeno y el 99% de fósforo del agua de desecho en tres días. Mientras que las células libres sólo removieron el 50% de ambos nutrientes durante el mismo periodo de tiempo.

Chen (2001) inmovilizó células de la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda*, dentro de esferas de alginato de sodio al 3% y de 4 mm de diámetro. Las células inmovilizadas se utilizaron como elemento de biofiltración en cultivos de tilapia, manteniendo las esferas en redes de nylon suspendidas en el agua con una relación de 40 esferas por litro de agua a tratar. Estos autores lograron mantener una baja concentración de amonio (5 mg L<sup>-1</sup> de amonio por 13 días) en los estanques de tilapia con las microalgas inmovilizadas, con respecto a los que no contenían microalgas (17 mg L<sup>-1</sup> de amonio por 8 días).

Cruz-Fraga (2003) inmovilizó células de *Arthrospira maxima* por el método de colonización, en membranas de quitosano, obteniendo buena viabilidad y crecimiento de esta cepa. Al cultivar *A. maxima* en forma libre e inmovilizada este autor obtuvo una remoción del 100% a partir de una concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> de amonio y fósforo a las 12

horas de cultivo. Sin embargo, reporta que las membranas de quitosano no fueron la mejor opción de inmovilización debido a que existió una liberación de células al medio.

Fierro-Reséndiz (2004) inmovilizó células de *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. en esferas de quitosano al 2%, obteniendo células viables después del proceso de inmovilización. Sin embargo, *Scenedesmus* sp. fue la especie que tuvo el mayor crecimiento, por lo cual fue utilizada para remover nitrógeno y fosfatos de un medio de cultivo simulando un efluente de aguas de desecho. Obteniendo una remoción de nitratos del 70% y de fosfatos del 94% a las 12 horas. Además logró mantener viable por siete meses a *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. inmovilizada en esferas de quitosano, almacenada en oscuridad y a una temperatura de 4 °C.

### **I.3. Efectos fisiológicos producidos en células inmovilizadas**

La inmovilización celular presenta numerosas ventajas con respecto al mantenimiento de las células libres, debido a los cambios morfológicos y fisiológicos producidos. Los cambios en las células inmovilizadas probablemente se deban a la activación de diferentes genes no activos en células libres (Cohen, 2001), lo cual causa una tasa de crecimiento más rápida y por consiguiente una mayor actividad metabólica e incluso una mayor resistencia a entornos más agresivos y agentes tóxicos (Marie y Costerton, 1981; Lau *et al.*, 1997). Sin embargo, también se han encontrado respuestas negativas al proceso de inmovilización, por ejemplo una fase de acondicionamiento mayor con respecto a la encontrada en células libres (Lau *et al.*, 1997). Lo anterior posiblemente

disminuye la actividad metabólica de las células inmovilizadas en los primeros días de cultivo y, por lo tanto, produce un retraso en la remoción de nutrientes.

El autosombreado hacia el interior de la matriz que es producido por efecto de las altas concentraciones celulares, podría ser una limitante en la utilización de células fotosintéticas. Por efecto de autosombreado se produce una disminución de la eficiencia fotosintética. La determinación de las curvas de fotosíntesis con respecto a cambios en la intensidad luminosa, así como el cálculo de los parámetros que describen esta respuesta especie-específica, son comúnmente usadas para conocer el estado fisiológico de las células (Platt, 1981).

Por efecto de la inmovilización de células pueden producirse cambios en la membrana celular y en la actividad de la nitrato reductasa, que es la enzima que convierte el nitrato a nitrito (Jeanfils *et al.*, 1993). La importancia de la caracterización enzimática en las células, es determinar la capacidad de óxido reducción de los compuestos nitrogenados del medio.

La inmovilización de células de microalgas y cianobacterias inició a mediados los 60's con los trabajos de inmovilización de *Chlorella* sp., *Chlorella pyrenoidosa*, *Anacystis nidulans* y *Porphyridium cruentum* (Park *et al.*, 1966; Hillier y Park, 1969; Mallick 2002). Sin embargo, hasta mediados de los 80's fue cuando se realizaron los primeros trabajos de inmovilización de microalgas (Chevalier y de la Noüe, 1985a, b) y cianobacterias en polímeros naturales con la finalidad de remover nitrógeno y fósforo de aguas residuales (Mallick, 2002). A finales de los 80's se realizaron los primeros trabajo de inmovilización de microalgas en quitosano (de la Noüe y Proulx, 1988a, b), en la bibliografía revizada a la

fecha existen pocos trabajos de inmovilización en quitosano y no se encontraron reportes de inmovilización de cepas marinas. Por lo anterior y debido a que existen antecedentes de que la cianobacteria *Synechococcus* sp. en cultivos de células libres remueve eficientemente nitrógeno y fósforo de aguas residuales (Aguilar-May, 2002), además tiene distintas aplicaciones biotecnológicas para la producción de glutamato e hidrógeno (Matsunaga *et al.*, 1988; Sasikala y Ramana, 1994) y potencial uso como alimento en la acuicultura (Campa-Ávila, 2002). Existen antecedentes de que el proceso de inmovilización incrementa los procesos metabólicos, por lo que se espera obtener mayores porcentajes de remoción de nitrógeno y fósforo en cultivos de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en quitosano. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de cultivos de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en cápsulas de quitosano, para remover nitrógeno y fósforo de un medio de cultivo con concentraciones de nutrientes equivalentes a un efluente de cultivo acuícola.

## **II. Objetivo**

Evaluar la capacidad de remoción de ortofosfato y de distintas formas químicas de nitrógeno, utilizando cultivos de la cianobacteria *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano.

### **II.1. Objetivos Particulares**

1. Determinar las condiciones adecuadas para la elaboración de cápsulas de quitosano mecánicamente consistentes y estables en un medio líquido.
2. Evaluar la viabilidad y el crecimiento de cultivos de la cianobacteria *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano bajo distintas condiciones de elaboración.
3. Evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmovilizados en quitosano.
4. Evaluar el efecto de la concentración de inóculo en el crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmovilizados en quitosano.
5. Determinar la capacidad de remoción de ortofosfato y de distintas formas químicas de nitrógeno al utilizar cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmovilizados en cápsulas de quitosano.

6. Medir los cambios fisiológicos producidos en *Synechococcus* sp. por efecto de la inmovilización en cápsulas de quitosano y determinar la actividad enzimática de la nitrato reductasa y de los parámetros fotosintéticos.

### **III. Materiales y Métodos**

#### **III.1. Características de la especie**

Se utilizó la cianobacteria *Synechococcus* sp. aislada a partir de muestras de agua de una granja de producción de camarón en San Blás, Nayarit México, durante el año 2001. *Synechococcus* sp. es de forma esférica y con un tamaño promedio de 2.7 micras, forma cadenas de hasta 6 células (en forma de rosario) según la fase de crecimiento. *Synechococcus* sp. tiene altas tasas de crecimiento (1.5 divisiones por día), en cultivos estáticos en un medio "f" a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C, un fotoperíodo 12:12 horas luz:oscuridad y una intensidad lumínica de  $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Además, bajo estas mismas condiciones de cultivo muestra una eficiente remoción de ortofosfato, así como también de distintas formas químicas de nitrógeno de un medio líquido (Aguilar-May, 2002).

#### **III.2. Cultivos de *Synechococcus* sp.**

Se realizaron cultivos de *Synechococcus* sp. siguiendo la secuencia clásica en sistemas estáticos (sin renovación de medio) (Stein, 1973), transfiriendo el cultivo a volúmenes progresivamente mayores desde tubo de ensaye (10 mL) a Erlenmeyer (250 mL) y posteriormente a matraces Fernbach (1 L). Se mantuvieron cultivos no axénicos, uniespecíficos y en sistema estático usando el medio de cultivo "f" descrito por Guillard y Ryther (1962). Los cultivos se mantuvieron dentro de una cámara climática (VWR Scientific, modelo 2015) a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C e irradiancia continua con valores promedio de  $35 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada por medio de una lámpara fluorescente de luz de día (Philips F40D/XPT).

### III.3. Obtención del quitosano

El quitosano utilizado en este estudio se obtuvo a partir de quitina previamente aislada del exoesqueleto de camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) y fue elaborado en el Laboratorio de Biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Hermosillo, Sonora, México. Las características del quitosano fueron: contenido de cenizas < 0.7%, contenido de proteína < 0.1%, grado de desacetilación 89.8% determinado por espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR; Brugnerotto *et al.*, 2001) y una viscosidad intrínseca  $[\eta]$  6.49 dl g<sup>-1</sup>. El valor de  $[\eta]$  se utilizó para obtener el peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) = 144,628, usando la ecuación de Mark-Houwink:  $[\eta] = K(M_v)^\alpha$ , donde  $K = 6.9 \times 10^{-4}$  dL g<sup>-1</sup> y  $\alpha = 0.77$  (Rinaudo *et al.*, 1993).

### III.4. Elaboración de cápsulas de quitosano

Se prepararon soluciones de distintas concentraciones de quitosano (1.5%, 2.0%, 3.0% y 4.0%), disuelto en ácido acético glacial al 1.0%. Cada una de las soluciones de quitosano se vertió dentro de una bureta de 25 mL. En el extremo inferior de la bureta se colocó una punta de plástico para micropipeta de 200  $\mu$ L con un diámetro externo de 1.5 mm. Debido a la viscosidad de las soluciones y para facilitar el goteo del quitosano fue necesario aplicar presión con aire en el extremo superior de la bureta, por medio de una bomba de aireación para acuario marca Hagen modelo "Optima".

Para obtener por precipitación cápsulas de quitosano, se ensayaron distintas soluciones alcalinas (Tabla II). Cada una de las soluciones de quitosano se goteó a través de una bureta en un vaso de precipitados con 100 mL de cada una de las soluciones alcalinas de forma independiente. Las cápsulas obtenidas, se mantuvieron en agitación durante 300 s dentro de un vaso de precipitado con la solución alcalina en que fueron precipitadas, posteriormente se filtraron con una malla de plástico ( $\Phi = 400 \mu\text{m}$ ) y fueron lavadas con agua de mar estéril para eliminar residuos de NaOH, hasta que el agua de lavado tenía un pH aproximado a 8. Las cápsulas se transfirieron a tubos de ensaye de 20 mL con 10 mL de medio “f”. Se realizaron observaciones al microscopio durante 15 días, para monitorear la estabilidad de las cápsulas en el medio de cultivo.

Tabla II. Soluciones alcalinas utilizadas para precipitar las cápsulas de quitosano.

Formula química	Concentración
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.56 M
$\text{NH}_4\text{OH}$	7.14 $\mu\text{M}$
$\text{NH}_4\text{OH}$	0.03 M
$\text{NH}_4\text{OH}$	0.30 M
$\text{NH}_4\text{OH}$	3.00 M
NaOH	0.05 N
NaOH	0.10 N

### **III.5. Viabilidad y crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano comparado con el crecimiento de células libres**

#### **III.5.1. Viabilidad de *Synechococcus* sp.**

Para la inmovilización de células de *Synechococcus* sp. se cosecharon 600 mL de un cultivo en fase exponencial y se concentraron mediante centrifugación en tubos de 50 mL a una velocidad de 2465 g durante 30 min. Una vez formado el precipitado se eliminó el sobrenadante hasta reducir el volumen a 5 mL. Del concentrado de células se extrajo una alícuota de 500  $\mu$ L la cual se mezcló con 20 mL de una solución de quitosano al 2.0% disuelto en ácido acético al 1.0% y con pH = 4. La solución de quitosano con células de *Synechococcus* sp. se vertió en una bureta de 25 mL y se goteó en un vaso de precipitado de 200 mL con 100 mL de NaOH 0.1 N, las cápsulas formadas se mantuvieron por 300 s en agitación en el NaOH 0.1 N, se lavaron con agua de mar estéril y se transfirieron a tubos de ensaye de 20 mL con 10 mL de medio "F". Todos los ensayos se realizaron por triplicado, bajo las condiciones de cultivo descritas en el apartado III.2.

La viabilidad de las células inmovilizadas de *Synechococcus* sp. se determinó diariamente durante 10 días por observaciones directas al microscopio estereoscópico marca Wild con un lente 6X. Las observaciones se hacían directamente en las cápsulas evaluando cualitativamente la coloración de las cápsulas y el incremento del tamaño de las colonias de *Synechococcus* sp. Además, se evaluó la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR/4000 UV-VIS. Para la determinación de la DO *in vivo*, los tubos de ensaye que contenían cápsulas de quitosano sin células se utilizaron como blanco para las lecturas espectrofotométricas. Para aumentar

la señal de lectura se utilizó un difusor de luz situado entre la muestra y el fotomultiplicador, con la finalidad de homogenizar la dispersión de la luz que causan las formas esféricas de las cápsulas. Con los datos de DO se determinó la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) como lo describe Nieves *et al.* (1998).

### **III.5.2. Efecto del tiempo de contacto de las cápsulas de quitosano con el NaOH**

Con la finalidad de disminuir el efecto del NaOH sobre la viabilidad de las células de *Synechococcus* sp. se utilizaron tres tiempos de contacto (80, 140 y 300 s).

Para el primer tiempo (80 s), se goteó la solución de quitosano con  $8.9 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup> de *Synechococcus* sp. durante 1 min en el NaOH y una vez cerrado el flujo de quitosano, las cápsulas formadas se dejaron por 20 s más en el NaOH con agitación. En el segundo tiempo (140 s), la solución de quitosano con la misma concentración celular se goteó durante 2 min para la formación de las cápsulas y posteriormente se dejaron en la solución de NaOH por 20 s más. En el tercer tiempo (300 s) la solución de quitosano con células se goteó durante 5 min en el NaOH, una vez transcurridos los 5 min las cápsulas formadas se retiraron del NaOH.

Las cápsulas obtenidas en cada uno de los tratamientos fueron filtradas con una malla plástica de 400  $\mu$ m y se lavaron con agua de mar estéril, las cápsulas se transfirieron a tubos de ensaye de 10 mL con 7 mL de medio "f". Todos los ensayos se realizaron por triplicado, bajo las condiciones de cultivo descritas en el apartado III.2.

El crecimiento del cultivo de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en quitosano se registró durante 12 días por medio de evaluaciones diarias de la DO, la cual se

determinó de la misma manera en que se describió en el apartado anterior (III.5.1.), e igualmente se determinó la tasa de crecimiento acumulada.

Para evitar la introducción de otras especies de microalgas y una probable sucesión de especies, el agua utilizada para lavar las cápsulas fue filtrada a través de filtros de cartucho de diferentes medidas (10, 5 y 1  $\mu\text{m}$ ), irradiada con luz ultravioleta (UV) y posteriormente esterilizada en una autoclave marca Yamato modelo SM510 a 121  $^{\circ}\text{C}$  y 1.05  $\text{kg m}^{-2}$  de presión durante 15 min.

### **III.5.3. Crecimiento a distinta temperatura para células inmovilizadas y libres**

Se cosechó un cultivo de *Synechococcus* sp. en fase exponencial (día 6) y se centrifugó a 2465 g durante 30 min. Se preparó una solución de quitosano al 2% la cual fue mezclada con las células de *Synechococcus* sp. concentradas por centrifugación con la cual se procedió a elaborar las cápsulas precipitadas en NaOH 0.1 N con un tiempo de contacto de 80 s. La temperatura ambiental durante la elaboración de las cápsulas fue de 24  $^{\circ}\text{C} \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ . El crecimiento de *Synechococcus* sp. en cultivo fue evaluado a tres diferentes temperaturas experimentales (15, 25 y 30  $^{\circ}\text{C} \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ ) mantenidas en forma libre e inmovilizadas en quitosano.

Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 100 mL de medio "f" con 400 cápsulas para cada unidad experimental. De igual forma se realizaron cultivos con células libres, considerando obtener la misma densidad celular que los cultivos con células inmóviles. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada temperatura y condición experimental y a una irradiancia de luz continua promedio de

$35 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada por medio de lámparas fluorescentes de luz de día (Philips F40D/XPT).

El crecimiento se evaluó durante diez días de cultivo por medio de conteos directos al microscopio compuesto utilizando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad. Para los conteos de las células inmovilizadas se recolectó cada día una cápsula y para los cultivos de células libres se tomó una alícuota de 1 mL del medio de cultivo líquido.

Para contar las cápsulas recolectadas se disolvieron en ácido acético al 50% y para disgregar las células de las cápsulas se utilizó un aparato de ultrasonido “Ultrasonic Processor” a una amplitud de 20 MHz durante 1 min con pulsaciones de 6 s. Con los resultados de los conteos de células libres e inmóviles para cada situación experimental se obtuvo la tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) (Nieves *et al.*, 1998).

#### **III.5.4. Crecimiento con distintas densidades de inóculo de células inmovilizadas y libres**

Se cosecharon células de *Synechococcus* sp. de un cultivo en fase exponencial (día 6) y se centrifugaron a 2465 g durante 30 min. Se preparó una solución de quitosano al 2% con la cual se obtuvieron mezclas con tres distintas concentraciones de células:  $0.060 \times 10^8$  cél mL<sup>-1</sup> (alta),  $0.033 \times 10^8$  cél mL<sup>-1</sup> (media) y  $0.016 \times 10^8$  cél mL<sup>-1</sup> (baja). Con cada una de las concentraciones celulares, de forma independiente se formaron cápsulas y fueron precipitadas en NaOH 0.1 N con un tiempo de contacto de 80 s.

En matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 100 mL de medio “F” se colocaron 400 cápsulas de cada concentración celular. De igual forma se realizaron

cultivos con células libres considerando que quedarán densidades de células similares en cada caso. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, bajo las condiciones de cultivo descritas en el apartado III.2.

Diariamente se evaluó el crecimiento de las células libres e inmovilizadas por medio de conteos al microscopio compuesto tal como se describe en la sección III.5.3., e igualmente se determinó la  $\Sigma\mu$ .

### **III.5.5. Crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. en forma inmovilizada y libres**

Con base en los resultados obtenidos en ensayos anteriores, se inmovilizaron células de *Synechococcus* sp. para lo cual se utilizó una solución de quitosano al 2% en ácido acético al 1% con ajuste de pH = 4. Las cápsulas se precipitaron en una solución de NaOH 0.1 N y se dejaron por 80 s en la solución con agitación constante, la concentración del inóculo fue de  $0.070 \times 10^8$  cél mL<sup>-1</sup>. Durante el proceso de inmovilización, la mezcla quitosano-células se preparó cada 10 mL y la solución de NaOH se renovó cada 20 mL de precipitación de la mezcla quitosano-células.

El cultivo de células inmovilizadas se mantuvo por triplicado con 400 cápsulas en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y 100 mL de medio "f". Como control del crecimiento de las células inmovilizadas, se realizaron por triplicado cultivos de células libres utilizando una cantidad de inóculo similar al tratamiento de las células inmovilizadas.

Los cultivos se mantuvieron dentro de una cámara climática a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C y a una irradiancia de luz continua promedio de  $35 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  suministrada por

lámparas fluorescentes de luz de día (Philips F40D/XPT). El crecimiento se evaluó por medio de conteos directos al microscopio compuesto tal como se describe en la sección III.5.3. Con los resultados de los conteos de células libres e inmóviles se obtuvo la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) (Fogg y Thake, 1987) y la  $\sum\mu$ . Al final de la curva de crecimiento se midió el largo y ancho de las cápsulas con células y sin células utilizando un microscopio estereoscópico marca Wild con una lente de 6X.

### **III.6. Difusión iónica con cápsulas de quitosano elaboradas a distintas temperaturas**

Se elaboraron cápsulas de quitosano sin células a tres temperaturas de gelificación (15, 25 y  $40 \pm 1$  °C), siguiendo la técnica descrita en la sección III.5.3. El control de la temperatura del baño de NaOH donde se elaboraron las cápsulas fue por medio de un baño maría.

Una vez formadas las cápsulas en las tres temperaturas experimentales, se procedió a evaluar, la difusión iónica (conductividad) en agua destilada a 15, 25 y  $40 \pm 1$  °C. La temperatura del agua destilada fue mantenida con un baño maría con temperatura controlada. Además, en las tres temperaturas se determinó la difusión iónica de cápsulas de quitosano con células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas y elaboradas a  $24 \pm 1$  °C, con el procedimiento descrito en la sección III.5.3.

Para medir la difusión iónica, se utilizó un conductímetro Omega CDB-430 modelo 4330, inmerso en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada y 50 cápsulas de quitosano con células y sin células de forma independiente. Las determinaciones de la

conductividad se realizaron durante los primeros 5 min en intervalos de 15 s y posteriormente las mediciones fueron cada 5 min hasta llegar a los 40 min.

### **III.7. Remoción de nitrógeno y fósforo en cultivos de *Synechococcus* sp. en forma inmovilizada y libre**

#### **III.7.1. Crecimiento con distintos aportes de nitrógeno**

Se realizaron cultivos de *Synechococcus* sp., en forma libre, mantenidos en 4 diferentes medios de cultivo con distintos aportes de nitrógeno. La formulación de los medios de cultivo, se realizó considerando el aporte de nitrógeno y la relación atómica de los nitratos del medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962), los demás compuestos del medio de cultivo se mantuvieron sin modificación. Los distintos aportes de nitrógeno fueron:

1. Nitrógeno de fertilizantes agrícolas (7.8% de amonio, 7.8% de nitrato y 16.4% de urea)
2. Nitrato de amonio (50% de amonio y 50% de nitrato)
3. Nitrato de sodio (100%)
4. Urea (100%)

Los cultivos se mantuvieron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 100 mL de medio de cultivo equivalente al medio “f”, bajo las condiciones de cultivo descritas en la sección III.2. Diariamente se evaluó el crecimiento de las células libres por medio de la medición de DO a 550 nm en un espectrofotómetro marca Hach modelo DR/4000 UV-VIS.

### III.7.2. Remoción de nitrógeno y fósforo

Se elaboraron cápsulas de quitosano con células utilizando cultivos concentrados de *Synechococcus* sp. de forma similar a la descrita en la sección III.5.3. Debido a que se requirió un gran número de cápsulas de quitosano en los ensayos de remoción de nutrientes, fue necesario centrifugar 100 mL de cultivo a 2465 g durante 30 min cada vez que se preparaban 10 mL de de la mezcla quitosano-*Synechococcus* con la cual se obtenían las cápsulas. Se elaboraron cápsulas de quitosano sin células de *Synechococcus* sp. utilizando el procedimiento descrito en la sección III.5.3.

Con base en los resultados del ensayo descrito en la sección III.7.1, y debido a la necesidad de remover de los efluentes de cultivos acuícolas el nitrógeno en forma de amonio, se decidió utilizar el medio de cultivo con nitrato de amonio manteniendo los demás elementos del medio como lo descrito para el medio “f”. El medio de cultivo elaborado con nitrato de amonio se denominó E, y cuando se utilizó el doble de la concentración de nutrientes se denominó como medio 2E.

Las cápsulas con células y sin células se mantuvieron en aclimatación al medio E por un periodo de 3 días, mantenidas dentro de una cámara climática bajo las condiciones de luz y temperatura ya descritas en la sección III 2.

Para determinar y comparar la capacidad de *Synechococcus* sp. para remover amonio y ortofosfato en cultivos de células inmovilizadas y libres, se realizaron por triplicado cultivos monoespecíficos y no axénicos de *Synechococcus* sp. en frascos de vidrio de 1 L de capacidad con 500 mL de medio 2E en los siguientes tratamientos:

- a) Medio 2E sin microalgas, ni cápsulas de quitosano
- b) Cápsulas de quitosano sin células más medio 2E
- c) Cultivos de *Synechococcus* sp. en forma libre más medio 2E
- d) Cultivos de *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano más medio 2E

Los dos primeros tratamientos se utilizaron como control: El primero (a), se utilizó para evaluar las transformaciones químicas o pérdidas de nutrientes como proceso natural que se dan en el medio de cultivo. El segundo (b), se utilizó para evaluar las posibles transformaciones químicas por interacciones entre los nutrientes y las cápsulas de quitosano. Para este tratamiento se colocaron 3 cápsulas  $\text{mL}^{-1}$  de quitosano sin células.

Los cultivos del tercer tratamiento (c), se utilizaron para determinar la remoción de nutrientes con células libres, los cuales se inocularon con 10 mL de cultivo de *Synechococcus* sp., con una concentración de  $2.5 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  y que fue una densidad equivalente a tener 3 cápsulas con células. El cuarto tratamiento (d), fue con la finalidad de determinar la remoción de nutrientes con células encapsuladas en quitosano y se inocularon con 3 cápsulas  $\text{mL}^{-1}$  a una concentración de  $2.5 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Todos los tratamientos fueron mantenidos sin control de pH y dentro de una cámara climática bajo las condiciones de luz y temperatura ya descritas en la sección III 2.

Con la finalidad de determinar el porcentaje de remoción de nutrientes para cada tratamiento, durante un lapso de siete días se recolectó un volumen de 40 mL de medio, con la siguiente frecuencia del muestreo: a 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días de cultivo. Antes de analizar las muestras, el medio se filtró utilizando filtros de fibra de vidrio

(Osmonics GF/C) de 2.4 cm de diámetro. Para cada muestreo se evaluó la concentración de nitratos, nitritos, amonio y ortofosfatos, siguiendo las técnicas espectrofotométricas, descritas para un Hach modelo DR/4000 UV-VIS.

Los nitratos se evaluaron por el método de reducción de cadmio, los nitritos por el método de diazotización, el amonio por el método de salicilato y los ortofosfatos con el método de ácido ascórbico (Hach, 1997).

Con la misma frecuencia de muestreo antes mencionada se evaluó la cantidad de clorofila, biomasa y proteína, a partir de una alícuota de cultivo de *Synechococcus* sp. Para los ensayos con células libres se filtraron 10 mL de cada cultivo y para los ensayos con células inmovilizadas se recolectaron 5 cápsulas. Lo anterior se realizó para cada parámetro y horario de muestreo. La clorofila *a* se midió por la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984). La determinación de la biomasa, fue por peso seco según la técnica descrita por Sorokin (1973), y la determinación de proteínas por el método descrito por Lowry *et al.* (1951). En el mismo horario de la recolecta de muestra se midió el pH en cada condición experimental.

Para estandarizar la concentración de clorofila *a* con base en la densidad celular, en cada muestreo se recolectó 1 mL de cultivo para el caso de células libres y una cápsula de los cultivos de células inmóviles. Para los conteos de las células inmovilizadas se siguió el tratamiento descrito en el apartado III.5.3. y se procedió a realizar los conteos al microscopio.

### **III.8. Efecto del proceso de inmovilización en la respuesta fisiológica de *Synechococcus* sp.**

#### **III.8.1. Curvas fotosintéticas (P-I)**

Para determinar el posible cambio fisiológico producido por la inmovilización de células de *Synechococcus* sp., se realizaron curvas de fotosíntesis con respecto a la intensidad luminosa (P-I) para cultivos con células inmovilizadas. De igual forma y para utilizarse como control de la respuesta fotosintética de *Synechococcus* sp. se realizaron curvas P-I para cultivos con células libres. Las muestras fueron obtenidas de cultivos de células inmovilizadas y libres mantenidos dentro de una cámara climática bajo las condiciones de luz y temperatura ya descritas en la sección III 2.

Las curvas P-I se realizaron en tres distintos días de cultivo (3, 6 y 9) para cada condición y unidad experimental. Para las células inmovilizadas se utilizaron 10 cápsulas para realizar la curva P-I, mientras que para las células libres se utilizaron 10 mL de cultivo. En ambos casos las células fueron acondicionadas a oscuridad durante 5 min, con el fin de que se mantuvieran ávidas de luz. Para la determinación de la evolución de oxígeno se utilizó una lámpara de halógeno (Xenophot HLX, Osram, Munich, Germany), mantenida en un proyector de diapositivas como fuente de iluminación para la fotosíntesis. Se utilizaron 6 filtros de malla plástica para obtener un gradiente de 8 distintas intensidades de luz desde los 30 a los 831  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La cantidad de oxígeno producido se determinó con un electrodo de oxígeno (YSI 5331, Yellow Spring Instrumets Co., OH, USA) el cual se encontraba dentro de una cámara de acrílico transparente para realizar medidas en fase líquida con una capacidad de 6 mL. La irradiancia dentro de la cámara de fotosíntesis, se

medió con un sensor esférico  $4\pi$  (Biospherical Instruments Inc.). La temperatura ambiente durante las mediciones se mantuvo en un promedio de  $31 \pm 1$  °C.

Para construir las curvas fotosintéticas se relacionó la cantidad de oxígeno producido en un intervalo de tiempo, en función de la cantidad de las células contenidas en la cámara. La tasa fotosintética se expresó en  $\text{fmol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y se determinaron los distintos parámetros que describen la curva de fotosíntesis ( $P_{\text{máx}}$  o fotosíntesis máxima,  $\alpha$  o eficiencia fotosintética y  $E_k$  o índice de saturación lumínica) (Platt, 1981; Figueroa *et al.*, 1997).

### **III.8.2. Actividad de la nitrato reductasa (NR)**

La determinación de la actividad de la NR se realizó de forma simultánea a la realización de las curvas P-I, siguiendo la metodología descrita por Corzo y Niell, (1991).

Para la medición de la NR *in situ* se requirió de:

1. Un amortiguador del pH
2. Un compuesto capaz de hacer permeable la membrana de *Synechococcus* sp.
3. Un aporte de poder reductor y
4. Un aporte de nitrógeno

La determinación de la NR, se realizó en tubos de ensaye cubiertos con papel aluminio a los cuales se adicionaron 5 mL del medio de incubación (Tabla III) y se les suministró nitrógeno gaseoso por burbujeo durante 2 min con la finalidad de desplazar en su totalidad el oxígeno. Se analizó por triplicado una muestra de cada tipo de cultivo: para

el tratamiento de células inmovilizadas se utilizaron 50 cápsulas y para el tratamiento de células libres se utilizaron 2 mL del cultivo.

Una vez que las células se encontraban en el tubo con el medio de incubación, se adicionó nitrógeno gaseoso durante 2 min y se incubó en oscuridad durante 30 min. La concentración de nitritos producidos para cada tipo de cultivo, fue evaluada utilizando el método de diazotización descrito para un Hach modelo DR/4000 UV-VIS.

La actividad de la NR se relacionó con la cantidad de nitritos producido en un intervalo de tiempo, en función de la concentración de clorofila *a*. La cantidad de clorofila *a* se determinó siguiendo el método descrito por Parsons *et al.* (1984).

Tabla III. Concentración final de cada uno de los compuesto químico en 100 mL de medio de incubación, empleado para determinar la actividad de la nitrato reductasa (NR) *in situ*.

Compuesto	Concentración
KNO <sub>3</sub>	30 mM
Glucosa	10 mM
Fosfato sódico	0.1 M
Na-EDTA	0.5 mM
1-propanol	0.1% <sup>v</sup> / <sub>v</sub>

### **III.9. Tratamiento estadístico de los datos**

#### **III.9. 1. Elaboración de cápsulas y crecimiento de *Synechococcus* sp.**

Se realizaron análisis de covarianza (ANCOVA) de forma independiente para determinar las posibles diferencias en el crecimiento de *Synechococcus* sp. debidas a: el efecto del tiempo de contacto de las cápsulas con el NaOH, el efecto de la temperatura en cultivos de células libres e inmóviles, el efecto de la concentración de inóculo en cultivos de células libres e inmóviles y para comparar el crecimiento entre células libres respecto de las inmovilizadas.

Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) de forma independiente para determinar las posibles diferencias entre las variables de los ensayos de inmovilización de *Synechococcus* sp. las cuales fueron: el espesor de la pared de las cápsulas, el porcentaje de gelificación de las cápsulas y para determinar el efecto de la temperatura de elaboración de las cápsulas y la temperatura de medición sobre la difusión iónica. De igual forma se analizaron los distintos parámetros indicadores de crecimiento (la DO, la concentración de células, la  $\mu$ , y la  $\sum\mu$ ), en cada experimento tanto para células libres e inmovilizadas según fue requerido.

Se utilizó una prueba t-Student para determinar posibles diferencias entre el tamaño de las cápsulas con células y sin células de *Synechococcus* sp.

### III.9. 2. Remoción de nitrógeno, fósforo, fotosíntesis y actividad de la NR

Se realizaron ANCOVA de forma independiente para determinar las posibles diferencias en: el crecimiento de *Synechococcus* sp. en cultivos con distintos aportes de nitrógeno con células libres. De igual forma para determinar posibles diferencias entre células libres e inmóviles respecto a: la remoción de distintas formas de nitrógeno y fósforo, el contenido de clorofila *a*, el contenido de proteína, la respuesta fotosintética y la actividad de la nitrato reductasa.

Se utilizó un ANOVA para determinar las posibles diferencias entre células libres e inmóviles respecto a los distintos parámetros fotosintéticos (la  $\alpha$ , la P máx y el  $I_k$ ).

Para todas las pruebas estadísticas antes mencionadas se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan las pruebas, con la finalidad de decidir si se utilizaría estadística paramétrica o no paramétrica (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984). Cuando se encontraron diferencias significativas en los análisis estadísticos antes descritos se aplicó la prueba *a posteriori* de Tukey, para evaluar entre cuales tratamientos existieron estas diferencias. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA<sup>®</sup> versión 6 (StatSoft, Inc., 2002) y un nivel de significancia de 0.05.

## **IV. Resultados**

### **IV.1. Elaboración de cápsulas de quitosano**

Con las soluciones de quitosano del 2%, 3% y 4%, se formaron cápsulas con consistencia rígida, la solución de 1.5% no permitió obtener cápsulas consistentes. En las soluciones del 3% y 4% el quitosano no se disolvió totalmente. El pH de la solución de ácido acético utilizado para disolver el quitosano se ajustó a 4, cuando el pH fue menor de este valor no se obtenían cápsulas.

El  $\text{NH}_4\text{OH}$  y  $\text{NaOH}$  permitieron la obtención de cápsulas. La forma de las cápsulas elaboradas en la solución de  $\text{NaOH}$  fue homogénea y con un goteo regular con respecto a las obtenidas con la solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Cuando la concentración de  $\text{NaOH}$  fue menor a 0.1 N las cápsulas que se formaron no gelificaron totalmente.

Las cápsulas elaboradas con quitosano al 2% y precipitadas en una solución de  $\text{NaOH}$  0.1 N, fueron estables en forma y consistencia durante los 15 días y no se observó cambio en el tamaño.

### **IV.2. Viabilidad y crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano comparado con el crecimiento de células libres**

#### **IV.2.1. Viabilidad de *Synechococcus* sp.**

Al siguiente día del proceso de inmovilización se encontró una viabilidad del 48% y llegó a un 60% al día 10 de cultivo. La tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) durante la fase exponencial fue de 0.32 divisiones en 8 días. Se observó una coloración heterogénea entre las cápsulas, lo que se relacionó con un distinto crecimiento asociado al proceso de

elaboración de las cápsulas (Figura 2). Durante los 15 días de cultivo de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas, no se observó crecimiento de células en la pared externa de las cápsulas independientemente del espesor de la pared de la cápsula.

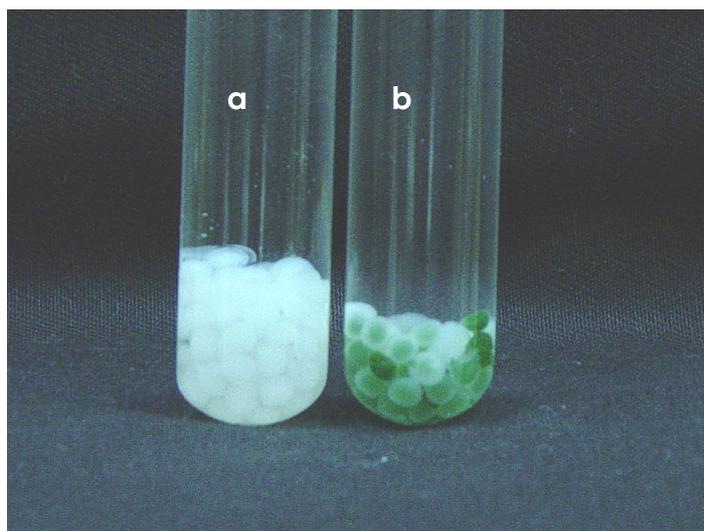


Figura 2. Cápsulas de quitosano. (a) cápsulas de quitosano sin células. (b) cápsulas de quitosano con células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas.

#### **IV.2.2. Efecto del tiempo de contacto de las cápsulas de quitosano con el NaOH**

El tiempo de contacto de las cápsulas de quitosano en la solución de NaOH resultó en una relación directa con respecto al espesor de la pared de la cápsula. En las cápsulas elaboradas con 300 s de tiempo de contacto se precipitó el 100% del quitosano (Tabla IV).

El crecimiento del cultivo de *Synechococcus* sp. mostró una relación inversa con respecto al tiempo de contacto con el NaOH. Las cápsulas con menor tiempo de contacto en la solución de NaOH resultaron significativamente ( $F = 27.42$ ,  $p = 0.001$ ) con una

mayor tasa de crecimiento acumulada. El primer día de cultivo se observó un decaimiento de la DO en los tres tratamientos debido al proceso de inmovilización (Figura 3). El tiempo de contacto de 80 s para la gelificación de las cápsulas, fue el que permitió obtener una mayor tasa de crecimiento de las células inmovilizadas (Tabla IV; Figura 3).

De forma similar a lo descrito en el inciso IV.2, se encontró en los tres tiempos de contacto ensayados, un cambio de coloración de las cápsulas respecto al tiempo de elaboración. Las cápsulas que primero gelificaron tuvieron una menor coloración (blanqueamiento) y se consideró que hubo una menor viabilidad y crecimiento de las células inmovilizadas.

Tabla IV. Valores promedio de las características de las cápsulas de quitosano gelificadas con distintos tiempos de contacto: espesor de la pared de las cápsulas (mm), porcentaje de precipitación (%), densidad óptica (DO) inicial y final, y tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) del día 2 al 12 de cultivo. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ; a < b).

Tiempo de contacto	80 segundos	140 segundos	300 segundos
Espesor	0.104 (0.009) a	0.191 (0.022) a	2.763 (0.292) b
%	3.464 (0.309) a	6.391 (0.737) a	92.106 (9.737) b
DO inicial	0.578 (0.061) a	0.502 (0.070) a	0.575 (0.060) a
DO final	1.223 (0.116) b	0.493 (0.082) a	0.350 (0.056) a
$\Sigma\mu$	1.465 (0.192) b	0.563 (0.254) a	0.320 (0.434) a

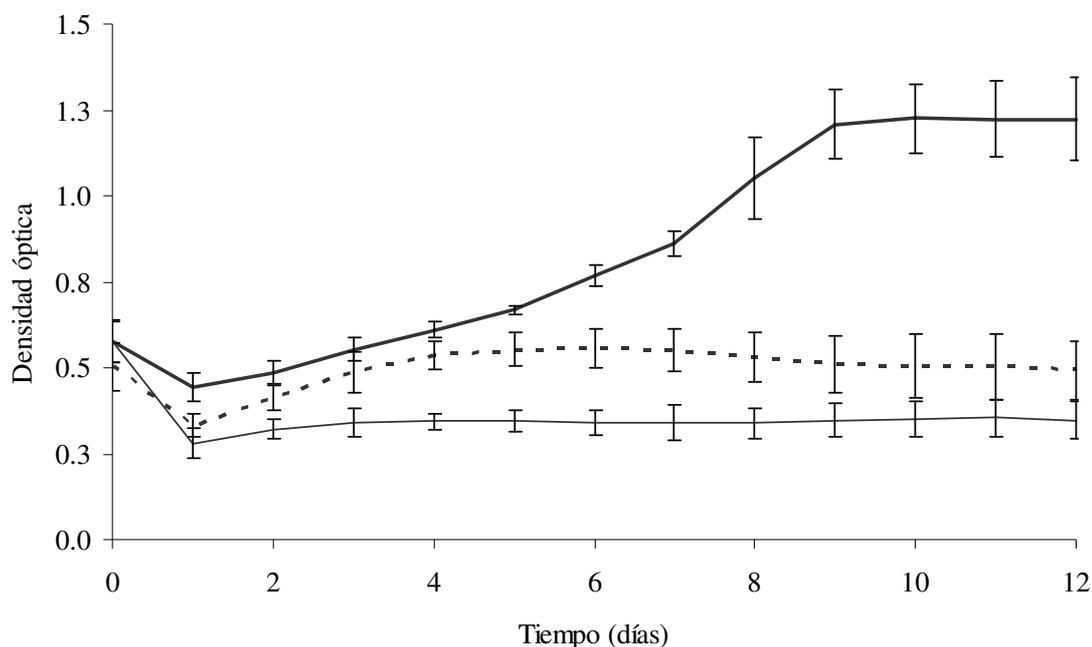


Figura 3. Valores promedio de la densidad óptica de cultivos de *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano, con diferentes tiempo de contacto en NaOH 0.1 N: 80 s (—), 140 s (- - -) y 300 s (· · ·). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

#### IV.2.3. Crecimiento a distintas temperaturas para células inmovilizadas y libres

##### Cultivos de células inmovilizadas

Se encontraron diferencias significativas ( $F = 8.84$ ;  $p < 0.001$ ) en las curvas de crecimiento de los cultivos de *Synechococcus* sp. expuestos a tres temperaturas (Figura 4). Los cultivos a 30 °C tuvieron significativamente ( $p < 0.001$ ) una mayor tasa de crecimiento respecto a los cultivos a 15 °C. En tanto que los cultivos a 25 °C no fueron significativamente diferentes respecto a los cultivos de 15 °C ( $p = 0.059$ ) y 30 °C ( $p = 0.148$ ).

Las curvas de crecimiento de los cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en las tres temperaturas mostraron una fase de acondicionamiento de dos días y una fase exponencial de 4 días (Figura 4).

En la concentración celular final de los cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en las tres temperaturas no se encontraron diferencias significativas ( $F = 3.69$ ;  $p = 0.089$ ). La mayor concentración celular fue a 30 °C y la menor a 15 °C (Tabla V). La tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) no presentó diferencias significativas ( $F = 2.88$ ;  $p = 0.133$ ) (Figura 6; Tabla V).

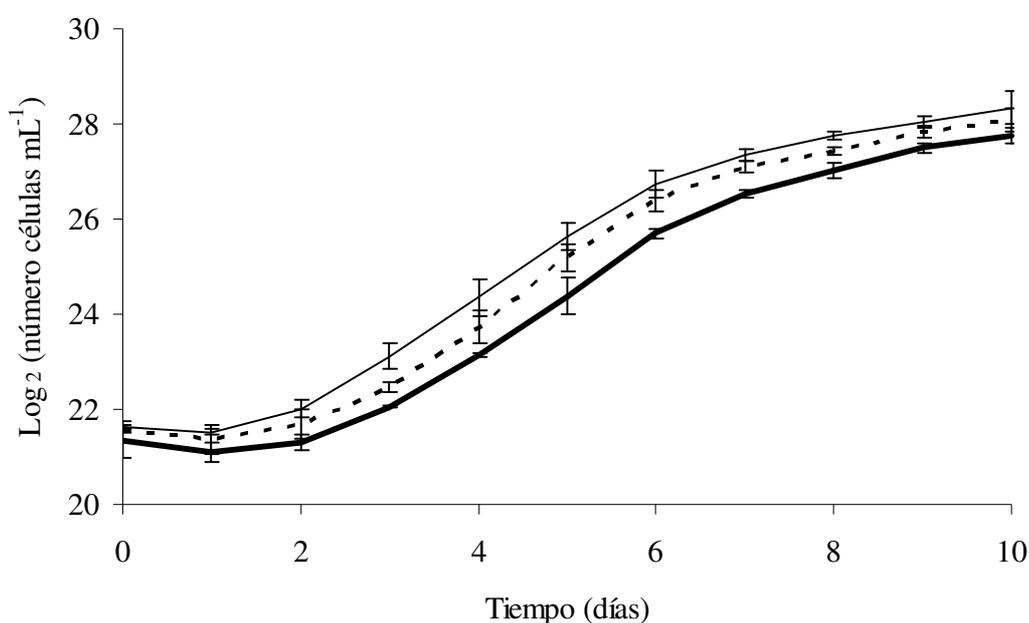


Figura 4. Valores promedio de la concentración celular de *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano y cultivada a distintas temperaturas: 15 °C (—), 25 °C (- - -) y 30 °C (— · —). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

### Cultivos de células libres

Los cultivos de *Synechococcus* sp. en forma libre y mantenidos en las tres temperaturas mostraron diferencias significativas ( $F = 45.08$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 5). La mayor tasa de crecimiento se obtuvo en los cultivos mantenidos a 30 °C

En los cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en las tres temperaturas no se observó fase de acondicionamiento y la fase exponencial fue del día 1 al día 4 (Figura 5).

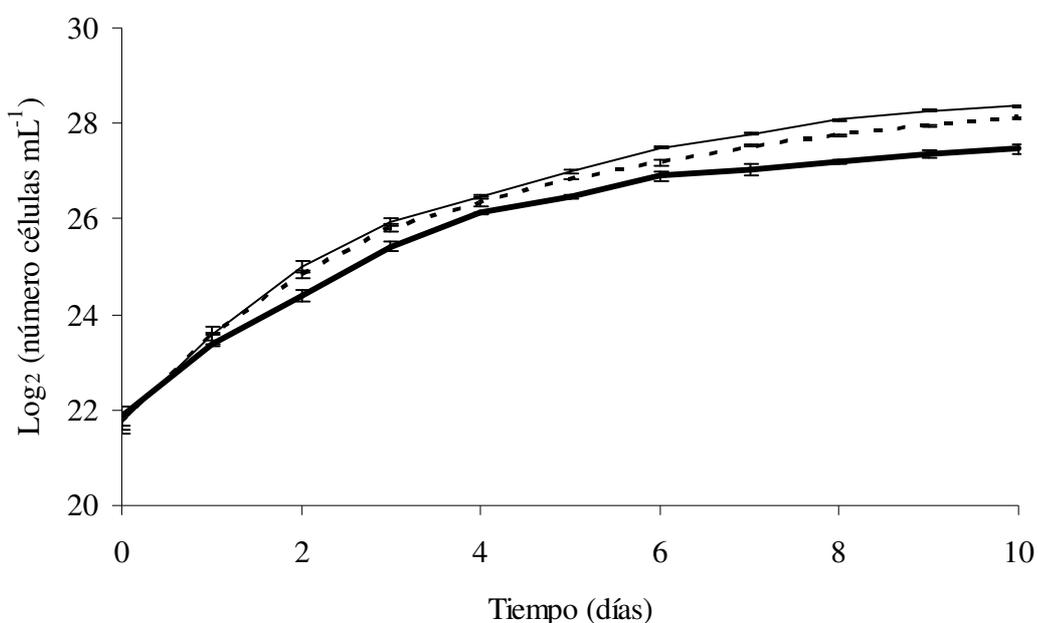


Figura 5. Valores promedio de la concentración celular de *Synechococcus* sp. en forma libre y cultivada a distintas temperaturas: 15 °C (—), 25 °C (- - -) y 30 °C (— · —). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

La concentración celular final de *Synechococcus* sp. fue significativamente diferente para los cultivos expuestos a las tres temperaturas ( $F = 255.48$ ;  $p < 0.001$ ). La

mayor concentración celular se obtuvo a 30 °C y la menor a 15 °C (Tabla V). La  $\sum\mu$  mostró diferencias significativas ( $F = 13.33$ ;  $p = 0.006$ ). La  $\sum\mu$  de los cultivos mantenidos a 30 y 25 °C fueron similares ( $p = 0.964$ ), pero ambas significativamente diferentes con respecto a la  $\sum\mu$  de los cultivos a 15 °C ( $p = 0.007$  y  $p = 0.028$ , respectivamente).

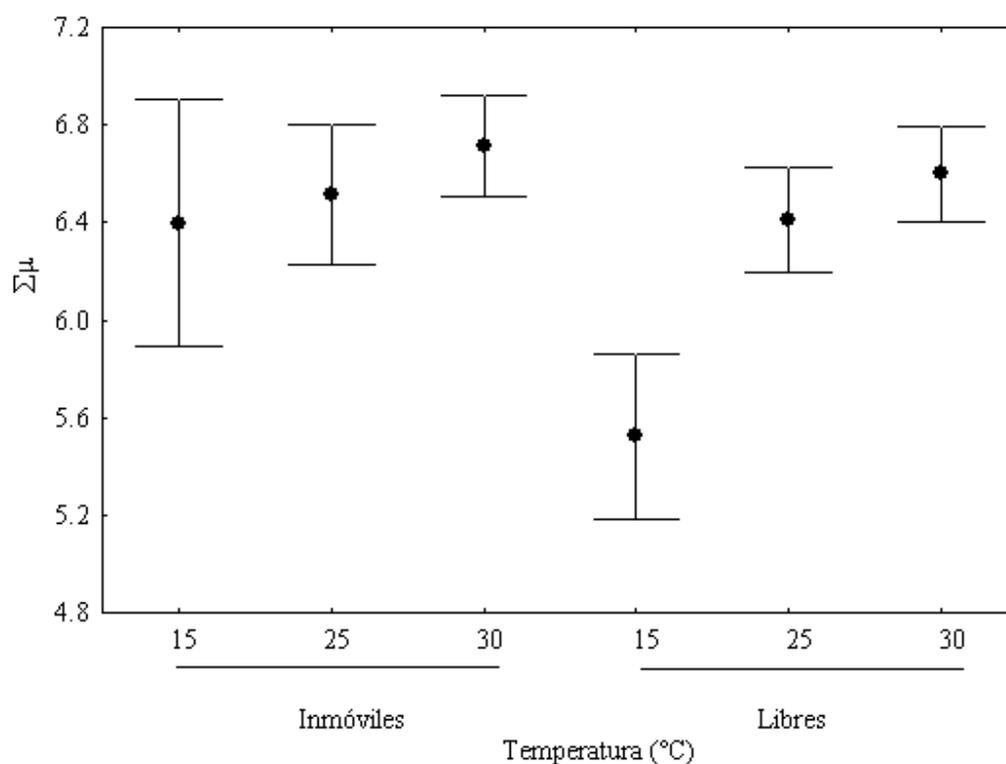


Figura 6. Valores promedio y  $\pm 1$  desviación estándar de la tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) en 10 días de cultivo a distintas temperaturas para cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano.

Tabla V. Valores promedio de la densidad celular ( $\times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) en 10 días de cultivo de *Synechococcus* sp. mantenidas en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano a tres temperaturas. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en una misma columna indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b < c$ ).

Temperatura	Inmóviles			Libres		
	Densidad de células		$\Sigma\mu$	Densidad de células		$\Sigma\mu$
	Inicial	Final		Inicial	Final	
15 °C	0.027 (0.006)a	2.278 (0.262)a	6.398 (0.533)a	0.040 (0.008)a	1.852 (0.125)a	5.523 (0.357)a
25 °C	0.031 (0.001)a	2.883 (0.644)a	6.513 (0.302)a	0.034 (0.004)a	2.899 (0.075)b	6.408 (0.226)b
30 °C	0.032 (0.001)a	3.449 (0.591)b	6.715 (0.216)a	0.035 (0.042)a	3.451 (0.042)c	6.598 (0.207)b

#### IV.2.4. Crecimiento con distintas densidades de inóculo de células inmovilizadas y libres

##### Cultivos de células inmovilizadas

Las curvas de crecimiento de los células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en quitosano y mantenidas con las tres densidades de inóculo (Figura 7), fueron significativamente diferentes ( $F = 27.49$ ;  $p < 0.001$ ) durante los 10 días de cultivo. La curva de crecimiento con el inóculo de alta concentración, mostró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) respecto al inóculo de concentración media y al inóculo de baja concentración.

Entre los inóculos medio y bajo no existió diferencia significativa ( $p = 0.060$ ) en el crecimiento.

Las curvas de crecimiento para *Synechococcus* sp. obtenidas con las tres distintas densidades de inóculo, mantuvieron tendencias de crecimiento similares con una fase de acondicionamiento de 2 días y una fase exponencial de 5 días (Figura 7).

La concentración celular final por efecto de la densidad de inóculo mostró diferencia significativa ( $F = 36.67$ ;  $p < 0.001$ ). La mayor concentración celular se obtuvo con la mayor densidad de inóculo. En la  $\Sigma\mu$  de *Synechococcus* sp. inmovilizada no se encontró diferencia significativa ( $F = 1.24$ ;  $p = 0.354$ ) por efecto de la densidad del inóculo (Figura 9; Tabla VI).

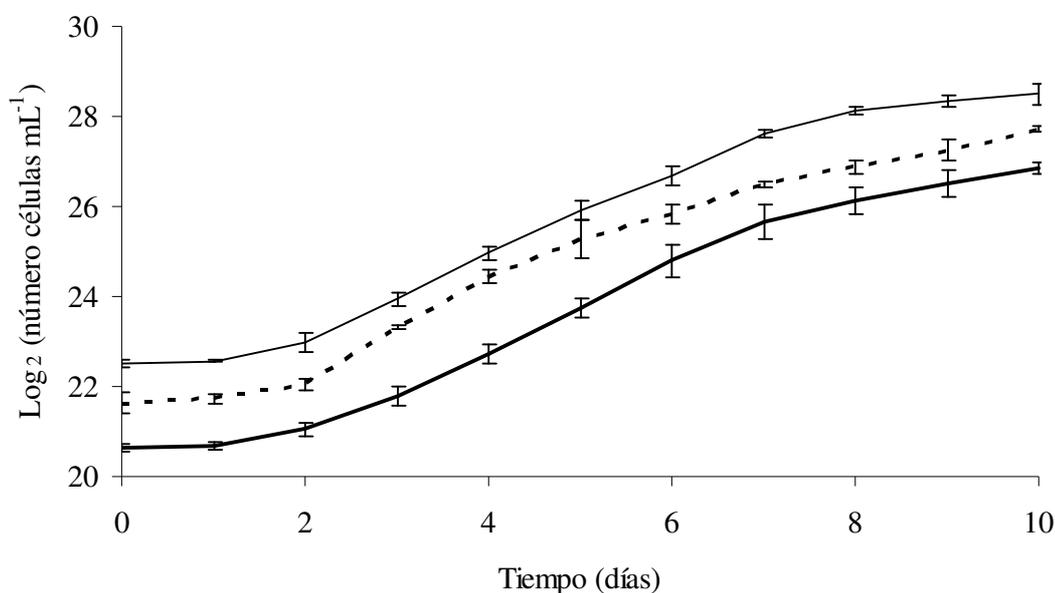


Figura 7. Valores promedio de la concentración celular de *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano y cultivada con distintas densidades de inóculo: baja (—), media (- - -) y alta (— · —). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

### Cultivos de células libres

Las curvas de crecimiento de los cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre (Figura 8) mostraron diferencias significativas por efecto de la cantidad de inóculo ( $F = 45.56$ ;  $p < 0.001$ ). Las curvas de crecimiento obtenidas con alta y media densidad de inóculo no mostraron diferencias significativas ( $p = 0.057$ ), y resultaron diferentes respecto a la menor densidad de inóculo ( $p < 0.001$ ).

Las curvas de crecimiento de *Synechococcus* sp. obtenidas con distintas densidades de inóculo no presentaron fase de acondicionamiento y se obtuvo una fase exponencial de 5 días (Figura 8).

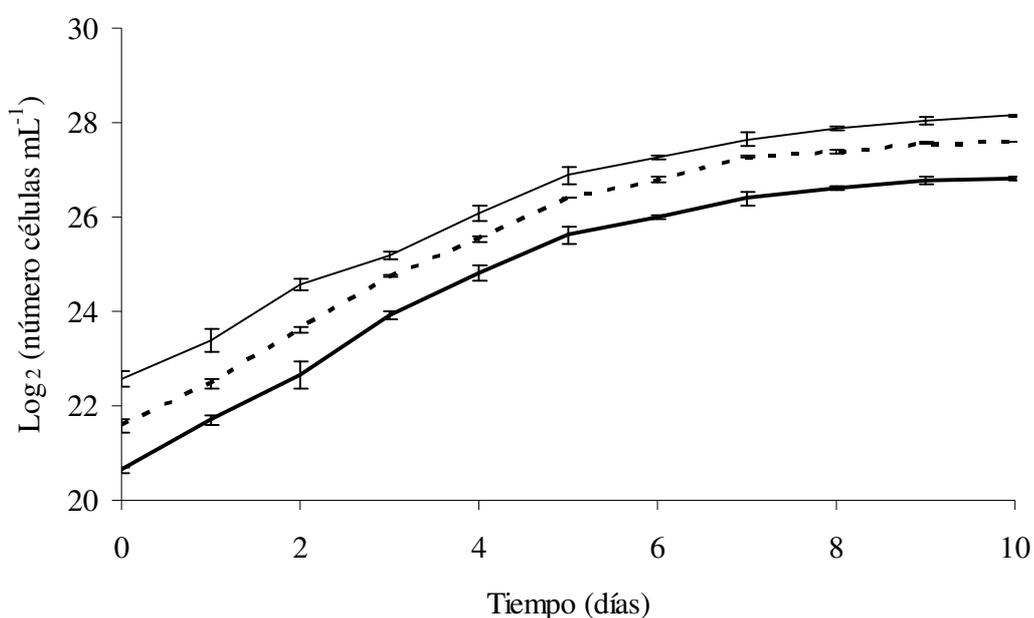


Figura 8. Valores promedio de la concentración celular de *Synechococcus* sp. en forma libre y cultivadas con distintas densidades de inóculo: baja (—), media (- - -) y alta (—). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

La concentración celular final de los cultivos de *Synechococcus* sp. obtenida con las tres densidades de inóculo (Tabla VI), fueron significativamente diferentes ( $F = 37.78$ ;  $p < 0.001$ ). La mayor densidad celular fue la obtenida con la mayor densidad de inóculo.

La  $\sum\mu$  de *Synechococcus* sp. en forma libre mostró diferencias significativas ( $F = 10.05$ ;  $p = 0.012$ ) por efecto de la densidad de inóculo. La mayor  $\sum\mu$  se encontró en los cultivos con baja densidad de inóculo. Se observaron diferencias significativas de las densidades baja y media respecto a la densidad alta ( $p = 0.014$ ) (Figura 9; Tabla VI).

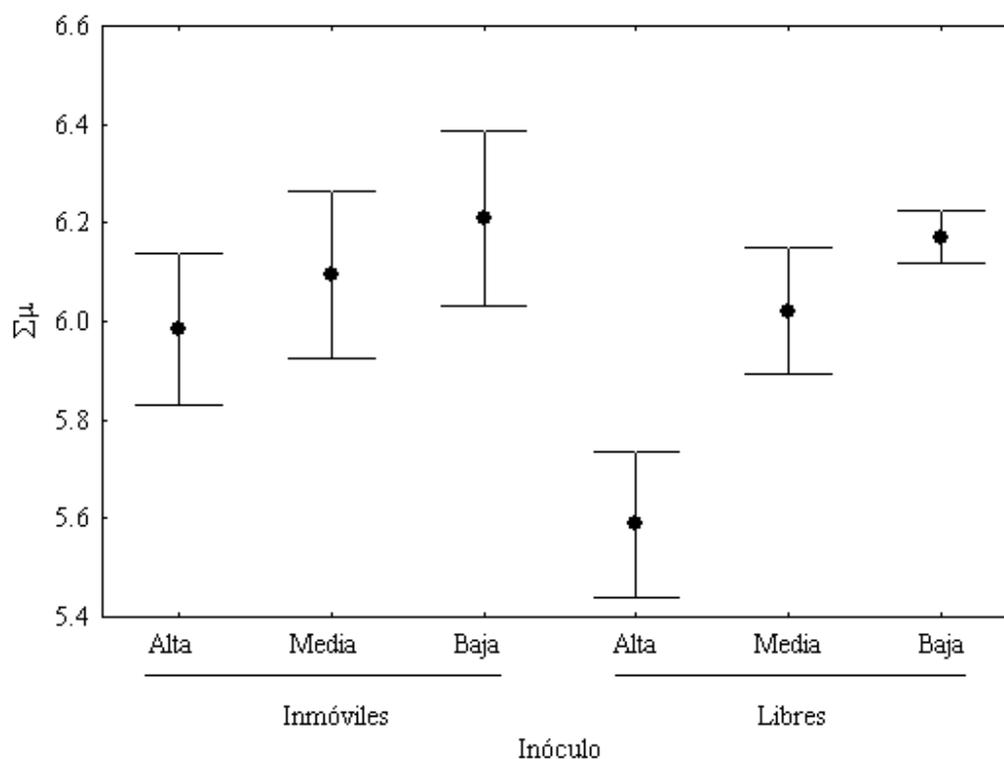


Figura 9. Valores promedio y  $\pm 1$  desviación estándar de la tasa de crecimiento acumulada ( $\sum\mu$ ) en 10 días de cultivo con distintas densidades de inóculo de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmóvilizada en cápsulas de quitosano.

Tabla VI. Valores promedio de la densidad celular inicial y final (en  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) y la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ), en 10 días de cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano y con tres densidades de inóculo. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en una misma columna indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b < c$ ).

Inóculo	Inmóviles			Libres		
	Densidad de células		$\Sigma\mu$	Densidad de células		$\Sigma\mu$
	Inicial	Final		Inicial	Final	
Alta	0.060 (0.003) c	3.804 (0.626) b	5.985 (0.161) a	0.062 (0.001) c	2.984 (0.230) b	5.588 (0.155) a
Media	0.033 (0.005) b	2.218 (0.122) a	6.094 (0.177) a	0.031 (0.003) b	2.031 (0.016) b	6.021 (0.135) b
Baja	0.016 (0.001) a	1.211 (0.106) a	6.210 (0.187) a	0.016 (0.001) a	1.176 (0.034) a	6.171 (0.056) b

#### IV.2.5. Crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. en forma inmovilizada y libre

Los cultivos de células libres no mostraron fase de acondicionamiento mientras que los cultivos de células inmovilizadas mostraron una fase de acondicionamiento de 2 días. No se encontraron diferencias significativas ( $F = 0.15$ ;  $p = 0.697$ ) en las curvas de crecimiento de estos dos tipos de cultivo y se determinó una fase exponencial de 5 días (Figura 10). Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los inóculos de *Synechococcus* sp. utilizados en los cultivos de células libres e inmóviles ( $F = 85.37$ ;  $p < 0.001$ ). La concentración final de células, la  $\mu$  y la  $\Sigma\mu$  fue significativamente mayor para los cultivos de células inmovilizadas respecto a las obtenidas para las células libres (Tabla VII). Las cápsulas de quitosano que contenían células resultaron ser

Tabla VII. Valores promedio de la densidad celular inicial y final ( $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), tasa de crecimiento durante la fase exponencial ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) en 10 días y tiempo de la fase exponencial de cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b$ ).

Parámetros de Crecimiento	Células Inmovilizadas	Células Libres
Densidad de células inicial	0.03 (0.006) a	0.07 (0.001) b
Densidad de células final	3.33 (0.350) b	2.41 (0.037) a
$\mu$ (divisiones $\text{día}^{-1}$ )	0.96 (0.050) b	0.75 (0.037) a
$\Sigma\mu$ (divisiones en 10 días)	6.90 (0.245) b	5.16 (0.132) a
Fase exponencial (días)	2 - 7	1 - 6

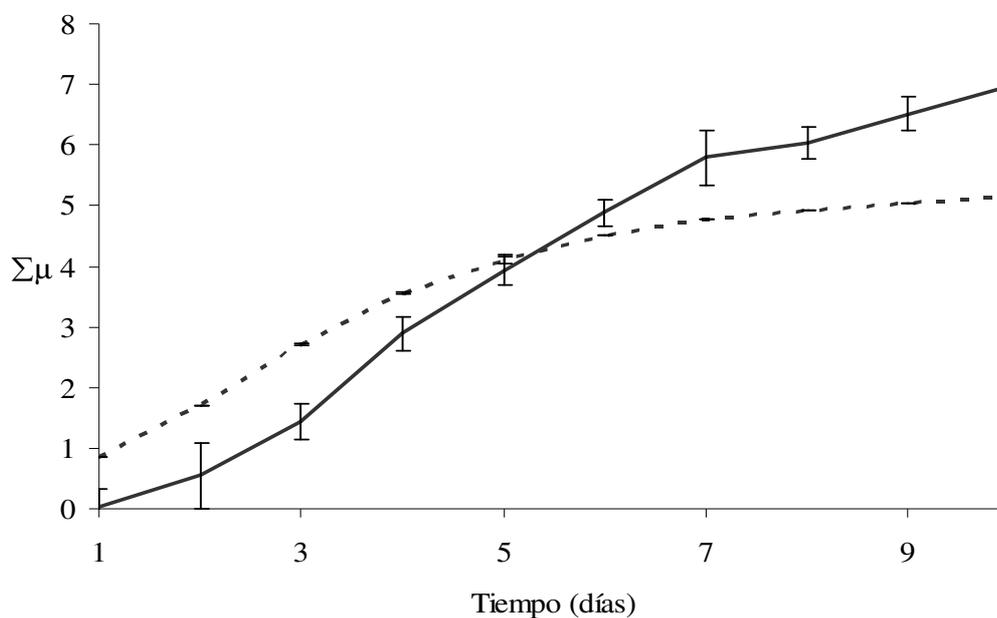


Figura 10. Promedio de la tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) por día, de cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre (---) e inmovilizada (—) en cápsulas de quitosano. Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

significativamente ( $t = 2.768$ ;  $p = 0.006$ ) mayores ( $2.8 \times 3.2$  mm) que las cápsulas sin células ( $2.6 \times 3.0$  mm).

### IV.3. Difusión iónica con cápsulas de quitosano elaboradas a distintas temperaturas

Se encontraron diferencias significativas ( $F = 3.53$ ;  $p < 0.001$ ) en la conductividad final de las cápsulas de quitosano por efecto de las temperaturas de elaboración respecto a las temperaturas de medición (Tabla VIII). La conductividad de las cápsulas elaboradas a 15 °C fue significativamente menor ( $p = 0.003$ ) respecto a los valores obtenidos para las otras temperaturas (Tabla VIII).

Tabla VIII. Valores promedio de conductividad inicial y final, a 15, 25 y 40 °C, con cápsulas elaboradas a 15, 24, 25 y 40 °C. Las cápsulas elaboradas a 24 °C contenían células de *Synechococcus* sp. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b$ ).

Temperatura de medición (° C)	Temperatura de elaboración (° C)	Conductividad en micro siemens ( $\mu$ S)	
		Inicial	Final
15 a	15	3.73 (0.92) a	189.60 (5.71) a
	24	4.66 (1.02) a	283.21 (5.44) b
	25	4.66 (0.52) a	254.11 (3.65) b
	40	3.89 (0.25) a	274.18 (5.50) b
25 a	15	4.26 (1.00) a	236.01 (2.87) a
	24	4.63 (0.66) a	273.11 (5.05) a
	25	7.91 (1.52) b	360.21 (6.84) b
	40	3.99 (0.33) a	259.02 (4.43) a
40 b	15	4.82 (0.63) a	225.21 (0.95) a
	24	3.86 (0.87) a	312.01 (3.74) b
	25	4.99 (1.01) a	307.22 (3.10) b
	40	5.19 (0.95) a	324.03 (2.44) b

Se encontraron diferencias significativas ( $F = 6.91$ ;  $p < 0.001$ ) en los valores promedio de conductividad entre las temperaturas de elaboración de las cápsulas. Las cápsulas elaboradas a 15 °C tuvieron una conductividad significativamente menor ( $p < 0.005$ ) con respecto a la obtenida con las cápsulas elaboradas a otras temperaturas (Figura 11a).

Se encontraron diferencias significativas ( $F = 4.59$ ;  $p = 0.011$ ) en los valores promedio de la temperatura de medición. La conductividad fue significativamente menor a 15 °C respecto a la obtenida en las otras temperaturas de medición (Figura 11b).

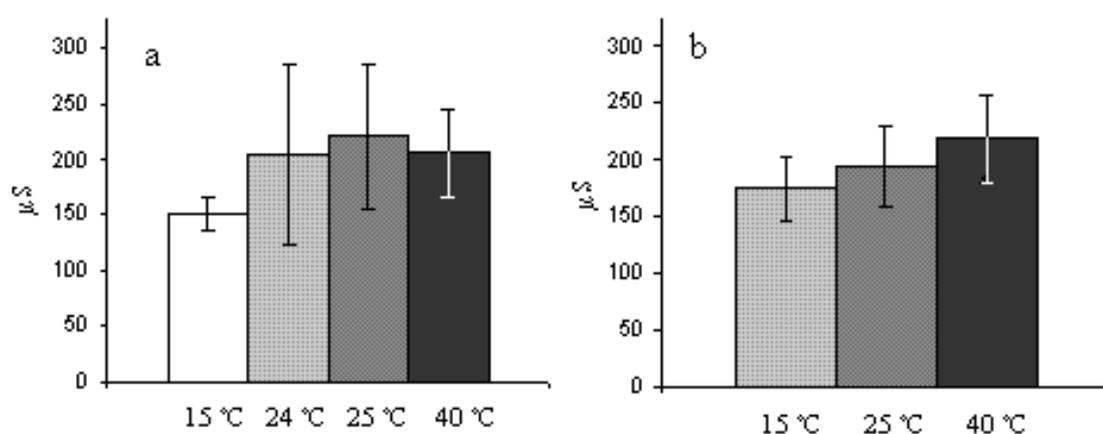


Figura 11. Valores promedio de conductividad en micro siemens ( $\mu\text{S}$ ) evaluados para distintas temperaturas de elaboración de cápsulas de quitosano (a) y distintas temperaturas de medición (b). Las cápsulas elaboradas a 24 °C contenían células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas. Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

#### IV.4. Remoción de nitrógeno y fósforo con cultivos de *Synechococcus* sp. en forma inmovilizada y libres

##### IV.4.1. Crecimiento con distintos aportes de nitrógeno

Las curvas de crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. en forma libre y diferentes aportes de nitrógeno fueron significativamente diferentes ( $F = 35.64$ ;  $p < 0.001$ ) (Figura 12). Los cultivos mantenidos con urea y fertilizante agrícola mostraron significativamente ( $p < 0.001$ ) un mayor crecimiento respecto de los cultivos con nitrato de amonio y nitrato de sodio.

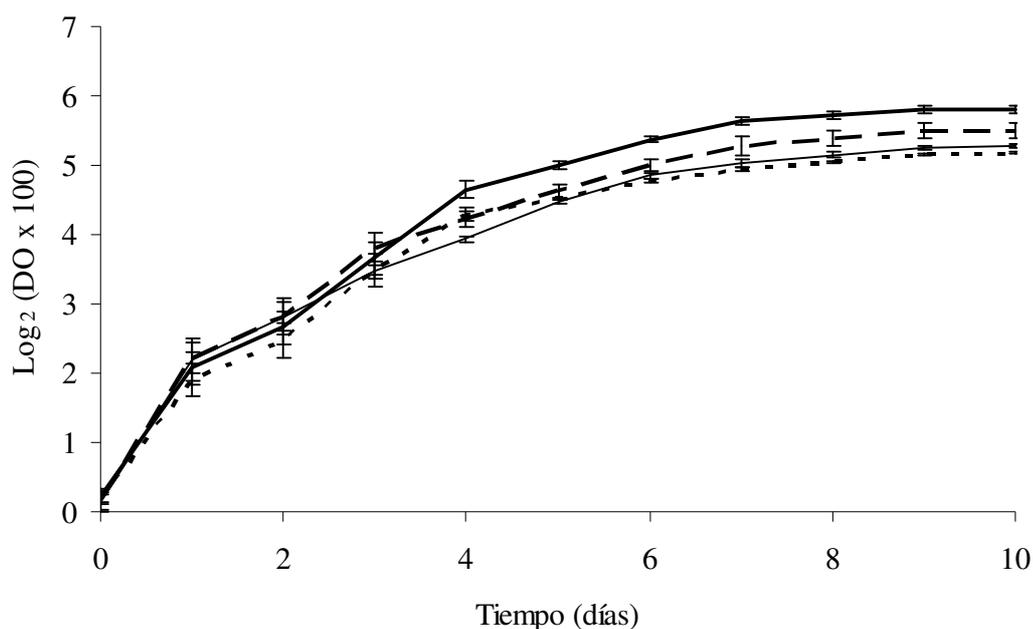


Figura 12. Valores promedio la densidad óptica de cultivos de células libres de *Synechococcus* sp., con diferentes aportes de nitrógeno: fertilizante agrícola (---), nitrato de amonio (—), nitrato de sodio (-----) y urea (—). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

La densidad óptica inicial (Tabla IX) fue similar en todos los cultivos ( $p > 0.05$ ), y no se observó una fase de acondicionamiento (Figura 12). Los cultivos mantenidos con urea ( $p < 0.001$ ) y fertilizante agrícola ( $p < 0.010$ ) mostraron significativamente una mayor densidad óptica final. Los parámetros indicadores del crecimiento ( $\mu$  y  $\Sigma\mu$ ), no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes aportes de nitrógeno (Tabla IX).

Tabla IX. Valores promedio de la densidad óptica inicial y final, tasa de crecimiento durante la fase exponencial ( $\mu$ ), tasa de crecimiento acumulada ( $\Sigma\mu$ ) en 10 días de cultivo para *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre y con diferentes aportes de nitrógeno. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b$ ).

Parámetro de crecimiento	Nitrato de amonio	Urea	Fertilizante agrícola	Nitrato de sodio
DO inicial	0.011 (0.002) a	0.012 (0.001) a	0.011 (0.001) a	0.011 (0.002) a
DO final	0.389 (0.007) a	0.563 (0.022) b	0.456 (0.036) b	0.362 (0.003) a
$\mu$	1.128 (0.071) a	1.121 (0.072) a	1.213 (0.095) a	1.120 (0.149) a
$\Sigma\mu$	5.197 (0.226) a	5.513 (0.075) a	5.330 (0.146) a	5.052 (0.251) a

#### IV.4.2. Remoción de nitrógeno y fósforo

Existieron diferencias significativas en la concentración de las distintas formas químicas de nitrógeno y de fósforo entre los cuatro tratamientos ( $F = 21.81$ ;  $p < 0.001$ ) (Figuras 13 a 17).

No se encontraron diferencias significativas en la remoción del contenido total de nitrógeno ( $\text{N-NH}_3 + \text{N-NO}_3^-$ ; Figura 13), a través del tiempo con *Synechococcus* sp. cultivada en medio 2E en forma libre e inmovilizadas ( $p = 0.434$ ). En los tratamientos utilizados como control, no existieron diferencias significativas de remoción ( $p = 0.910$ ). Los tratamientos que contenían células tuvieron significativamente mayor remoción respecto a los tratamientos utilizados como control ( $p < 0.001$ ).

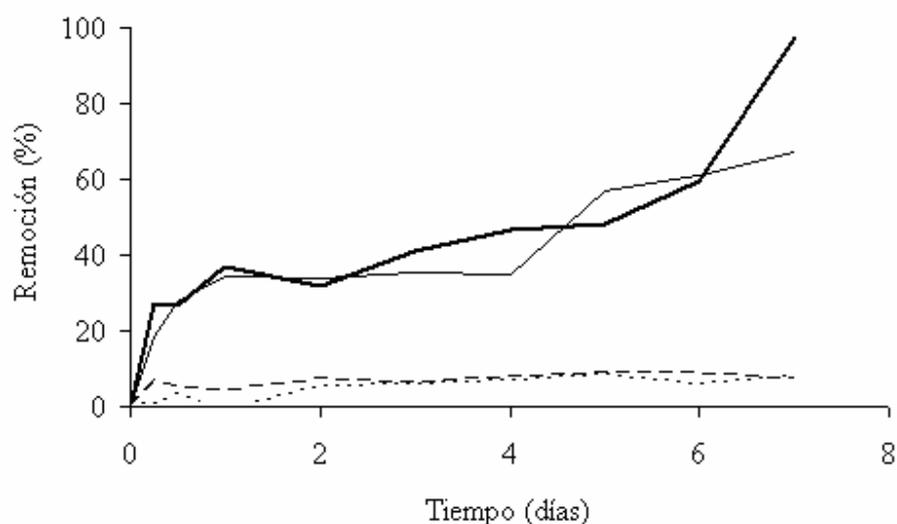


Figura 13. Valores promedio de la suma del porcentaje (%) de remoción de  $\text{N-NH}_3$  y  $\text{N-NO}_3^-$  para cultivos de *Synechococcus* sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (—). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- · -).

La concentración inicial de  $\text{N-NH}_3$  fue de  $25.5 \text{ mg L}^{-1}$  en todos los tratamientos (Figura 14a). En el tratamiento con células libres (c) se registró una disminución de la concentración de  $\text{N-NH}_3$  y fue significativamente mayor ( $p = 0.018$ ) con respecto al tratamiento con células inmovilizadas (d). En el tratamiento c la mayor disminución de la concentración de  $\text{N-NH}_3$  se evaluó el día 7 de cultivo (Figura 14a).

El porcentaje de remoción de  $\text{N-NH}_3$  con células libres fue mayor (25%) que el obtenido con células inmovilizadas (Figura 14b). No se evaluó diferencia significativa ( $p > 0.670$ ) en la concentración de  $\text{N-NH}_3$  en los tratamientos utilizados como control de los ensayos: medio 2E sin microalgas (a) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (b).

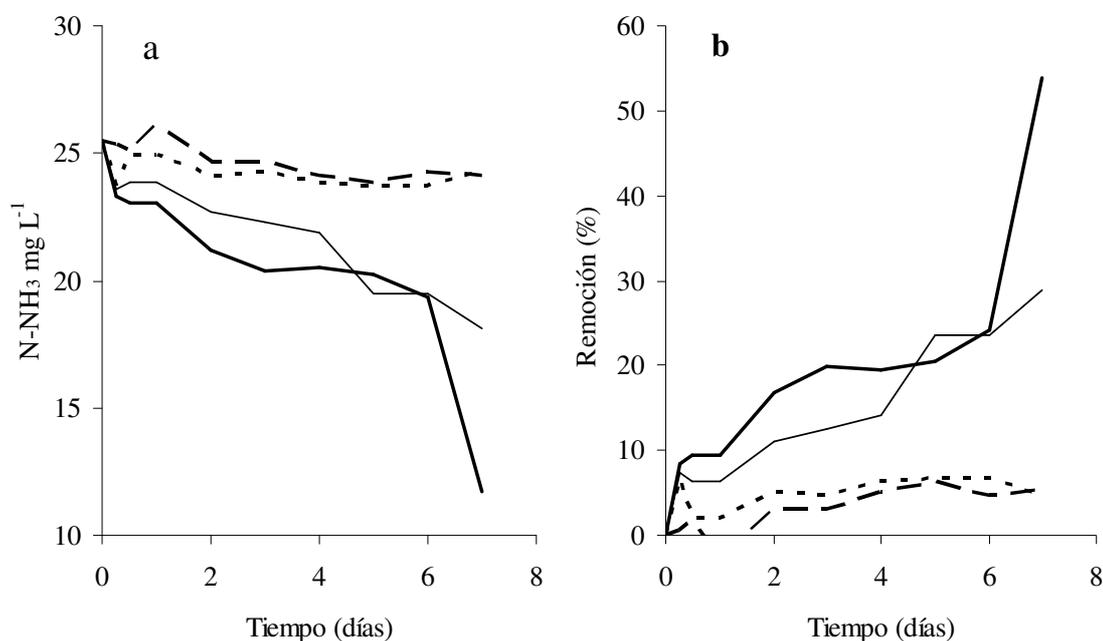


Figura 14. Valores promedio de la concentración de  $\text{N-NH}_3$  en  $\text{mg L}^{-1}$  (a) y el porcentaje de remoción (b) de cultivos de *Synechococcus* sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (---). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -).

La concentración inicial de  $\text{N-NO}_3^-$  fue de  $23.0 \text{ mg L}^{-1}$  en todos los tratamientos (Figura 15a). Entre los tratamientos con células libres (**c**) y tratamiento con células inmovilizadas (**d**), no se registraron diferencias significativas ( $p = 0.999$ ) en la disminución de la concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  (Figura 15a). El porcentaje de remoción de  $\text{N-NO}_3^-$  con células libres e inmovilizadas fue similar, en ambos tratamientos se evaluó una remoción de aproximadamente el 30% en el primer día de cultivo. En el día 2 se observó un incremento de la concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  y por lo tanto un decremento del porcentaje de remoción del 12% en el tratamiento con células libres y del 5% de remoción en el tratamiento con células inmovilizadas (Figura 15b). No existió remoción de  $\text{N-NO}_3^-$  en los tratamientos utilizados como control en los tratamientos **a** y **b** ( $p = 0.999$ ).

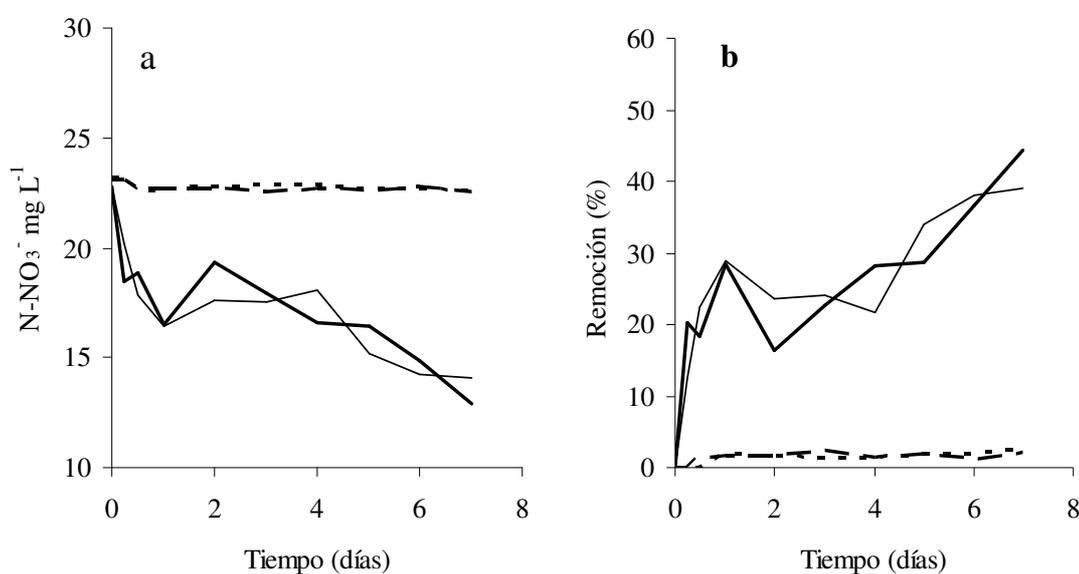


Figura 15. Valores promedio de la concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  en  $\text{mg L}^{-1}$  (a) y el porcentaje de remoción (b) de cultivos de *Synechococcus* sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (---). Medio 2E sin células (· · ·) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- · - ·).

La concentración inicial de  $\text{N-NO}_2^-$  fue de  $0.003 \text{ mg L}^{-1}$  en todos los tratamientos (Figura 16a). La concentración final en los tratamientos **a** y **b** fue de  $0.006 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que en los tratamientos **c** y **d** de  $0.040 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 16a). Para todos los tratamientos se evaluó una producción de  $\text{N-NO}_2^-$ . En los tratamientos que contenían células de *Synechococcus* sp. la producción de  $\text{N-NO}_2^-$  fue similar ( $p = 0.811$ ) y de aproximadamente de 1200% . Los tratamientos **a** y **b** mostraron una producción similar de  $\text{N-NO}_2^-$  cercana al 70% ( $p = 0.986$ ; Figura 16b). Los tratamientos **a** y **b** fueron significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ) a los tratamientos **c** y **d**.

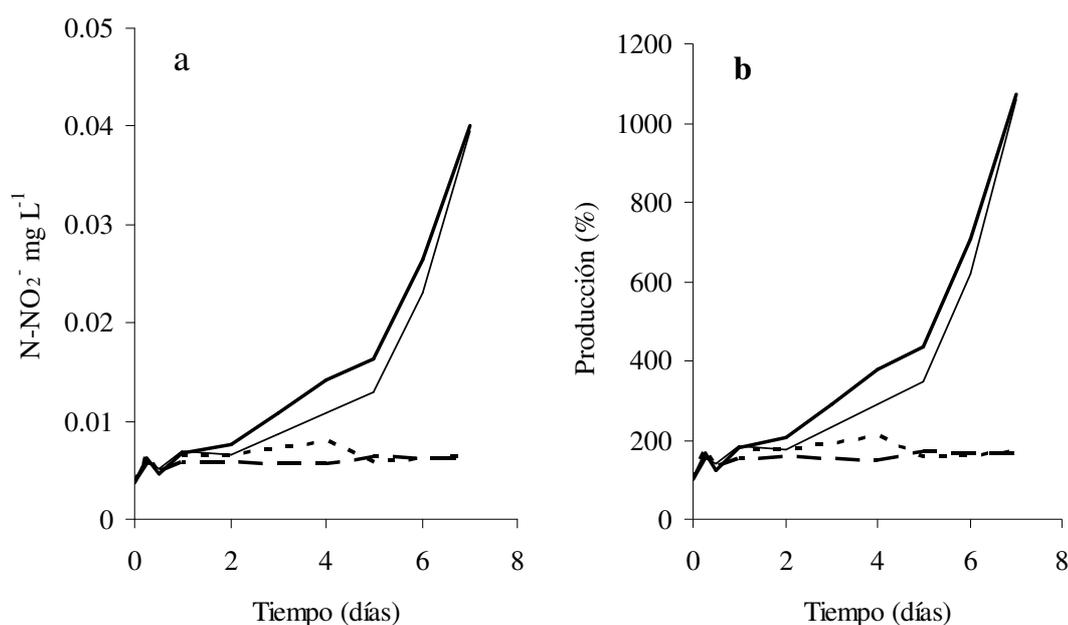


Figura 16. Valores promedio de la concentración de  $\text{N-NO}_2^-$  en  $\text{mg L}^{-1}$  (a) y el porcentaje de producción (b) de cultivos de *Synechococcus* sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (---). Medio 2E sin células (· · ·) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (— · —).

La concentración inicial de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue de  $6.7 \text{ mg L}^{-1}$  en todos los tratamientos (Figura 17a). Se observó un decremento de la concentración al 0.25 día en todos los tratamientos, llegando a la concentración inicial al 0.5 día. Todos los tratamientos mostraron decremento de la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$ , pero el decremento en los tratamientos **a** y **b** fue de  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  y no se encontraron diferencias entre ellos ( $p = 0.808$ ). En el tratamiento con células libres el decremento de la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue significativamente mayor ( $p = 0.006$ ) con respecto del tratamiento con células inmovilizadas (Figura 17a). La remoción total de  $\text{PO}_4^{3-}$  con el tratamiento **a** fue de 23% y del tratamiento **b** fue de 32% (Figura 17b). El tratamiento con células libres mostró una remoción mayor del 50% al día 2 de cultivo, mientras que el tratamiento con células inmovilizadas removió una concentración similar hasta el día 5 de cultivo. Al final del cultivo el tratamiento con células libres mostró el mayor porcentaje de remoción de  $\text{PO}_4^{3-}$  con respecto al tratamiento con células inmovilizadas (Figura 17b).

En los tratamientos que contenían células de *Synechococcus* sp. los valores de pH no fueron significativamente diferentes ( $p = 0.074$ ). Los tratamientos utilizados como control (**a** y **b**) tampoco mostraron valores significativamente diferentes de pH ( $p = 0.554$ ). Sin embargo, los tratamientos **a** y **b** fueron significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ) a los tratamientos **c** y **d** (Figura 18).

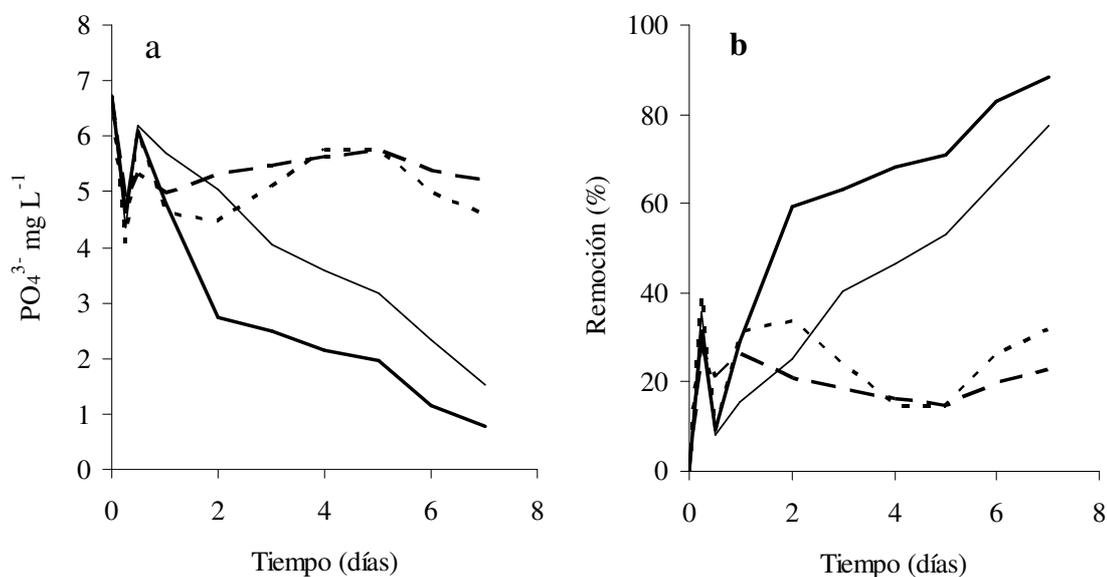


Figura 17. Valores promedio de la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  en  $\text{mg L}^{-1}$  (a) y el porcentaje de remoción (b) de cultivos de *Synechococcus* sp. en medio 2E mantenidos en forma libre (—) e inmovilizada (—). Medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -).

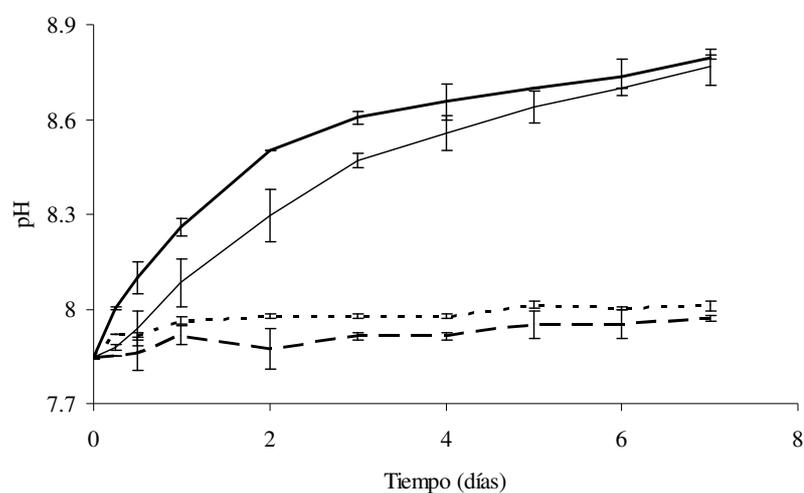


Figura 18. Valores promedio de la variación del pH en los cuatro tratamientos para células de *Synechococcus* sp. mantenidas en forma libre (—), inmovilizada (—) medio 2E sin células (- - -) y medio 2E con cápsulas de quitosano sin células (- - -). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

La concentración de clorofila *a* fue significativamente mayor en los cultivos con células inmovilizadas ( $F = 80.11$ ;  $p < 0.001$ ) con respecto a los de células libres. En los cultivos con células inmovilizadas el mayor incremento de clorofila *a* se observó después del día 3 de cultivo manteniendo ese incremento hasta el final del experimento (Figura 19).

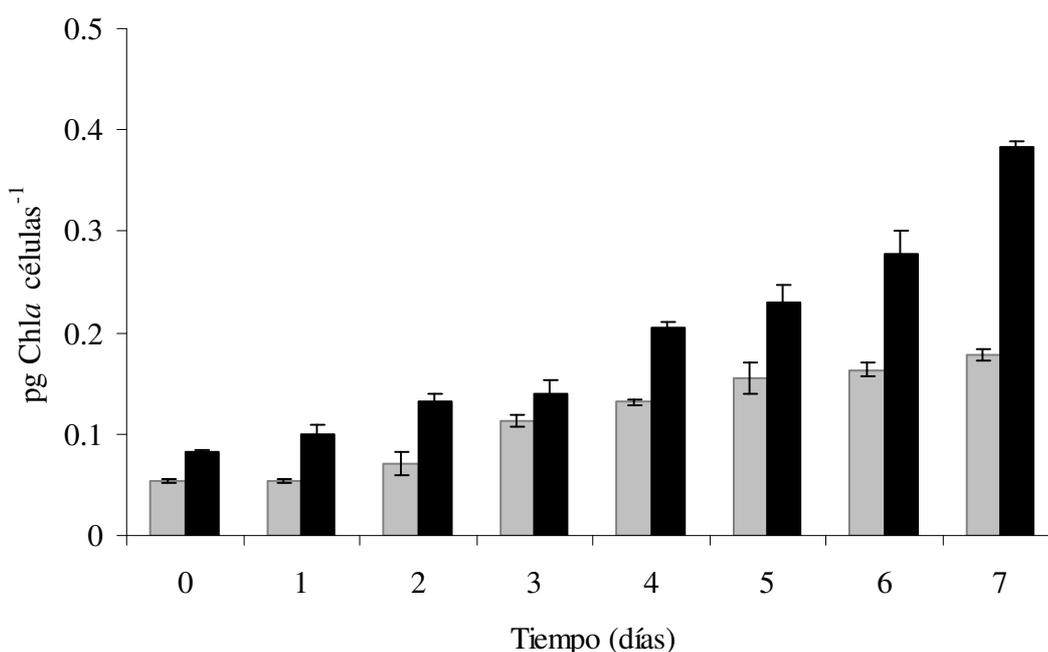


Figura 19. Valores promedio de la concentración de clorofila *a* (Chl *a*) para cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre (■) e inmovilizadas en cápsulas de quitosano (■). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

El porcentaje de proteínas fue significativamente diferente entre los cultivos con células inmovilizadas ( $F = 0.37$ ;  $p = 0.551$ ), con respecto a los de células libres. En los cultivos con células libres el mayor incremento de proteínas se observó dos días antes que para los cultivos con células inmovilizadas (Figura 20).

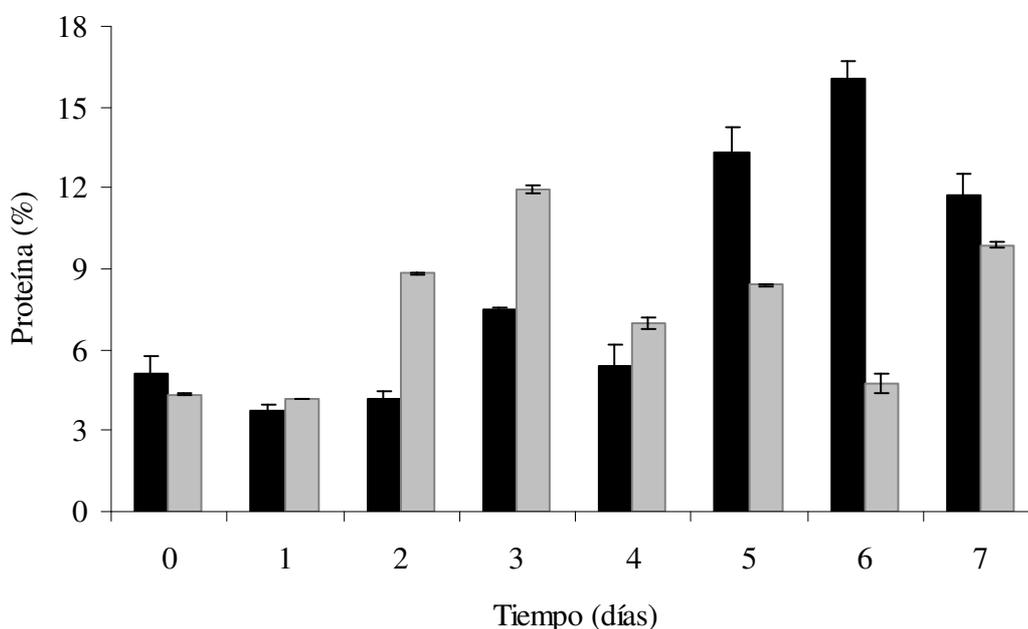


Figura 20. Valores promedio del porcentaje de proteína para cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre (■) e inmobilizadas en cápsulas de quitosano (■). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

## VI.5. Efecto del proceso de inmovilización en la respuesta fisiológica de *Synechococcus* sp.

### VI.5.1. Curvas fotosintéticas (P-I)

La respuesta fotosintética de los cultivos de células inmobilizadas y células libres fue significativamente distinta ( $F = 4.12$ ;  $p = 0.004$ ). La respuesta fotosintética fue significativamente menor en los días 6 ( $p = 0.035$ ) y 9 ( $p = 0.014$ ) de los cultivos de células inmobilizadas. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta fotosintética al

tercer día de cultivo de células inmovilizadas con respecto a la respuesta obtenida con los cultivos de células libres ( $p = 0.997$ ; Figura 21 y 22).

Los parámetros fotosintéticos fueron significativamente diferentes entre los cultivos de células inmovilizadas y células libres ( $F = 9.95$ ;  $p = 0.001$ ; Tabla XI). La eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) de los cultivos de células libres fue significativamente mayor ( $p > 0.001$ ),

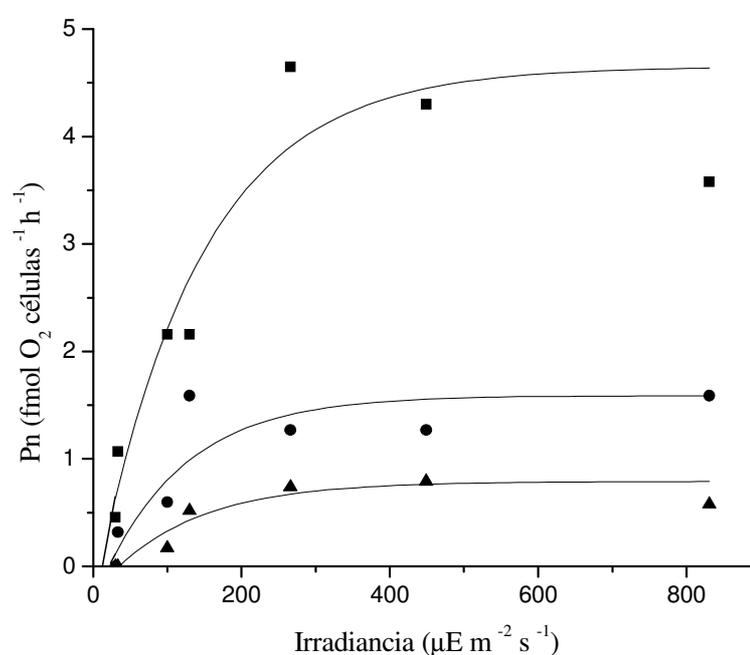


Figura 21. Curvas de fotosíntesis vs irradiancia (P-I) para cultivos de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en cápsulas de quitosano. Valores evaluados a distintas fechas de cultivo: día 3 (■), día 6 (●) y día 9 (▲).

respecto a la obtenida en los cultivos con células inmovilizadas. La fotosíntesis máxima (P máx) fue significativamente mayor ( $p = 0.023$ ) en los cultivos de células libres con

respecto de las inmóviles. El índice de saturación lumínica ( $I_k$ ) no mostró diferencias significativas entre los cultivos de células libres con respecto a la de los cultivos con células inmovilizadas ( $p = 0.403$ ) (Tabla X). En los cultivos de células inmovilizadas se encontró que la  $\alpha$  y la  $P_{máx}$  disminuyó conforme aumentó la edad del cultivo (Tabla X).

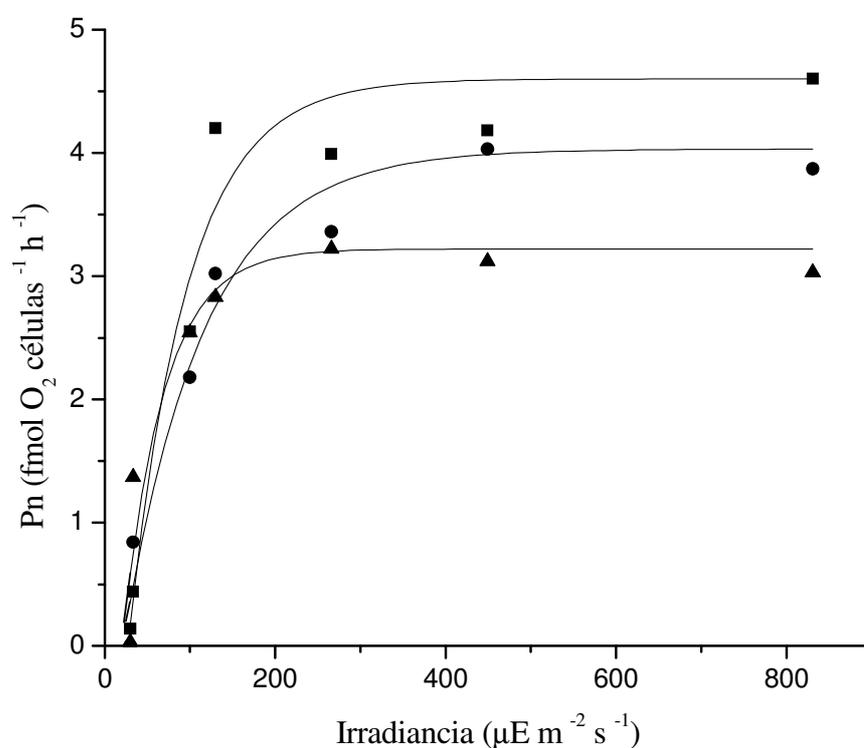


Figura 22. Curvas de fotosíntesis vs irradiancia (P-I) para cultivos de células de *Synechococcus* sp. mantenidas en forma libre. Valores evaluados a distintas fechas de cultivo: día 3 (■), día 6 (●) y día 9 (▲).

Tabla X. Valores promedio de la eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ), fotosíntesis máxima por célula (P máx), índice de saturación lumínica (Ik) y coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de las curvas P-I para cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre e inmovilizada en cápsulas de quitosano durante distintas fechas de medición. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar; las letras iguales en un mismo renglón indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ;  $a < b < c$ ).

Células inmovilizadas				
Día de cultivo	$\alpha$ ( $\text{fmol O}_2 \times 10^{-7} \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) <sup>-1</sup> )	P máx ( $\text{fmol O}_2 \times 10^{-7} \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	Ik ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$r^2$
3	0.021 (0.003) c	4.760 (1.246) c	230 (89.00) a	0.900
6	0.013 (0.000) b	1.294 (0.012) b	103 (0.866) a	0.831
9	0.003 (0.001) a	0.713 (0.231) a	216 (32.00) a	0.912
Células libres				
Día de cultivo	$\alpha$ ( $\text{fmol O}_2 \times 10^{-7} \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) <sup>-1</sup> )	P máx ( $\text{fmol O}_2 \times 10^{-7} \text{ células}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	Ik ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$r^2$
3	0.020 (0.121) c	3.623 (0.084) c	199 (60.01) a	0.910
6	0.030 (0.000) c	3.610 (0.210) c	137 (12.10) a	0.950
9	0.023 (0.003) c	3.210 (0.431) c	138 (34.27) a	0.820

#### IV.5.2. Actividad de la nitrato reductasa (NR)

La actividad de la NR determinada a distintas fechas de cultivos de células libres y células inmovilizadas mostró diferencias significativas ( $F = 18.06$ ;  $p < 0.001$ ). La actividad de la NR fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) al inicio del cultivo de células libres. La tendencia general fue de obtener la mayor actividad de la NR al inicio de los cultivos y a disminuir conforme avanzó la edad del cultivo (Figura 23).

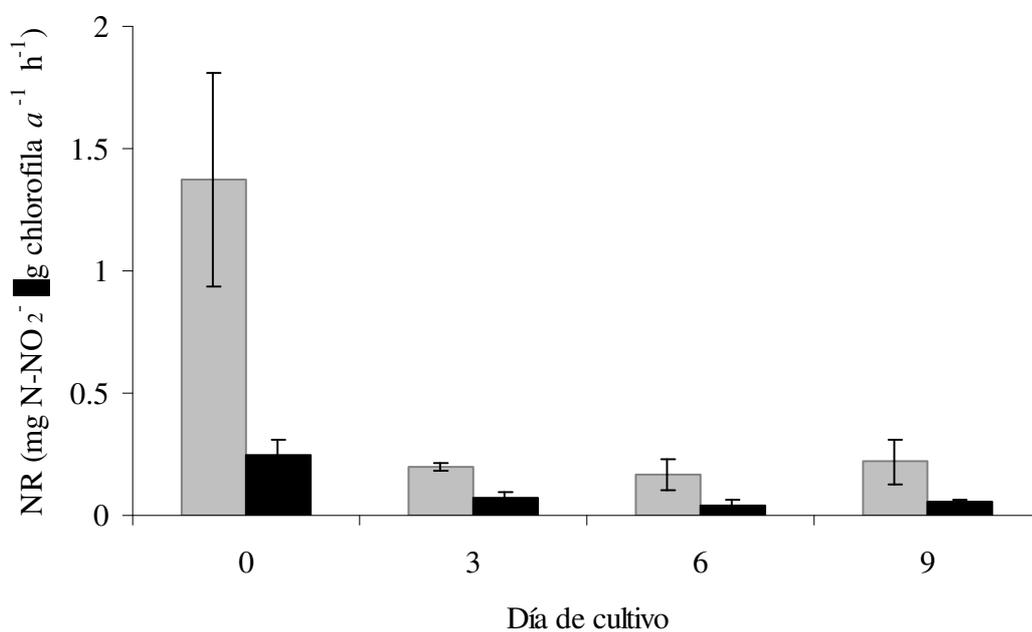


Figura 23. Actividad de la nitrato reductasa (NR) durante distintas fechas de medición en cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos en forma libre (■) e inmovilizados en cápsulas de quitosano (■). Las barras indican  $\pm 1$  desviación estándar.

## V. Discusión

El atrapamiento de células en matrices poliméricas ha sido una técnica ampliamente utilizada para la inmovilización de células vivas (Yean-Chang, 2001). Se han propuesto diferentes tipos de polímeros para la inmovilización de microalgas y cianobacterias (Klinkenberg *et al.*, 2001). No todos los tipos de polímeros son adecuados para la inmovilización de células vivas de microalgas y cianobacterias. El alginato y carragenano son polímeros naturales ampliamente usados para la inmovilización de células (Cohen, 2001). Sin embargo, el alginato tiene baja estabilidad en presencia de agentes quelantes tales como calcio, EDTA, fosfatos y citratos (Kierstan y Coughlan, 1985; Smidsrød y Skjak-Baek, 1990). Mientras que el carragenano es un producto con alto coste económico y para el proceso de inmovilización se requieren temperaturas de entre 30 y 50 °C que resultan letales o dañinas para la mayoría de las especies de microalgas y cianobacterias (Varlop y Klein, 1987).

Las cianobacterias y las microalgas tienen altos requerimientos fisiológicos de fósforo y pueden acumularlo en el citoplasma, por lo anterior pueden ser utilizadas para la biorremediación de efluentes con alto contenido de fosfatos en aguas de desecho urbanas, industriales, agrícolas y de cultivos acuícolas.

Para estos tipos de efluentes el quitosano puede ser utilizado como un polímero alternativo para la inmovilización de cianobacterias y microalgas (Kaya y Picard, 1996).

El quitosano se obtiene con un proceso de modificación química de la quitina, en el cual los residuos de N-acetilglucosamina son eliminadas por la acción de soluciones alcalinas muy concentradas, y a temperaturas que superan los 60 °C (Bough *et al.*, 1978).

Existen diversos métodos alternativos para llevar a cabo la reacción de desacetilación en forma mas eficiente, que incluyen desde el uso de microondas, lavados intermitentes con agua, empleo de solventes orgánicos hasta la desacetilación enzimática. La quitina generalmente se obtiene de exoesqueletos de crustáceos entre ellos el camarón. La quitina también se puede obtener de insectos, moluscos y hongos (Yan-Tan y Lee, 2002). Por lo tanto en dependencia del origen de la materia prima, la metodología de desacetilación y el tiempo de reacción le confieren al quitosano distintas características fisicoquímicas. El quitosano utilizado en el presente trabajo se obtuvo a partir de desecho de cefalotórax de camarón generado durante la captura de este recurso en Sonora.

El quitosano obtenido de subproductos de desecho y utilizado como matriz polimérica para la inmovilización de células para ser utilizados en biofiltración, constituye un ejemplo de un material para el desarrollo de aplicaciones de alto valor que a su vez puedan conllevar a la generación de inversiones de una industria para distintas aplicaciones.

### **V.1. Elaboración de cápsulas de quitosano**

La solubilidad del quitosano en medio ácido diluido cambia según el peso molecular y el grado de desacetilación (Brugnerotto *et al.*, 2001; Yan-Tan y Lee, 2002; Lárez-Velásquez, 2003), ya que el quitosano al igual que la quitina, forma estructuras cristalinas que no se logran destruir durante el proceso de solubilización, al incrementarse estas variables existe una mayor fricción entre las moléculas de quitosano.

El pH del ácido acético se ajustó a valores de 4, debido a que en experimentos preliminares se encontró que el pH de la solución de quitosano debería ser  $\approx 4$  para lograr una rápida formación de las cápsulas y evitar que el quitosano se disgregara en la solución alcalina. Lo anterior está relacionado con la velocidad del cambio de pH en la periferia de la gota de quitosano que permite la rápida formación de la cápsula. Con valores de pH  $< 5.0$ , el quitosano tiene una alta solubilidad debido a que el grupo amino se encuentra altamente protonado y esta solubilidad disminuye a valores de pH  $> 7$  (Cheng y Li, 2000).

El creciente interés en el campo de la inmovilización de células ha conducido al desarrollo de una gran cantidad de técnicas para inmovilización: goteo, emulsificación o coacervación, atomización con un disco que rota, atomización y goteo electrostático, entre otros (Ogbanna *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1996; Romo y Pérez-Martínez, 1997), cada uno de éstos métodos tiene ventajas y limitaciones. En este trabajo se utilizó el método de goteo usando una bureta y presión de aire para producir un flujo continuo del quitosano.

El método utilizado en este trabajo no es eficiente cuando la solución en la que se precipita el quitosano es altamente volátil, como lo fue la solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Al utilizar la solución de quitosano al 2% se formaron cápsulas en las soluciones de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y de  $\text{NaOH}$  con valores de pH  $\approx 12$ . Sin embargo, debido a la alta volatilidad del  $\text{NH}_4\text{OH}$ , se obstruyó la abertura para el goteo de quitosano y no fue posible la continua formación de cápsulas, mientras que al precipitar el quitosano en la solución de  $\text{NaOH}$  se formaron cápsulas de forma continua. Al utilizar la concentración de quitosano de 1.5%, no se logró formar cápsulas en ninguna de las soluciones alcalinas utilizadas. Lo anterior, es debido a la baja concentración de las cadenas del polímero ya que no permitieron la formación de un

precipitado en la capa superior de la cápsula. La concentración de quitosano del 2% contuvo un mayor número de cadenas del polímero en redes que permitieron la rápida formación de la cápsula.

## **V.2. Viabilidad y crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. inmovilizada en cápsulas de quitosano comparado con el crecimiento de células libres**

### **V.2.1. Viabilidad de *Synechococcus* sp.**

Una célula inmovilizada es definida como una célula que por medio natural o artificial es privada de moverse independientemente y confinada con un grupo de células dentro de un sistema de estudio (Tampion y Tampion, 1987). Cuando se describe un sistema de tratamiento de aguas residuales con microalgas se consideran dos componentes: las microalgas y el agua de desecho que incluyen las interacciones entre estos dos componentes. Al incorporar la tecnología de inmovilización se introduce en el sistema un tercer componente, relacionado con la matriz polimérica. Por lo anterior, se requiere considerar las interacciones entre la matriz-polímero y la cepa de microalga. Estas interacciones están relacionadas con los cambios en las células durante el proceso de inmovilización, incluyendo cambios morfológicos, características de crecimiento y de actividades metabólicas. Las principales cualidades que debe cumplir una matriz para la inmovilización de microalgas son: no tóxica, fototransparente, estable en el medio de cultivo, eficiente en la retención de la biomasa y resistente al crecimiento de la biomasa, entre otras (Mallick, 2002).

En algunos casos el método de inmovilización y la matriz polimérica no son compatibles con la preservación de células viables. Tal es el caso de algunos métodos de inmovilización basados en la elaboración de matrices entrecruzadas por enlaces covalentes, donde se involucran radicales o solventes orgánicos los cuales pueden ser tóxicos para las células. En el método de inmovilización que se utilizó en este trabajo las limitantes durante el proceso, se deben a tres cambios bruscos de pH: el primero es cuando la células que se encuentran en un medio de cultivo con un pH entre 8 y 9.5 son transferidas a la solución de quitosano con un pH = 4, el segundo es cuando la mezcla de células-quitosano es goteada en la solución alcalina con pH = 12, con la finalidad de obtener cápsulas de quitosano con células inmovilizadas y por último cuando las cápsulas precipitadas son transferidas al medio de cultivo con un pH  $\approx$  8. El punto más crítico durante el proceso de inmovilización descrito en este trabajo, es el tiempo de contacto de las cápsulas con la solución de NaOH, ya que de éste depende que el cultivo adquiera o no un gradiente de color entre las cápsulas. El crecimiento heterogéneo en las cápsulas, es el resultado de que las cápsulas que se forman al inicio del proceso de inmovilización tienen un mayor tiempo de contacto con el NaOH y, por lo tanto, una mayor penetración de la solución provocando mayor mortalidad de células, lo que resulta en cápsulas totalmente blanqueadas. Por su parte, las cápsulas que se forman al final del proceso de inmovilización, al tener menor tiempo de contacto con el NaOH son verde brillante y contienen mayor proporción de células viables.

Es posible que el blanqueamiento en las cápsulas sea un efecto combinado entre la penetración del NaOH causando daño celular y un cambio físicoquímico de la matriz. Lo anterior se fundamenta en que independientemente del espesor de la pared de la cápsula,

las células de *Synechococcus* sp., las cuales que fueron observadas a través del tiempo de cultivo, no logran colonizar las zonas con blanqueamiento.

Después del proceso de inmovilización es importante conocer cuál es el porcentaje de viabilidad celular, ya que la viabilidad del cultivo se reduce en dependencia de varios factores tales como: el método de inmovilización, el material de soporte (polímero), la concentración del polímero y el diámetro de la cápsula, entre otros (Kaya y Picard, 1995).

Fierro-Reséndiz (2004) inmovilizó cepas de microalgas de agua dulce (*Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp.) en condiciones similares a las usadas en el presente trabajo, tales como: mismo quitosano que se utilizó como matriz, tamaño similar de la esfera (3 mm) y el mismo porcentaje del polímero (2% de quitosano) y obtuvo una viabilidad del 60%. En el presente trabajo se obtuvo una viabilidad del 48%, lo cual se atribuye al mayor tiempo de contacto de las células con el NaOH. En los trabajos relacionados con la inmovilización de células vivas se menciona que no todas las cepas de microalgas y cianobacterias responden igual a un mismo método de inmovilización aun utilizando la misma matriz polimérica (Yang y Wang 1990; Kaya y Picard, 1995). Sin embargo, es conocido que los polímeros de origen natural tales como: el agar, el alginato y el carragenano entre otros, al ser utilizados para la inmovilización de células, en general conservan altos porcentajes de viabilidad. Sin embargo, cuando se utilizan polímeros sintéticos como la poliacrilamida se obtienen porcentajes de viabilidad desde un 0% a un 50% (Brodelius y Nilsson, 1980; Koshcheyenko *et al.*, 1983).

### V.2.2. Efecto del tiempo de contacto de las cápsulas de quitosano con el NaOH

Debido a que se obtuvo un crecimiento heterogéneo y una baja viabilidad en los ensayos iniciales de inmovilización, causados por la falta de control en el tiempo de gelificación, fue necesario investigar el efecto del tiempo de contacto de las cápsulas con células de *Synechococcus* sp. en la solución de NaOH. Los resultados obtenidos muestran una relación inversa entre el tiempo de contacto y el crecimiento del cultivo. Esta tendencia es determinada por el grado de penetración del NaOH, ya que posiblemente causa daño celular y a su vez un cambio fisicoquímico del quitosano. En sistemas inmovilizados los principales factores limitantes del crecimiento de los organismos, se relacionan con una baja difusión de los gases y los nutrientes, poca penetración de luz al interior de la matriz y el tamaño de la cápsula o esfera (Omar, 1993; Faafeng *et al.*, 1994). Sin embargo, en este trabajo el tamaño de las cápsulas aparentemente no fue la limitante del crecimiento, ya que no sobrepasa el promedio del tamaño de las cápsulas y esferas (2.5 mm de diámetro) en que se han inmovilizado otras microalgas (Cassidy *et al.*, 1996; Joo *et al.*, 2001; Fierro-Reséndiz, 2004). Posiblemente el incremento del espesor de la pared de la cápsula, relacionada con el mayor tiempo de contacto con el NaOH, causó que disminuyera el tamaño de los poros de la cápsula que no permitió una eficiente penetración del oxígeno, los nutrientes y posiblemente de la luz hacia el interior de la cápsula. Los cambios descritos con anterioridad han sido señalados por Cho (1994), para las cápsulas de alginato de sodio, quien encontró que la transferencia del oxígeno y los nutrientes está influenciada por el espesor de la membrana de la cápsula. Han *et al.* (1999) demostraron que la concentración

celular final de *Dunaliella bardawil* inmovilizada en microcápsulas de alginato de sodio, dependió del espesor de la membrana de la cápsula.

Es evidente que en los tres distintos tiempos de gelificación utilizados en este trabajo, aún se logra ver un gradiente de coloración. Con el tiempo de gelificación de 80 s se midió un menor gradiente de coloración y no se observaron cápsulas blanqueadas. Lo anterior permite inferir que el tratamiento de 80 s favoreció la formación de la pared de la cápsula de quitosano, con un espesor tal que permitió el crecimiento de las células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas, y a su vez, un mayor porcentaje de viabilidad (77%).

### **V.2.3. Crecimiento a distintas temperaturas con células inmovilizadas y libres**

*Synechococcus* es una cianobacteria cosmopolita que en forma libre habita una gran variedad de ambientes desde el terrestre, acuático y como simbiote asociado tanto en plantas como en animales (Carr y Whitton, 1982). El género *Synechococcus* es abundante en la superficie de los océanos templados y tropicales. Según observaciones de investigadores del buque oceanográfico “Woods Hole Harbor” el inicio de los afloramientos de *Synechococcus*, comienza cuando la temperatura del agua alcanza los 6 °C y este es fuertemente inhibido en invierno cuando las temperaturas bajan de los 5 °C (Waterbury *et al.*, 1986). Sin embargo, cuando este género es cultivado bajo condiciones controladas la temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 34.5 °C (Kurger y Eloff, 1978; Waterbury *et al.*, 1986).

La temperatura ambiental es uno de los factores importantes que limitan el crecimiento de las microalgas y cianobacterias, debido a que la temperatura celular se

igual a la temperatura del medio de cultivo. La temperatura no sólo es limitante en el crecimiento, sino que también afecta las tasas de reacción celular, la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa producida. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la biomasa y la actividad metabólica depende básicamente de dos factores: uno relacionado con la organización de la estructura celular (especialmente proteínas y lípidos) y el otro relacionado con los coeficientes de las tasas de reacción enzimática (Pirt, 1975; Richmond, 1986).

El factor que influyó en la falta de diferencias de las curvas de crecimiento obtenidas entre las tres temperaturas utilizadas para los cultivos de células inmovilizadas, es que posiblemente se propició un microambiente dentro de la cápsula de la matriz polimérica. En comparación con los cultivos de células libres donde no existió esta protección y las células fueron más sensibles a las variaciones en la temperatura ambiente. Esta posibilidad de microambiente, permitiría a las células inmovilizadas mantener una respuesta similar a la temperatura, al menos entre 15 y 30 °C, ya que es el intervalo en donde no se evaluó un cambio significativo en el crecimiento. Como fundamento de la hipótesis del microambiente en las cápsulas, es el poco cambio evaluado en la concentración final de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas, respecto a las diferencias encontradas en los cultivos de células libres en las tres temperaturas experimentales. Es importante señalar que la cepa de *Synechococcus* sp. utilizada en el presente trabajo, fue aislada de una región donde la temperatura ambiental promedio varía entre los 13 y los 32 °C durante el año. Por lo anterior, se puede considerar que las tres

temperaturas experimentales están dentro del intervalo de temperaturas que esta cepa puede tolerar.

En los cultivos de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas la  $\sum\mu$  no fue significativamente diferente, mientras que en las células libres sólo a 25 y 30 °C no mostraron diferencias significativas. La tendencia anterior, concuerda con lo encontrado por Kurger y Eloff (1978), quienes encontraron para una cepa de *Synechococcus* marina aislada de afloramientos naturales, que la temperatura donde se obtienen las mayores tasas de crecimiento específica es entre 25 y 32 °C.

La mayor producción de biomasa y la mayor tasa de crecimiento acumulada, se obtuvo para 25 y 30 °C en las células inmovilizadas y libres. El efecto de una fase de acondicionamiento mayor, en células inmovilizadas respecto a células libres, ha sido mencionada por otros autores y atribuida a un proceso de adaptación a las nuevas condiciones fisicoquímicas de la matriz en la que se encuentran (Cohen, 2001; Mallick, 2002).

#### **V.2.4. Crecimiento con distintas densidades de inóculo de células inmovilizadas y libres**

Las concentraciones de células utilizadas como inóculos en este trabajo, correspondieron al 10, 5 y 1.5% (v/v). Durante la transferencia de cultivos de microalgas, se recomienda un inóculo del 10% (v/v) del cultivo original. Sin embargo, se ha descrito que algunas especies de dinoflagelados y de cianobacterias (*Synechococcus* y *Prochlorococcus*) requieren un inóculo mayor del 25% (v/v) (Lorenz *et al.*, 2005). Para la

cepa de *Synechococcus* sp. utilizada en este trabajo no se encontró una diferencia significativa en la fase de acondicionamiento, como respuesta a la cantidad de células utilizadas como inóculo. Por lo anterior, se puede considerar que esta cepa no requiere un inóculo mayor del 1.5%. Sin embargo, para una especie de microalga marina (*Nannochloris oculata*), se observó una tendencia inversa a la descrita con anterioridad, ya que la longitud de la fase de acondicionamiento fue inversa al tamaño del inóculo. Mientras que para la cianobacteria *Oscillatoria agardhii*, mantenida en cultivo se encontró que cuando el tamaño del inóculo disminuyó, la fase de acondicionamiento se incrementó por más de 10 días (Droop, 1966). En los cultivos de *Synechococcus* sp. se observó que la duración de la fase de acondicionamiento dependió del efecto del proceso de inmovilización, más que por efecto de la concentración del inóculo.

El tamaño del inóculo causó efecto en la concentración celular de *Synechococcus* sp. durante el periodo de cultivo, lo anterior se debe a que la tasa del incremento de células por unidad de tiempo es proporcional al tamaño del inóculo (Wood *et al.*, 2005). La mayor cantidad de biomasa de *Synechococcus* sp. al final del cultivo, se obtuvo en la mayor concentración de inóculo de células libres e inmovilizadas. En relación con la tasa de crecimiento acumulada, se evaluó un menor efecto del tamaño del inóculo en los sistemas de células inmovilizadas respecto a los de células libres. Esta respuesta se debe a que el proceso de inmovilización causó una mayor fase de acondicionamiento. Las células inmovilizadas requieren de un periodo de aclimatación y posteriormente la matriz polimérica les provee de una protección hacia el medio exterior. Se ha encontrado que debido al proceso de inmovilización, se pueden producir cambios fisiológicos en las células

para mantener una tasa de crecimiento similar a cuando están libres en el medio (Cohen, 2001; Mallick, 2002).

#### **V.2.5. Crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. en forma inmovilizadas y libres**

En organismos inmovilizados existe una gran variedad de cambios respecto a los organismos mantenidos en forma libre. Kolot (1988) menciona que en los organismos inmovilizados existe una mayor actividad metabólica y una disminución del tiempo de generación respecto a los organismos mantenidos en forma libre. Cassidy *et al.* (1996) realizaron una revisión bibliográfica y encontraron que los organismos inmovilizados en polímeros tienen una mayor resistencia a la toxicidad de distintos compuestos químicos respecto a los mantenidos en forma libre.

Existen pocos trabajos de inmovilización de microalgas y cianobacterias en matrices de quitosano y, hasta donde se pudo investigar en la literatura del área, ninguno de estos trabajos es con cepas marinas. Para el género *Synechococcus*, sólo existe un trabajo de inmovilización de una cepa marina utilizando alginato de sodio por el método de atrapamiento en esferas que resultaron con un diámetro de 2-3 mm (Matsunaga *et al.*, 1988). Por lo anterior, hasta donde se conoce, el presente trabajo es el primero que se realiza en inmovilización de una cepa marina de *Synechococcus* por el método de encapsulación en quitosano (Tabla XI).

Tabla XI. Trabajos de inmovilización de microalgas y cianobacterias de agua dulce que se han realizado con quitosano.

Forma del quitosano	Método de inmovilización	Microorganismo	Referencia
Hojuelas	Colonización	<i>Phormidium</i> sp.	de la Noüe y Proulx, 1988a, b
Hojuelas	Colonización	<i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Anabaena doliolum</i>	Mallick y Rai, 1994
Esferas*	Atrapamiento	<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Kaya y Picard, 1996
Membranas	Colonización	<i>Arthrospira maxima</i>	Cruz-Fraga, 2003
Esferas	Atrapamiento	Dos cepas de <i>Scenedesmus</i>	Fierro-Reséndiz, 2004

\*Quitosano-konjac

En el presente trabajo se obtuvo una fase de acondicionamiento en los cultivos de células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en quitosano, la cual no se observó en los cultivos con células libres. Esta tendencia, ha sido evaluada previamente en sistemas de células inmovilizadas, lo cual indica que los organismos requieren de un tiempo de aclimatación a las condiciones de la matriz polimérica y posiblemente en este tiempo es cuando se dan los cambios fisiológicos importantes (Lau *et al.*, 1998; Cohen, 2001; Mallick, 2002). Sin embargo, la concentración final de células y la tasa de crecimiento acumulada al final del ensayo fueron mayores al mantener células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas (Tabla VII). Lo anterior corresponde a lo obtenido en estudios similares, donde se obtuvo una mayor producción de biomasa de *Anabaena* sp. y *Chlorella* sp. en sistemas inmovilizados con alginato con respecto a los cultivos de células libres (Rai y

Mallick, 1992). Las tasas de crecimiento en células inmovilizadas, muestra que las cápsulas de quitosano, cumplieron con las características requeridas para la inmovilización de microorganismos fotosintéticos, tales como: no tóxica, fototransparente, estable en el medio de cultivo, eficiente en la retención de la biomasa y resistente al aumento de la biomasa, entre otras (Mallick, 2002).

### **V.3. Difusión iónica con cápsulas de quitosano elaboradas a distintas temperaturas**

Una de las desventajas atribuidas al uso de polímeros para la encapsulación de microorganismos, es la baja difusión del material, la cual limita la entrada de nutrientes y gases al centro de la cápsula. Lo anterior puede producir un incremento en el volumen interno de los gases que puede ocasionar la ruptura de la pared externa liberando las células al medio de cultivo. La difusión de distintos compuestos a través de matrices poliméricas está influenciada principalmente por las siguientes variables: el tamaño del poro en el arreglo de la matriz, el tamaño y la forma de la matriz y la concentración y el tipo de polímero utilizado (Cohen, 2001).

Para modificar las características de porosidad de las membranas de quitosano se manipulan variables tales como el pH y el tipo del solvente, la fuerza iónica y la temperatura (Chen *et al.*, 1994; Jaepyoung *et al.*, 2006). Las características de las membranas de quitosano se pueden modificar con distintos propósitos, por ejemplo, con la finalidad de emplearlas para la dosificación de fármacos en dependencia de la difusión que existe a través del diámetro de los poros (Qiu y Park, 2001). Renneberg *et al.* (1988) en un estudio con distintos polímeros encontraron que la variable más importante para la difusión

del oxígeno a través de las matrices poliméricas son: el tamaño de poro y el contenido de agua en la matriz.

Las cápsulas de quitosano elaboradas a 15 °C, tuvieron una difusión iónica menor respecto a las otras temperaturas de elaboración (24, 25 y 40 °C). Lo anterior sugiere que el quitosano utilizado a bajas temperaturas forma una red polimérica más estrecha que la obtenida a las mayores temperaturas experimentales. Es posible que las cápsulas elaboradas a bajas temperaturas (15 °C), tengan poros de menor diámetro respecto a las cápsulas elaboradas a temperaturas mayores (24, 25 y 40 °C). En los ensayos realizados con células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en cápsulas de quitosano y elaboradas a 24 °C, se puede inferir que existe una buena difusión de nutrientes y gases, debido a que la tasa de crecimiento evaluada para cultivos de la misma especie con células libres en el medio es similar.

#### **V.4. Remoción de nitrógeno y fósforo con cultivos de *Synechococcus* sp. en forma inmovilizada y libre**

##### **V.4.1. Crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. con distintos aportes de nitrógeno**

Algunas cepas de *Synechococcus* pueden utilizar nitrógeno molecular, nitratos, nitritos, amonio, urea y algunos aminoácidos como único aporte de nitrógeno para su crecimiento (Waterbury *et al.*, 1986; Spiller y Shanmugam, 1987; Collier *et al.*, 1999; Tabla XIII).

Las curvas de crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. con distintos aportes de nitrógeno tuvieron diferencias con respecto al tiempo de cultivo, lo cual se vio reflejado en

una mayor producción de la biomasa final. Sin embargo, la tasa de crecimiento durante la fase exponencial y la tasa de crecimiento acumulada, fueron similares con los distintos aportes de nitrógeno utilizados. La tendencia anterior, está en correspondencia con lo encontrado para *Synechococcus subsalsus*, cultivada con distintos aportes de nitrógeno, ya que no se encontró una diferencia en la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), pero sí en la producción final de biomasa. La mayor tasa de crecimiento se obtuvo en los cultivos con urea (Lourenco *et al.*, 2002). Los cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos con nitrato de sodio mostraron un menor crecimiento (31%), respecto al obtenido con urea como único aporte de nitrógeno (Tabla IX). Sin embargo, los cultivos que tenían nitrógeno de fertilizantes agrícolas (una mezcla de distintas formas nitrogenadas, pero con una mayor proporción de urea), la diferencia en el crecimiento fue menor (19%). Con lo anterior, se puede inferir que esta cepa de *Synechococcus* sp. incorpora el nitrógeno de forma preferencial como urea > amonio > nitratos, cuando es cultivada en una concentración equivalente al medio "F". La respuesta anterior no corresponde con la generalidad de la incorporación y asimilación de nitrógeno por el fitoplancton. Se ha encontrado que para el género *Synechococcus* sp., el amonio se incorpora antes que la urea, y algunas de estas cepas no crecen cuando se encuentran en medios con urea como único aporte de nitrógeno (Waterbury *et al.*, 1986; Levasseur *et al.*, 1993; Collier *et al.*, 1999; Tabla XII).

El bajo crecimiento que se obtuvo para *Synechococcus* sp. en los cultivos con nitrato de sodio, correspondió al mayor gasto energético requerido en la reducción del nitrato hasta aminoácidos. Se conoce que para el fitoplancton, la preferencia por determinados aportes de nitrógeno, depende del estado de oxidación de la molécula de

nitrógeno. Debido a que los estados de oxidación están directamente relacionados con la energía requerida para su asimilación, como es la reducción completa del nitrato a

Tabla XII. Capacidad de algunas cepas de *Synechococcus* para incorporar distintos aportes de nitrógeno.

Cepa	Aporte de nitrógeno				Referencia
	N <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Urea	
<i>Synechococcus</i> sp.		+	+	+	Este trabajo
<i>S. subsalsus</i>		+	±	+	Lourenco <i>et al.</i> , 2002
WH7805	-	+	+	+	Collier <i>et al.</i> , 1999
WH8010	-			-	Waterbury <i>et al.</i> , 1986
WH8018	-	+	+	-	Waterbury <i>et al.</i> , 1986
WH8110	-	+		-	Waterbury <i>et al.</i> , 1986
WH8006	-	+		-	Waterbury <i>et al.</i> , 1986
WH8009	-	+		+	Waterbury <i>et al.</i> , 1986
WH7803	-	+	+	-	Collier <i>et al.</i> , 1999; Bird y Wyman, 2003
WH8102	-	+	+	-	Collier <i>et al.</i> , 1999
WH8103	-	+	+	+	Collier <i>et al.</i> , 1999
WH8011	-	+	+	+	Collier <i>et al.</i> , 1999
WH8112	-	+	+	+	Collier <i>et al.</i> , 1999
WH8113	-	+	+	+	Collier <i>et al.</i> , 1999
PCC7002	-	+		±	Sakamoto <i>et al.</i> , 1998
PCC7335	+	+		-	Rippka <i>et al.</i> , 1979; Sakamoto <i>et al.</i> , 1998
RF-1		+	-		Wang <i>et al.</i> , 2003
SF-1	+	+	+		Spiller y Shanmugam, 1987

glutamato, se emplea cinco veces más energía (10 electrones), mientras que para la reducción de amonio a glutamato sólo se requiere de 2 electrones (García-Fernández *et al.*, 2004; Tabla XIII). En términos de energía, se esperaría que la asimilación de la urea fuera similar a la del amonio, ya que la utilización de ambas formas nitrogenadas requiere de un gasto de 2 electrones y 1 molécula de ATP para ser incorporados como aminoácidos (Syrett, 1981; Levasseur *et al.*, 1993). Sin embargo, la cepa de *Synechococcus* sp. que se utilizó en este trabajo, incorporó preferentemente urea antes que amonio y es igual a lo obtenido para otra cepa de *Synechococcus* por Lourenco *et al.* (2002). Los cultivos de la cepa WH7805 de *Synechococcus* no mostraron diferencia en la tasa crecimiento al ser cultivadas con urea, amonio y nitratos (Collier *et al.*, 1999). Por lo anterior, la preferencia por determinado compuesto nitrogenado, no puede ser atribuida sólo al estado de oxidación de los compuestos, y se debe considerar la respuesta fisiológica especie específica (Fidalgo *et al.*, 1995; Toledo *et al.*, 1999).

Con base en los resultados anteriores y dado que el propósito del trabajo fue remover nutrientes de efluentes de cultivos acuícolas, se decidió utilizar nitrato de amonio para los ensayos de remoción, ya que el principal componente de nitrógeno proveniente de los cultivos acuícolas es el amonio (Jones *et al.*, 2001a, b; Páez-Osuna, 2001a, b). Sin embargo, debido a que *Synechococcus* sp. puede cultivarse en medios con urea como único aporte de nitrógeno, o en combinación con otras formas nitrogenadas, abre un panorama más amplio de la utilización de esta cepa para otras aplicaciones: esto es, para remover urea de efluentes contaminados con fertilizantes agrícolas, ya que la urea es uno de los principales aportes nitrogenados al medio acuático.

Tabla XIII. Bioenergética de la asimilación de distintos aportes de nitrógeno, tipo de enzima utilizada, forma nitrogenada reducida, número de electrones utilizados y número de moléculas de ATP utilizadas.

Enzima	Reducción	Electrones	ATP
Nitrogenasa	$N_2 \rightarrow NH_4^+$	8	16
Nitrato reductasa	$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	2	0
Nitrito reductasa	$NO_2^- \rightarrow NH_4^+$	6	0
Glutamina sintetasa	$NH_4^+ \rightarrow Glu$	2	1
Ureasa	$CO(NH_2)_2 \rightarrow Glu$	2	1

#### V.4.2. Remoción de nitrógeno y fósforo

El uso de tratamientos biológicos para depurar las aguas de desecho que se generan por distintas actividades humanas se ha intensificado en los últimos años, principalmente en los países industrializados o en desarrollo. La necesidad de eficientizar los procesos de producción ya sea en la industria, la agricultura y la acuicultura, entre otros, ha generado que sus efluentes sean cada vez más ricos en nutrientes principalmente en nitrógeno y fósforo, y pueden causar la eutrofización de las aguas receptoras.

Existen tratamientos físicos y químicos para las aguas de desecho, sin embargo son costosos, algunos son poco eficientes y algunos pueden causar problemas secundarios de contaminación (Mohn, 1988; Oswald, 1988). Los tratamientos biológicos, entre ellos la biotecnología solar a través del uso de microalgas y cianobacterias, son uno de los tratamientos con mayor potencial, ya que además, como resultado del proceso se genera biomasa la cual puede ser aprovechada para varios propósitos en la acuicultura y la

biotecnología (de la Noüe y de Pauw, 1988). Uno de los principales problemas relacionados a la utilización de organismos fotosintéticos para tratamientos biológicos, es la problemática de la cosecha o separación de la biomasa algal producida durante el tratamiento de las aguas de desecho. Uno de los métodos utilizados para la separación de la biomasa de microalgas es utilizar flocculantes, sin embargo, estos compuestos ocasionan una contaminación secundaria, ya que los flocculantes contienen metales como el aluminio (Richmond, 1986). Por lo anterior, se están desarrollando técnicas que permitan el retiro eficiente de la biomasa producida. Una de las técnicas más eficientes para la recuperación de biomasa microalgal, es por medio de la inmovilización de células para el tratamiento de aguas de desecho. El uso de la inmovilización de células evita el problema de la cosecha y resuelve el problema de la retención de las microalgas para ser usadas como un subproducto (de la Noüe y de Pauw, 1988).

La eficiencia de la remoción de nutrientes con microalgas y cianobacterias es influenciada por una gran variedad de factores, los más importantes son: la cantidad de luz incidente en el cultivo, la concentración de nutrientes, la forma molecular de los nutrientes, la temperatura de cultivo, el pH, la disponibilidad de carbono, la cepa de microorganismo a utilizar, las condiciones de cultivo en las que se encontraba la cepa antes de ser utilizada para remover nutrientes, la concentración celular por mL de medio de cultivo, entre otros (Garbisu *et al.*, 1992; Jeanfils *et al.*, 1993; Mallick y Rai 1993; Urrutia *et al.*, 1995; Donald *et al.*, 1997). A la remoción de nutrientes con células inmovilizadas, se suman factores tales como: el tipo de matriz polimérica utilizada, el tipo y técnica de inmovilización, la

concentración del polímero utilizado, y el diámetro de la matriz polimérica, entre otras (Mallick y Rai, 1994; Tam y Wong, 2000; Mallick, 2002).

La remoción de nitrógeno con células de *Synechococcus* sp. en forma libre e inmovilizada fue similar, lo cual concuerda con los trabajos que obtienen porcentajes de remoción similares entre ambos sistemas, e incluso en algunos casos una mayor remoción de nutrientes con los sistemas inmovilizados (Chevalier y de la Noüe, 1985a; Lau *et al.*, 1998; Cruz-Fraga, 2003; Fierro-Reséndiz, 2004). La mayor remoción de nutrientes con células inmovilizadas, está relacionada con el estado fisiológico de las células, ya que en la mayoría de los experimentos donde obtienen una mayor remoción de nutrientes con células inmovilizadas, la cepa fue puesta en inanición antes de ser utilizada. Garbisu *et al.* (1992) indican que *Phormidium laminosum* inmovilizada en matrices de polivinilo, incrementa la capacidad de remoción de nitratos con respecto al tiempo (hasta 70 h) de incubación en un medio libre de nitrógeno. Sin embargo, cuando el tiempo de inanición de nitrógeno superó las 70 h, la tasa de remoción decreció, lo cual atribuyen a una degeneración de la estructura celular. Urrutia *et al.* (1995) encontraron que para *Scenedesmus obliquus* inmovilizada por absorción en matrices de poliuretano y polivinilo, los cultivos de células libres e inmóviles incubados en un medio sin nitrógeno, incrementan su capacidad de remoción respecto al mayor tiempo de inanición. Se ha encontrado que la técnica de inmovilización influye en el estado fisiológico de los microorganismos inmóviles, ya que a veces estos tratamientos llegan a ser muy agresivos para los microorganismos y después del proceso de inmovilización los microorganismos modifican sus actividades metabólicas (Omar, 1993; Faafeng *et al.*, 1994; Kaya y Picard, 1995; Cohen, 2001; Mallick, 2002).

Los resultados de remoción de nitrógeno total por células inmovilizadas en el presente trabajo fueron bajos, respecto a los valores encontrados por otros autores a los siete días de cultivo (Tabla XV; Omar, 1993; Faafeng *et al.*, 1994; Kaya y Picard, 1995; Fierro-Reséndiz, 2004). Sin embargo, estas diferencias en la capacidad de remoción se deben a: las distintas concentraciones y formas químicas del aporte de nitrógeno y fósforo que existan en el medio de cultivo, al tipo de polímero, la técnica de inmovilización, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico de las células antes de comenzar la remoción de nutrientes (Omar, 1993; Faafeng *et al.*, 1994; Kaya y Picard, 1995; Fierro-Reséndiz, 2004). Para *Chlorella vulgaris* se ha observado que cuando es mantenida en altas concentraciones de nitrógeno ( $42.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ ) e inmovilizada en carragenano remueve  $40.4 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabla XIV; Lau *et al.*, 1997). Por lo tanto, se esperaría que cuando es cultivada a bajas concentraciones de nitrógeno tenga la capacidad de remover el 100 % del nitrógeno presente en el medio de cultivo. Otros autores mencionan que *Chlorella vulgaris* al ser cultivada en una baja concentración del nitrógeno total ( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e inmovilizada en carragenano removió tan solo  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  del nitrógeno total, mientras que en el mismo experimento pero inmovilizada en quitosano removió  $2.6 \text{ mg L}^{-1}$  del nitrógeno total (Tabla XIV; Mallick y Rai, 1994).

La remoción de nitratos en los cultivos de células de *Synechococcus* sp. en forma libre e inmovilizada fue similar, la mayor remoción fue durante el primer día de cultivo, esta tendencia está relacionada con la gran actividad de la nitrato reductasa (NR) al inicio del experimento. La actividad enzimática se determinó en un segundo experimento, en el que las condiciones de cultivo fueron similares. En estos experimentos las cápsulas con

células de *Synechococcus* sp. fueron acondicionadas al nuevo medio de cultivo (2E) durante 3 días y posiblemente este tiempo no fue suficiente para inhibir la actividad de la NR que traían las células, al ser cultivadas en medio "f" que tiene como único aporte de nitrógeno el  $\text{NaNO}_3^-$ . Se consideró que la actividad de la NR posiblemente se inhibiera con las altas concentraciones de  $\text{NH}_3$  ( $23.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NH}_3$ ), que contenía el medio 2E. En otras especies de microalgas y cianobacterias, mantenidas a concentraciones mayores de  $14 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  la actividad de la NR se ve inhibida (Palod *et al.*, 1990; Dorch *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005). Sin embargo, en otros trabajos realizados para determinar la interacción de la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_3$ , se encontró que cuando el cultivo se mantiene en un medio con  $\text{NO}_3^-$  como único aporte de nitrógeno, la asimilación del  $\text{NO}_3^-$  no es inhibida fácilmente. Por el contrario, cuando el cultivo se hace en un medio con  $\text{NH}_3$  como único aporte de nitrógeno la activación de la asimilación de los  $\text{NO}_3^-$  es baja (Dorch *et al.*, 1991). Es posible que en esta cepa de *Synechococcus* sp. la presencia de altas concentraciones de  $\text{NH}_3$  no inhiba la actividad de la NR, sino que la actividad disminuya cuando el medio de cultivo contiene ambos aportes de nitrógeno y que la asimilación de cada uno de los aportes de nitrógeno sean procesos independientes. Esta hipótesis, se basa en los valores de remoción obtenidos entre los días 2 a 6, en donde la capacidad de remoción de N- $\text{NO}_3$  y N- $\text{NH}_3$  fue similar.

Tabla XIV. Valores promedio de remoción de nitrógeno y fósforo con microalgas y cianobacterias en diferentes polímeros.

Polímero	Cepa	Inicial		Remoción		Tiempo (días)	Referencia
		(mg L <sup>-1</sup> )		(mg L <sup>-1</sup> )			
		N	P	N	P		
Quitosano	<i>Phormidium</i> sp.	12.0	2.2	11.4	0.7	1	de la Noüe y Proulx, 1988a, b
	<i>Scenedesmus bijugatus</i>	2.4	3.1	1.8	2.5	1	
Quitosano	<i>Chlorella vulgaris</i>	3.0	—	2.6	—	1	Mallick y Rai, 1994
Quitosano- konjac	<i>Scenedesmus bicellularis</i>	10.5	1.5	10.4	1.5	0.08	Kaya y Picard, 1996
Quitosano	<i>Arthrospira maxima</i>	7	2	3.0	2.0	0.50	Cruz-Fraga, 2003
Quitosano	<i>Scenedesmus</i> sp.	44.0	6	22.0	2.9	0.50	Fierro-Reséndiz, 2004
Quitosano	<i>Synechococcus</i> sp.	48.2	6.7	29.4	3.6	7	Este trabajo
Alginato	<i>Chlorella vulgaris</i>	2.4	3.1	1.9	2.6	1	Megharaj <i>et al.</i> , 1992
Alginato	<i>Chlorella emersonii</i>	12.8	—	11.1	—	3	Jeanfils <i>et al.</i> , 1993
Carragenano	<i>Chlorella vulgaris</i>	3.0	—	2.0	—	1	Mallick y Rai, 1994
Carragenano	<i>Chlorella vulgaris</i>	42.5	3.7	40.4	3.7	3	Lau <i>et al.</i> , 1997
Carragenano	<i>Chlorella vulgaris</i>	11.5	5.6	11.5	2.8	2	Lau <i>et al.</i> , 1998

Se encontró un incremento de la concentración de nitritos a valores cercanos al 1200%, lo cual puede ser atribuido a que *Synechococcus* sp., al no ser selectivo por algún aporte de nitrógeno (N-NO<sub>3</sub> o N-NH<sub>3</sub>), incorpora ambas formas nitrogenadas. Sin embargo, es posible que con la incorporación de N-NH<sub>3</sub> *Synechococcus* sp. cubra los requerimientos de nitrógeno, por lo tanto, al incorporar N-NO<sub>3</sub> y existir actividad de la NR la producción de N-NO<sub>2</sub> es tal que *Synechococcus* sp. tiene que excretarlo al medio para mantener un equilibrio de la concentración interna de nitritos. Por lo anterior, es posible que la concentración de N-NH<sub>3</sub> que existe en el citoplasma inhiba la actividad de la nitrito reductasa (NiR), además, que para la reducción de N-NO<sub>2</sub> a N-NH<sub>3</sub> el costo energético es mayor que la utilización del N-NH<sub>3</sub> que entra al citoplasma en forma pasiva (Syrett, 1981; Reyes *et al.*, 1993; Tabla XIII).

La excreción de N-NO<sub>2</sub> al medio de cultivo por distintas cepas de *Synechococcus* y otras cianobacterias ya ha sido estudiada. La excreción de nitritos al medio, lo atribuyen a una limitación por CO<sub>2</sub> ocasionando un incremento de N-NH<sub>3</sub> intracelular, lo cual se debe a que el N-NH<sub>3</sub> ya no puede ser utilizado para formar moléculas nitrogenadas por la deficiencia de carbono. Por lo tanto, con el incremento de la concentración intracelular de N-NH<sub>3</sub> la actividad de la NiR se inhibe, pero sin decrecer la actividad de la NR y esto ocasiona un incremento de la concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> intracelular. Altas concentraciones de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> intracelular son tóxicas para las células, sin embargo, con la finalidad de mantener un equilibrio interno de la concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, las células recurren al mecanismo de excreción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> al medio (Reyes *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995). Krämer y Schmidt (1989) observaron una mayor liberación de N-NO<sub>2</sub> al medio durante el segundo día en

cultivos de *Synechococcus* 6301, mantenidos bajo luz continua. Es importante controlar la producción de N-NO<sub>2</sub> ya que este compuesto llega a ser aun más nocivo que el N-NO<sub>3</sub> y el N-NH<sub>3</sub>. Sin embargo, los niveles de producción de nitritos aquí reportados son bajos (0.04 mg L<sup>-1</sup>) comparado por ejemplo con los niveles óptimos para el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* que es > 2.0 mg L<sup>-1</sup> (Clifford, 1994; Cheng *et al.*, 2002).

La remoción de fósforo fue más eficiente que la remoción del nitrógeno, lo cual es una ventaja para el uso potencial de *Synechococcus* sp., porque en general la remoción de fósforo es un proceso más lento con respecto a la remoción del nitrógeno (Syrett, 1981). La remoción de fósforo está relacionada a un desbalance en la razón de N:P, donde el nitrógeno se torna limitante y por lo tanto cesa la incorporación del fósforo (Chevalier y de la Noüe 1985a; Mallick, 2002). La remoción de fósforo con *Synechococcus* sp. fue mas eficiente en los cultivos con células libres comparada con los de células inmovilizadas es posible que esto se deba al estado fisiológico de la cepa después del proceso de inmovilización. En otros trabajos similares donde se utilizaron microalgas inmovilizadas, se han encontrado mayores valores de remoción de fósforo con células inmovilizadas en contraste con los cultivos de microalgas es forma libres (Lau *et al.*, 1998; Cruz-Fraga, 2003; Fierro-Reséndiz, 2004)

La remoción de fósforo con *Synechococcus* sp. en este trabajo no fue tan eficiente respecto a la evaluada en otros estudios, en los cuales en un menor tiempo (0.5-2 días), y partiendo de concentraciones de fósforo similares a las utilizadas, obtienen una remoción similar (2.85 mg L<sup>-1</sup> de fosfatos; Figura XV; Lau *et al.*, 1998; Fierro-Reséndiz, 2004). Sin embargo, como se mencionó en líneas atrás para el nitrógeno, en los trabajos que

obtuvieron una alta remoción de fósforo, las células inmovilizadas fueron puestas en inanición antes de comenzar los experimentos. Kaya y Picard (1995) encontraron una relación directa del tiempo de inanición respecto a la capacidad de remoción de fósforo por *Scenedesmus bicellaris* inmovilizada en matrices de alginato con 144 h de inanición. Sin embargo, cuando incubaron por 48 h en inanición a *Scenedesmus bicellaris* inmovilizada en matrices de quitosano, encontraron que no causó un efecto significativo en la remoción de fósforo. Sin embargo, después de 96 h de inanición la remoción de fosfatos se vio favorecida (Kaya y Picard, 1996).

Cuando las microalgas o cianobacterias son privadas temporalmente de uno o más elementos nutrimentales tales como el nitrógeno y el fósforo, se genera un cambio en los procesos metabólicos y al ser expuestas nuevamente a un medio rico en nutrientes la respuesta es la acumulación innecesaria de nutrientes (Kaya y Picard, 1995). Cuando el fósforo es limitante y luego se encuentra disponible en exceso, la célula lo acumula en el citoplasma al proceso de acumulación de nutrientes que Droop (1968) llamó “consumo de lujo”. Sin embargo, no siempre estos nutrientes almacenados en el citoplasma son transformados en biomasa y en algunos experimentos puede producirse un reflujó de nutrientes de las células al medio (Button, 1991; Kaya y Picard, 1995; Donald *et al.*, 1997).

La remoción de  $\text{PO}_4^{3-}$  por las cápsulas de quitosano fue menor (23%), a la mencionada en otros trabajos (60%) (de la Noüe y Proulx, 1988a; Fierro-Reséndiz, 2004). Estos autores atribuyen la remoción de fósforo, a la liberación de iones de calcio al medio por parte del quitosano el cual reacciona con el fosfato provocando su precipitación. Sin embargo, el complejo  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  se ve favorecido a valores de pH mayores que 9.0

mientras que a valores de pH menores de 8.0 existe una competencia por el calcio entre los carbonatos y los fosfatos, siendo mayores los acomplejamientos de  $\text{CaCO}_3$  (Megharaj, 1992; Tam y Wong, 2000; de-Bashan y Bashan, 2004). La anterior explica porque en los blancos de quitosano que se utilizaron en este trabajo mostraron una menor remoción de  $\text{PO}_4^{3-}$ , en este trabajo se obtuvieron valores de  $\text{pH} < 8.0$  mientras que en el trabajo de de la Noüe y Proulx (1988a) tenían valores de  $\text{pH} \approx 9.0$ .

El pH del medio de cultivo es uno de los parámetros importantes en la remoción de nutrientes, ya que al aumentar el pH a valores mayores de 9 puede existir una pérdida de nitrógeno por volatilización del amonio y pérdida de fósforo por precipitación (Azov y Shelef, 1987; Mallick, 2002). Con los valores de  $\text{pH} < 9$  obtenidos en los cultivos con células libres e inmovilizadas de *Synechococcus* sp., no se evaluó una pérdida significativa de amonio por volatilización ni precipitación de fósforo, a pesar de que algunos autores mencionan que valores de pH entre 6 y 8 favorecen una remoción eficiente de nutrientes (Mallick y Rai, 1993; 1994). Sin embargo, cada organismo tiene requerimientos específicos de pH (Babich y Stotzky, 1986), las cianobacterias requieren valores de pH alcalinos para un mejor crecimiento y por lo tanto una mayor actividad metabólica la cual se traduce en una mayor remoción de nutrientes (Fogg *et al.*, 1973; Skulberg *et al.*, 1984).

La concentración de pigmentos fotosintéticos en las microalgas y las cianobacterias está influenciado principalmente por la irradiancia, la calidad de luz y el aporte de nitrógeno (Turpin, 1991; Lourenco *et al.*, 2002; Loreto *et al.*, 2003). Los cultivos de células inmovilizadas y libres de *Synechococcus* sp., no disminuyeron la concentración de clorofila *a* (Chl *a*) al final del experimento. Este continuo incremento de la concentración de Chl *a*

se debe a que aún no existía una limitación por el nitrógeno. Lau *et al.* (1998) encontraron el máximo valor de Chl *a* y un máximo valor de remoción de nitrógeno al segundo día de cultivo para células de *Chlorella vulgaris* mantenidas en forma libre e inmovilizada en matrices de carragenano. Para distintos grupos algales, especialmente en cianobacterias, el agotamiento de nutrientes causa una disminución en el contenido pigmentario y en la tasa de fotosíntesis (Boussiba y Richmond, 1980; Turpin, 1991; Lourenco *et al.*, 2002; Loreto *et al.*, 2003).

Los cultivos de células inmovilizadas de *Synechococcus* sp. tuvieron un mayor contenido de Chl *a* con respecto a los cultivos con células libres. Esta respuesta pigmentaria ya ha sido descrita en cultivos de células de *Chlorella vulgaris* en forma libre e inmovilizadas en matrices de carragenano y alginato. Se encontró, que los cultivos con células libres mostraron al primer día de cultivo el máximo valor de Chl *a* (1.3 pg células<sup>-1</sup>), al día dos la inmovilizadas con carragenano (2.8 pg células<sup>-1</sup>) y al día tres los cultivos con células inmóviles en alginato (2.3 pg células<sup>-1</sup>). Concluyen que para *Chlorella vulgaris* los cultivos con células inmovilizadas sintetizan más Chl *a* (Lau *et al.*, 1997). El mayor contenido de Chl *a*, es atribuido a un mecanismo de compensación al autosombreado y a una limitación de la penetración de la luz debido a la matriz polimérica. Además, que al confinar las células algales dentro de la matriz polimérica, se encuentran concentradas y en consecuencia existe un efecto de empaquetamiento debido a una alta densidad de pigmentos (Tamponnet *et al.*, 1985; Trevan y Mak, 1988; Lau *et al.*, 1997; Pane *et al.*, 1998). Algunos autores concluyen que la evaluación de la concentración de Chl *a*, no es un buen estimador del crecimiento para comparar el crecimiento de células libres respecto de

células inmóviles. Se ha evaluado que el contenido de Chl *a* en cultivos de células inmovilizadas es mayor que en los cultivos de células libres y esto causa una sobrestimación de la biomasa algal cultivada (Lau *et al.*, 1997; Pane *et al.*, 1998).

La composición bioquímica de las microalgas y las cianobacterias es influenciada por la irradiancia, la calidad de luz y el aporte de nitrógeno (Turpin, 1991; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Lourenco *et al.*, 2002; Loreto *et al.*, 2003). La producción óptima de proteína se favorece cuando no existe una limitación de nitrógeno y por lo tanto la síntesis de carbohidratos es limitada, pero cuando existe limitación por nitrógeno la síntesis de carbohidratos se incrementa y la producción de proteína decae (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989). Aunque estadísticamente no existieron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas entre los cultivos con células de *Synechococcus* sp. en forma libre e inmóviles, los cultivos con células inmovilizadas tuvieron 11.4% más proteína que los cultivos de células libres. Esta tendencia concuerda con lo encontrado por Pane *et al.* (1998), quienes reportan un 8.5% más proteína en los cultivos de células inmovilizadas de *Tetraselmis suecica* en matrices de alginato. La respuesta anterior se debe al incremento de los centros de reacción, los cuales son un complejo proteína-clorofila. En los cultivos de células inmovilizadas en matrices poliméricas, el efecto de autosombreado causa un incremento de los complejos proteína-clorofila (Perry *et al.*, 1981; Lau *et al.*, 1997; Pane *et al.*, 1998). Pane *et al.* (1998) demostraron un decremento de la concentración de proteína al final de la fase exponencial para los cultivos de células libres, ya que en los cultivos de células inmóviles no encuentran diferencias por el efecto de la fase de crecimiento del cultivo. En los cultivos de células de *Synechococcus* sp. mantenidas ya sea en forma libre o

inmovilizada en quitosano, se evaluó un decremento de la concentración de proteína después de la fase de crecimiento exponencial. Algunos autores concluyen que el decremento de la concentración de proteína total, es el resultado de una deficiencia de nitrógeno y una degradación de la proteína para suplir las necesidades de nitrógeno en distintas rutas metabólicas (Utting, 1985; Lewitus y Caron, 1990; Loreto *et al.*, 2003). Sin embargo, en los cultivos de *Synechococcus* sp. no existió una limitación por nitrógeno lo que sugiere que posiblemente el decremento de la concentración de proteína este relacionado con una limitación de la luz debido al crecimiento natural de la cianobacteria inmovilizada.

## **V.5. Efecto del proceso de inmovilización en la respuesta fisiológica de *Synechococcus* sp.**

### **V.5.1. Curvas fotosintéticas (P-I)**

La tasa de fotosíntesis depende de la luz disponible o irradiancia absorbida, la luz es transformada en energía química y almacenada en compuestos reducidos de carbono. Parte de esta energía es usada como sustrato en la respiración, como proveedor de energía para todos los procesos metabólicos celulares. El remanente de la energía de la fotosíntesis (fotosíntesis neta;  $P_n$ ), puede ser utilizado en la biosíntesis de nuevas células (Dawes, 1986; Dubinsky *et al.*, 1995). La relación entre fotosíntesis e irradiancia, generalmente es representada gráficamente por curvas de fotosíntesis vs. irradiancia (P-I). Estas curvas se hacen para obtener información sobre el estado fisiológico de las plantas, la tasa de

incorporación de carbono y/o la tasa de de evolución de oxígeno, determinadas bajo distintas intensidades de luz.

Las curvas de fotosíntesis evaluadas el día tres para los cultivos de células libres y los cultivos de células inmovilizadas, no tuvieron diferencias significativas para esta fecha. Se puede considerar que el proceso de inmovilización no causó cambio en la actividad fotosintética en las células de *Synechococcus* sp. Esta respuesta corresponde a lo encontrado para *Scenedesmus obliquus* inmovilizada por absorción en distintas matrices de poliuretano y polivinil, y para *Chlorella emersonii* inmovilizada por atrapamiento en matrices de alginato (Urrutia *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1995). Sin embargo, para *Botryococcus braunii* inmovilizada por atrapamiento en matrices de alginato, se evaluó una mayor eficiencia fotosintética en las células inmovilizadas (Bailliez *et al.*, 1988).

Las distintas respuestas fotosintéticas encontradas en la literatura se deben al tipo de organismo inmovilizado, el tipo de matriz polimérica y el tipo de técnica de inmovilización. Sin embargo, la respuesta fotosintética en células inmovilizadas es también afectada por el arreglo estructural de las cadenas del polímero y la transparencia de la matriz. Acorde a los ángulos y al arreglo estructural de las cadenas del polímero, la luz que penetre tendrá mayor o menor dispersión. La densidad del polímero y grado de gelificación causan una disminución del paso de la luz disponible para los microorganismos inmovilizados en la matriz polimérica (Urrutia *et al.*, 1995; Cohen, 2001).

La disminución de la tasa de fotosíntesis máxima ( $P_{\text{máx}}$ ) y de la eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ), en los cultivos de células inmóviles se produjo por la atenuación de la luz

incidente y al aumento de pigmentos causado por el incremento de biomasa (autosombreado) en los cultivos (Richardson *et al.*, 1983; Sukenik *et al.*, 1987; Henley, 1993). Los valores de la  $\alpha$ , establecieron que el efecto de autosombreado con respecto a la edad del cultivo; este fue mayor en células inmovilizadas en comparación con los cultivos de células libres. *Synechococcus* sp., para compensar este efecto incrementó la cantidad de pigmentos fotosintéticos, sin embargo, este incremento no fue suficiente para mantener la máxima tasa fotosintética. Prezelin y Sweeney (1979) describen este mecanismo de autosombreado para cultivos de dinoflagelados adaptados a baja y altas intensidades de luz.

Aunque estadísticamente no existieron diferencias en los valores del índice de saturación lumínica ( $I_k$ ), los cultivos con células inmovilizadas resultaron con valores mayores que los cultivos de células libres. Lo anterior posiblemente está relacionado a la disminución del paso de la luz a través de la matriz, por lo tanto requiere de mayor flujo de fotones incidentes en el cultivo para realizar fotosíntesis. Esta respuesta indica que posiblemente sólo las células que se encuentran cercanas a la superficie de la cápsula, son las que están realizando una fotosíntesis eficiente como se encontró para *Scenedesmus obliquus*, donde sólo las células que se encuentran en la superficie de la matriz realizan una fotosíntesis eficiente (Urrutia *et al.*, 1995).

#### **V.5.2. Actividad de la nitrato reductasa (NR)**

Uno de los importantes aportes de nitrógeno a organismos fotosintéticos es el  $\text{NO}_3^-$ , el cual es incorporado al interior de la célula por un mecanismo de transporte activo y reducido a  $\text{NH}_4^+$  por la actividad de dos enzimas. La primera es la nitrato reductasa (NR),

que cataliza la conversión de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  y la nitrito reductasa (NiR) actúa reduciendo el  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$  (Levasseur *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995; Maeda *et al.*, 1998). La energía y el poder reductor para la asimilación de los  $\text{NO}_3^-$  se derivan del mecanismo fotosintético o del oxidativo, frecuentemente por la respiración de los carbohidratos. Además, cuando se reducen grandes cantidades de  $\text{NO}_3^-$  el  $\text{NH}_4^+$  resultante debe combinarse rápidamente con esqueletos de carbono para formar compuestos orgánicos nitrogenados (amino-ácidos), de otro modo se acumularían cantidades tóxicas de  $\text{NH}_4^+$  (Levasseur *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995). Así, la acumulación masiva de  $\text{NO}_2^-$  puede sobrecargar la capacidad fotosintética y las reservas de carbohidratos de las microalgas e incluso existir una excreción de  $\text{NO}_2^-$  al medio (Krämer y Schmidt, 1989; Suzuki *et al.*, 1995).

La actividad de la NR en *Synechococcus* sp. disminuyó considerablemente después del día tres de cultivo en ambos sistemas (85% en células libres y 72% en células inmovilizadas), y se mantuvo con valores de baja actividad enzimática hasta el final del experimento. Lo anterior posiblemente se explica por una inhibición parcial de la NR por la presencia de  $\text{NH}_4^+$  ya que a una concentración mayor de  $14 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$  dicha actividad se inhibe (Palod *et al.*, 1990; Dortch *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005). Sin embargo, en algunas microalgas la inhibición de la NR por  $\text{NH}_4^+$  es menor cuando el cultivo se mantiene en un medio con  $\text{NO}_3^-$  como único aporte de nitrógeno. Esta tendencia corresponde a lo encontrado en este trabajo, donde la actividad de la NR en células de *Synechococcus* sp. no fue inhibida totalmente, ya que el inóculo provenía de un cultivo con nitratos como único aporte de nitrógeno.

Los cultivos de células libres a lo largo del experimento tuvieron una mayor actividad de la NR (79% más actividad) con respecto a los cultivos de células inmovilizadas. Sin embargo, la alta actividad enzimática de los cultivos de células libres al inicio del experimento y su drástico decaimiento (85%) al día tres de cultivo, indican que la baja actividad de la NR que se obtiene con células inmovilizadas se debe a la aclimatación del cultivo al nuevo medio y no a una respuesta negativa al proceso de inmovilización. El grado de inhibición de la actividad de la NR, está influenciado por las condiciones de preacondicionamiento y concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo del que proviene el inóculo (Dortch y Conway, 1984). Sólo los cultivos de células inmovilizadas de *Synechococcus* sp. fueron acondicionados al nuevo medio de cultivo, por lo anterior, aunque la magnitud de la actividad enzimática fue diferente para células libres e inmovilizadas no está relacionada con el proceso de inmovilización, pero sí con el acondicionamiento del inóculo a las nuevas condiciones de cultivo con nitrato de amonio. El efecto del proceso de inmovilización sobre la actividad de la NR en células de cianobacterias y microalgas inmovilizadas ha sido poco estudiado, el único trabajo que se encontró es de Lau *et al.* (1998), quienes encuentran que la actividad de la NR no es afectada por el proceso de inmovilización de *Chlorella vulgaris* en carragenano. El medio de cultivo utilizado para *Chlorella* contenía nitratos como único aporte de nitrógeno, durante la fase exponencial evaluaron una síntesis de *novo* de NR. El medio de cultivo utilizado para *Synechococcus* sp. contenía nitratos y amonio como aporte de nitrógeno, por lo tanto la presencia de amonio causó una disminución de la actividad de la NR y en consecuencia no se produjo una síntesis de la NR.

## VI. Conclusiones

Las cápsulas elaboradas con quitosano al 2% y gelificadas en una solución 0.1 N de NaOH, fueron estables en términos de su forma, tamaño y consistencia.

La viabilidad de *Synechococcus* sp. inmovilizada en quitosano depende del tiempo de contacto de las cápsulas con la solución de NaOH y el espesor de la pared de la cápsula.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Synechococcus* sp. fue menor en los cultivos de células inmovilizadas en cápsulas de quitosano.

Los cultivos de células libres e inmovilizadas de *Synechococcus* sp. mantenidos a 30 °C crecieron más.

La mayor concentración de células de *Synechococcus* sp. utilizadas como inóculo aumentó el crecimiento de los cultivos de células inmovilizadas en cápsulas de quitosano. Por el contrario en los cultivos de *Synechococcus* sp. con células libres el mayor crecimiento fue con la menor concentración de inóculo.

La técnica desarrollada para la encapsulación en quitosano de células vivas de *Synechococcus* sp., permite que las células crezcan con tasas de crecimiento similares a las obtenidas para células libres. Sin embargo, en los cultivos de células inmovilizadas existe una fase de acondicionamiento de dos días, la cual no se observa en los cultivos de células libres.

La temperatura de elaboración de las cápsulas de quitosano tiene un efecto sobre la difusión iónica de las cápsulas de quitosano. Las cápsulas elaboradas a 15 °C tienen menor difusión respecto a las elaboradas a temperaturas mayores (entre 24 y 40 °C).

La tasa de crecimiento de *Synechococcus* sp. es modificada por el aporte de nitrógeno en el medio de cultivo. Los cultivos de *Synechococcus* sp. mantenidos con urea y fertilizantes agrícolas tuvieron mayor crecimiento que al suministrar amonio y nitrato de sodio.

La eficiencia de remoción de nitrógeno total por células de *Synechococcus* sp. libres e inmóviles en cápsulas de quitosano fue similar. La remoción de amonio fue mayor (25%) en células libres que en las inmovilizadas. La remoción de nitratos fue similar con células libres e inmovilizadas.

Es posible que la concentración de amonio intracelular inhiba la actividad de la enzima nitrato reductasa y en consecuencia se produzca una liberación de nitritos al medio de cultivo.

El contenido de clorofila *a* y proteínas fue mayor en células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas respecto a los de células libres. Las células de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en quitosano producen mayor cantidad de clorofila *a* debido al efecto de autosombreado. La concentración de proteínas disminuyó en ambos sistemas de cultivo después de la fase exponencial.

La respuesta fotosintética de *Synechococcus* sp. no se vio afectada por el proceso de inmovilización. La fotosíntesis máxima decreció en ambos sistemas de cultivo por el efecto de autosombreado producido por el incremento de la cantidad de células respecto al tiempo de cultivo. El efecto de autosombreado fue mayor en los cultivos de células inmovilizadas, debido a que la síntesis de pigmentos no fue suficiente para mantener el valor máximo de fotosíntesis.

La actividad de la nitrato reductasa no se vió afectada por el proceso de inmovilización de células de *Synechococcus* sp. en cápsulas de quitosano. La actividad de la nitrato reductasa disminuyó por el efecto de la concentración de amonio. La alta concentración de amonio en el medio de cultivo no inhibió la remoción de nitratos por las células de *Synechococcus* sp. mantenidas en forma libre e inmovilizada en quitosano.

La eficiencia de remoción de fósforo por las células de *Synechococcus* sp. fue más rápida que la remoción de nitrógeno para las células libres e inmovilizadas. La remoción de fósforo por las células de *Synechococcus* sp. fue de 88% al día 7 para los cultivos de células libres.

La cepa de *Synechococcus* sp. puede ser utilizada para la biorremediación de efluentes con desechos agrícolas, de cultivos acuícolas y urbanos ya que crece en distintas formas nitrogenadas.

## VII. Recomendaciones

Desarrollar una tecnología adecuada para la producción masiva de cápsulas de quitosano con células inmovilizadas.

Determinar el efecto de la temperatura de elaboración de las cápsulas respecto al crecimiento de las células inmovilizadas.

Realizar recubrimiento de las cápsulas o entrecruzamiento, para evitar ruptura de la pared por efecto del tiempo y aumento en la cantidad de biomasa microalgal.

Para tener una mayor capacidad de remoción de distintas formas de nitrógeno, fósforo y de otros compuestos, es importante realizar ensayos de co-inmovilización con distintas cepas de microorganismos.

Realizar ensayos de remoción con distintos aportes de nitrógeno y fósforo con células inmovilizadas, respecto a ensayos realizados con células en estado de limitación de nutrientes.

Evitar la producción de nitritos por células de *Synechococcus* sp., cuando esta especie sea utilizada para remoción de compuestos nitrogenados, ya que este compuesto puede ser tóxico para otros organismos.

Evaluar la actividad enzimática para nitrógeno y fósforo en células de *Synechococcus* sp. mantenidas en cultivos con distintos aportes de nutrientes.

### VIII. Literatura citada

- Abe, K., I. Matsumura, A. Imamaki y M. Hirano. 2003. Removal of inorganic nitrogen sources from water by the algal biofilm of the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 325-328 p.
- Abeyasinghe, D.H., A. Shanableh y B. Rigden. 1996. Biofilters for water reuse in aquaculture. *Water Science and Technology*. 34(11): 253-260 p.
- Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con microalgas marinas en agua sintética simulando un efluente de cultivo de camarón. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 114 pp.
- Azov, Y. y G. Shelef. 1987. The effect of pH on the performance of the high-rate oxidation ponds. *Water Science and Technology*. 19(12):381-383 p.
- Babich, H. y G. Stotzky. 1986. Environmental factors that affect the utility of microbial assays for the toxicity and mutagenicity of chemical pollutants. En: Bitton G. y B.J. Dutka (eds.). *Toxicity Testing Using Microorganisms*. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol II.10-41 p.
- Bailliez, C., C. Largeau, E. Casadevall, L.W. Yang y C. Berkaloff. 1988. Photosynthesis, growth and hydrogen production of *Botryococcus braunii* immobilized by entrapment and adsorption in polyurethane foams. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29:141-147 p.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. 293 pp.
- Beveridge, M.C.M., M.J. Phillips y D.J. Macintosh. 1997. Aquaculture and the environment: the supply of and demand for environmental goods and services by Asian aquaculture and the implications for sustainability. *Aquaculture Research*. 28:797-807 p.
- Bird, C. y M. Wyman. 2003. Nitrate/nitrite assimilation system of the marine picoplanktonic cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain WH 8103: effect of nitrogen source and availability on gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(12):7009-7018 p.

- Bough, W.A., W.L. Salter, A.C.M. Wu y B.E. Perkins. 1978. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. 1. Chemical composition, viscosity, and molecular weight distribution of chitosan products. *Biotechnology and Bioengineering*. 20:1945-1955 p.
- Boussiba, S. y A.E. Richmond. 1980. C-phycocyanin as storage protein in the blue green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*. 125:143-147 p.
- Brodelius, P. y K. Nilsson. 1980. Entrapment of plant cells in different matrices. *FEBS Letters*. 122(2):312-316 p.
- Brugnerotto, J., J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrière y M. Rinaudo. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. 42: 3569-3580 p.
- Button, D.K. 1991. Biochemical basis for whole-cell uptake kinetics: specific affinity, oligotrophic capacity, and the meaning of the Michaelis constant. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:2033-2038 p.
- Campa-Ávila, M.A. 2002. Evaluación del valor nutricional en dos especies de microalgas al ser suministradas como alimento al rotífero *Brachionus plicatilis*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 97 pp.
- Cañizares-Villanueva, R.O. y C. Casas-Campillo. 1991. Cuadernos sobre biotecnología: El papel de las microalgas en el tratamiento terciario de aguas residuales. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 61 pp.
- Carr, N.G. y B.A. Whitton. 1982. *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles. 688 pp.
- Cassidy, M., H. Lee y J. Trevors. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 16:79-101 p.
- Chen, P.H., J.H. Lin y M.H. Yang. 1994. Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. *Carbohydrate Polymers*. 37:371-382 p.
- Chen, Y.Ch. 2001. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long term storage and for application in fish culture water quality control. *Aquaculture*. 195(1-2):71-80 p.

- Cheng, Z.J., K.C. Behnke y W.G. Dominy. 2002. Effects of feather meal on growth and body composition of the juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Applied Aquaculture* 12: 57-70 p.
- Cheng, C.Y. y Y.K. Li. 2000. An *Aspergillus* chitosane with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 32:197-203 p.
- Chevalier, P. y J. de la Noüe. 1985a. Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphorus removal from wastewater. *Biotechnology Letters*. 7:395-400 p.
- Chevalier, P. y J. de la Noüe. 1985b. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and Microbial Technology*. 7:621-624 p.
- Cho, M.G. 1994. Verfahrenstechnische Auslegung einer Apparatur zur Herstellung Mikroverkapselter Biokatalysatoren mit getrennter Zuführung von Katalysatorlösung und Kapselgrundsubstanz. *Fortschritt-berichte VDI*. 108:1-140 p.
- Chopin, T., A.H. Buschmann, C. Halling, M. Troell, N. Kautsky, A. Neori, G. Kraemer, J. Zertuche-González, C. Yarish y C. Neefus. 2001. Integrating seaweeds into aquaculture systems: a key towards sustainability. *Journal of Phycology*. 37: 975-986 p.
- Clifford, H.C. 1994. Semi-intensive sensation- A case study in marine shrimp pond management. *World Aquaculture*. 25(3):6-12 p.
- Cohen, Y. 2001. Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*. 77:257-274 p.
- Collier, J.L., B. Brahmsha y B. Palenik. 1999. The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. *Microbiology*. 145:447-459 p.
- Corzo, A. y F.X. Niell. 1991. Determination of NR activity in *Ulva rigida* C. Agardh by the in situ method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 146:181-191 p.

- Cruz-Fraga, C.E. 2003. Uso de la cianobacteria *Arthrospira maxima* para remover macronutrientes de efluentes producidos por cultivos. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 83 pp.
- Daigger, G.T., G.D. Waltrip y R.L. Morales. 1988. Enhanced secondary treatment incorporating biological nutrient removal. *Journal Water Pollution Control Federation*. 60:1833-1842 p.
- Dawes, C.J. 1986. Ecología Fisiológica: Conceptos y Métodos. En *Botanica Marina*. Limusa, México. 673 p.
- de la Noüe, J y D. Proulx. 1988a. Tertiary treatment of urban wastewaters by chitosan-immobilized *Phormidium* sp. En: Stadler T, J. Mollio y M..C. Verdus. (eds.). *Algal Biotechnology*. London: Elsevier: 159-168 p.
- de la Noue, J. y D. Proulx. 1988b. Biological tertiary treatment of urban wastewater with chitosan immobilized *Phormidium laminosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29:292-7 p.
- de la Noüe, J. y N. de Pauw. 1988. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*. 6:725-770 p.
- de la Noüe, J., P. Chevalier y D. Proulx. 1990. Effluent treatment with immobilized microalgae and cyanobacteria: a critical assessment. En: Tyagi, R. D. y K. Vembu (eds.). *Wastewater Treatment by Immobilized Cells*. CRC Press, Boca Raton. 143-152 p.
- de-Bashan, L.E. y Y. Bashan. 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Research*. 38:4222-4246 p.
- Diaz-Rojas, E.I., W. Arguelles-Monal, I. Higuera-Ciapara, J. Hernández, J. Lizardi-Mendoza y F.M. Goycoolea. 2006. Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromolecular Bioscience*. 6(5): 340-347 p.
- Dierberg, F.E. y W. Kiattisimkul. 1996. Issues, impacts, and implications of shrimp aquaculture in Thailand. *Environmental Management*. 20(5): 649-666 p.
- Domínguez, A. 1999. El impacto ecológico de las granjas de camarón. *Investigación y Desarrollo*. Periodismo de Ciencia y Tecnología. <http://www.invdes.com.mx/antiores/Abril1999/htm/camaron71.html>

- Donald, K.M., D.J. Scanlan, N.G. Carr, N.H. Mann y I. Joint. 1997. Comparative phosphorus nutrition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* WH7803 and the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Plankton Reserch.* 19(12):1793-1813 p.
- Doop, M.R. 1966. Vitamin B12 and marine ecology. III. An experiment with a chemostat. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom.* U.K. 46:659-671 p.
- Dortch, Q., P.A. Thompson y P.J. Harrison. 1991. Short-term interaction between nitrate and ammonium uptake in *Thalassiosira pseudonana*: effect of preconditioning nitrogen source and growth rate. *Marine Biology.* 110:183-193 p.
- Dortch, Q. y H.L. Conway. 1984. Interactions between nitrate and ammonium uptake: variation with growth rate, nitrogen source and species. *Marine Biology.* 79:151-164 p.
- Droop, M.R. 1968. Vitamin B-12 and marine ecology: IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 48:689-733 p.
- Dubinsky, Z., R. Matsukawa y I. Karube. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology.* 2:61-65 p.
- Enander, M. y M. Hasselstrom. 1994. An experimental wastewater treatment system for a shrimp farm. *Aquaculture. INFOFISH International* 4:56-51 p.
- EVS (Environment Consultants). 2000. An evaluation of knowledge and gaps related to impacts of freshwater and marine aquaculture on the aquatic environment. Department of Fisheries and Oceans. Ottawa, ON, Canada KIA OE6. 144 pp.
- Faafeng, B.A., V.E. Donk y S.T. Källqvist. 1994. *In situ* measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae. *Journal of Applied Phycology.* 6:301-308 p.
- FAO (Food and Agricultura Organization). 2004. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. FAO. Roma, Italia. 174 pp.
- Felse, P.A. y T. Panda. 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering* 20:505-512 p.

- Fernández-Reiriz, M.J., A. Pérez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M.J. Campos y U. Labarta. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipid and fatty acids) of seven marine microalgae. *Aquaculture*. 83: 17-37 p.
- Fidalgo, J.P., A. Cid, J. Abalde y C. Herrero. 1995. Culture of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* with different nitrogen sources: growth, nutrient conversion and biochemical composition. *Cahiers de Biologie Marine* 36: 165-173 p.
- Fierro-Reséndiz, S. 2004. Utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes en efluentes de cultivos acuícolas. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 103 pp.
- Figueroa, L.F., J. Mercado, C. Jiménez, S. Salles, J. Aguilera, M.P. Sánchez-Saavedra, M. Lebert, D.P. Håder, O. Montero y L. Lubián. 1997. Relationship between bio-optical characteristics and photoinhibition of phytoplankton. *Aquatic Botany*. 59(3):237-251 p.
- Fogg, G.E. y B.J. Thake. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.
- Fogg, G.E., W.D.P. Stewart, P. Fay y E. Walsby. 1973. *The Blue-Green Algae*. Academic Press. London. 437 pp.
- Garbisu, C., D.O. Hall y J.L. Serra. 1992. Nitrate and nitrite uptake by free-living and immobilized N-started cells of *Phormidium laminosum*. *Journal of Applied Phycology*. 4:139-148 p.
- García-Fernández, J.M., N. Tandeau de Marsac y J. Diez. 2004. Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4):630-638 p.
- Green, K.D., I.S. Gil, J.A. Khan y E.N. Vulfson. 1996. Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalyst in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:535-543 p.
- Guillard, R.L.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8:229-239 p.
- Hach. 1997. *Water Analysis Handbook*. Hach Company, Loveland. 1309 pp.

- Han, Y.H., J.S. Lee, J.K. Kwak, E.H. Lee y M.G. Cho. 1999. High-cultivation of microalgae using microencapsulation. *Journal of the Korean Fishing Society*. 32:186-191 p.
- Henley, W.J. 1993. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *Journal of Phycology*. 29:729-739 p.
- Hill, S.J., J.D. Sedlacek, P.A. Weston, J.H. Tidwell, K.D. Davis y W.L. Knight. 1997. Effects of diet and organic fertilization on water quality and benthic macroinvertebrate populations in ponds used to culture freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Applied Aquaculture*. 7(3):19-32 p.
- Hillier, U.W. y R.B. Park. 1969. Photosynthetic light reactions in hemically fixed *Anacystis nidulans*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Phormidium cruentum*. *Plant Physiology*. 44:535-539 p.
- Hirano, S. 1996. Economic Perspectives of Chitin and Chitosan. 2nd. Asia Pacific Chitin Symposium. Bangkok. 22 pp.
- Hopkins, J.S., P.A. Sandifer, C.L. Browdy y J.D. Holloway. 1996. Comparison of exchange and no-exchange water management strategies for the intensive pond culture of marine shrimp. *Journal of Shellfish Research*. 15(2):441-445 p.
- Hopkins, J.S., P.A. Sandifer, M.R. DeVoe, A.F. Holland, C.L. Browdy y A.D. Stokes. 1995. Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental United States. *Estuaries*. 18 (1A):25-42 p.
- Hopkins, J.S., R.D. II Hamilton, P.A. Sandifer y C.L. Browdy. 1993. The production of bivalve mollusks in intensive shrimp ponds and their effect on shrimp production and water quality. *Journal of World Aquaculture*. 24:74-77 p.
- Howland, I. 1998. Microencapsulation of shark liver oil with a calcium alginate/chitosan coating. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana.Cuba. 204 pp.
- Jaepyoung, Ch., M.C. Heuzey, A. Bégin y P.J. Carreau. 2006. Effect of urea on solution behavior and heat-induced gelation of chitosan-b-glycerophosphate. *Carbohydrate Polymers*. 63:507-518 p.
- Jeanfils, J., M.F. Canisius y N. Burlion. 1993. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cell. *Journal of Applied Phycology*. 5:369-374 p.

- Jiménez-Montealegre, R.A. 2001. Nitrogen transformation and fluxes in fish ponds: a modelling approach. Tesis Doctoral. Wageninge Universiteit. Holland. 181 pp.
- Jones, A.B. y N.P. Preston. 1999. Oyster filtration of shrimp farm effluent, the effects on water quality. *Aquaculture Research*. 30:51-57 p.
- Jones, A.B., M.J. O'Donohue, J. Udy y W.C. Dennison. 2001a. Assessing ecological impacts of shrimp and sewage effluent: biological indicators with standard water quality analyses. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 52:91-109 p.
- Jones, A.B., N.P. Preston y W.C. Dennison. 2002. The efficiency and condition of oysters and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent. *Aquaculture Research*. 33:1-19 p.
- Jones, A.B., W.C. Dennison y N.P. Preston. 2001b. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture*. 193(1-2):155-178 p.
- Joo, D.S., M.G. Cho, J.S. Lee, J.H. Park, J.K. Kwak, Y. Ha y H. Bucholz. 2001. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation. *Journal of Microencapsulation*. 18: 567-576 p.
- Kaya, V.M. y G. Picard. 1996. Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. *Bioresource Technology*. 56:147-155 p.
- Kaya, V.M. y G. Picard. 1995. The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100% relative humidity. *Biotechnology and Bioengineering*. 46:459-464 p.
- Kierstan, M.P. J. y M.P. Coughlan. 1985. Immobilisation of cells and enzymes by gel entrapment. En: Woodward, J. (ed.). *Immobilised Cells and Enzymes: A practical approach*. Oxford: IRL Press. 39-48 p.
- Kim, S. y C. Rha. 1989. Chitosan for the encapsulation of mammalian cell culture. En: Skjåk-Bræk, G.T., Anthonsen y P. Sandford (eds.). *Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science. Trondheim, Norway. 617 pp.
- Klinkenberg, G., K.Q. Lystad, D.W. Levine y N. Dyrset. 2001. Cell release from alginate immobilized *Lactococcus lactis* sp. *lactis* in chitosan and alginate coated beads. *Journal Dairy Science*. 84:1118-1127 p.
- Kolot, F.B. 1988. Principles, techniques and industrial Applications. En: Robert, E. (ed.). *Immobilized Microbial Systems*. Krieger, New York. 206 pp.

- Koshcheyenko, K.A., M.V. Turkina y G.K. Skryabin. 1983. Immobilization of living microbial cells and their application for steroid transformations. *Enzyme and Microbial Technology*. 5:14-21 p.
- Krämer, E. y A. Schmidt. 1989. Nitrite accumulation by *Synechococcus* 6301 as a consequence of carbon or sulfur deficiency. *FEMS Microbiology Letters*. 59 (1-2):191-196 p.
- Kurger, G.H.J. y J.N. Eloff. 1978. The effect of temperature on specific growth rate and activation energy of *Microcystis* and *Synechococcus* isolates relevant to the onset of natural blooms. *Journal of the Limnological Society of Southern Africa*. 4:9-20 p.
- Lárez-Velásquez, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 4(2):91-109 p.
- Lau, P.S., N.F.Y. Tam y Y.S. Wong. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*. 18:945-951 p.
- Lau, P.S., N.F.Y. Tam y Y.S. Wong. 1998. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 63:115-121 p.
- Levasseur, M., P.A. Thompson y P.J. Harrison. 1993. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *Journal of Phycology*. 29: 587-595 p.
- Lewitus, A. y D. Caron. 1990. Relative effects of nitrogen and phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Marine Ecology Progress Series*. 61: 171-181 p.
- Lincoln, E.P. y J.F.K. Earle. 1990. Wastewater treatment with microalgae. En: Akatsuka I. (ed.). *Introduction to Applied Phycology*. The Hague: SPB Academic Publication. 429-446 pp.
- Lorenz, M., T. Friedl y J.G. Day. 2005. Perpetual maintenance of actively metabolizing microalgal cultures. En: Anderson, R.A. (ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Press. Amsterdam. 145-156 p.
- Loreto, C., N. Rosales, J. Bermúdez y E. Morales. 2003. Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. *Gayana Botánica*. 60(2): 83-89 p.

- Lourenco, S.O., E. Barbarino, J. Mancini-Filho, K.P. Schinke y E. Aidar. 2002. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: An evaluation for aquaculture. *Phycologia* 41(2): 158-168 p.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrought, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275 p.
- Maeda, S.I., M. Okamura, M. Kobayashi y T. Omata. 1998. Nitrite-specific active transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*. 180(24): 6761-6763 p.
- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*. 15:377-390 p.
- Mallick, N. y L.C. Rai. 1993. Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9:196-201 p.
- Mallick, N. y L.C. Rai. 1994. Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10:439-443 p.
- Marrie, T.J. y J.W. Costerton. 1981. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Applied Environmental Microbiology*. 42:1093-1097 p.
- Matsunaga, T., N. Noriyuki, T. Naoko y T. Hiroyuki. 1988. Selective production of glutamate by an immobilized marine blue-green alga, *Synechococcus* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology (Historical Archive)*. 28(4-5):373-376 p.
- McKnight, C.A., A. Ku, D. Sun, C. Penney y M.F.A. Goosen. 1988. Synthesis of chitosan-alginate microcapsule membranes. *Journal Bioactive and Compatible Polymers*. 3:334-355 p.
- Megharaj, M., H.W. Pearson y K. Venkateswarlu. 1992. Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology*. 14:656-658 p.
- Miranda-Baeza, A. 2005. Remoción de material particulada en efluentes de estanquería de camarón con *Anadara tuberculosa* (Pelecypoda: Arcidae) (Sowerby, 1833). Tesis de Doctorado. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 124 pp.

- Mohn, FH. 1988. Harvesting of microalgal biomass. En: Borowitzka M.A. y L.J. Borowitzka, (eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. New York, Cambridge University Press. 395-414 p.
- Msuya, F. E. y A. Neori. 2002. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: macroalgae that can biofilter effluent from tidal fishponds in Tanzania. Western Indian Ocean. *Journal of Marine Science*. 1:117-126 p.
- Neori, A., M. Shpigel y D. Ben-Ezra. 2000. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture*. 186:279-291 p.
- Neori, A., T. Chopin, M. Troell, A.H. Buschmann, G.P. Kraemer, C. Halling, M. Shpegel y Ch. Yarish. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*. 231:361-391 p.
- Nieves, M, D. Voltolina y A. Barrera. 1998. A new parameter for comparison of microalgae growth. *Rivista Italiana di Acquacoltura*. 33:177-184 p.
- Nussinovitch, A., Z. Gershon y M. Nussinovitch. 1996. Liquid-core hydrocolloid capsules. *Food Hydrocolloid*. 10(1):21-26 p.
- Ogbonna, J.C., M. Matsumura y H. Kataoka. 1991. Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameter: a review. *Process Biochemistry* 26:109-121 p.
- Omar, S.H. 1993. Oxygen diffusion through gels employed for immobilization. 2. In the presence of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40:173-181 p.
- Oswald, WJ. 1988. Micro-algae and waste-water treatment. En: Borowitzka M.A., L.J. Borowitzka, (eds.). *Micro-Algal Biotechnology*. New York, Cambridge University Press. 305-328 p.
- Pastor de Abram, A. 2004. Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones. *Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo (CYTED)*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Resultados del Proyecto CYTED IV.14: Obtención de Quitina y Quitosano a Partir de Desechos de Crustáceos. Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial. 312 pp.
- Páez-Osuna, F. 2001a. The environmental impact of shrimp aquaculture: a global perspective. *Environmental Pollution*. 112 (2):229-231 p.

- Páez-Osuna, F. 2001b. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects and mitigating alternatives. *Environmental Management*. 28(1):131-140 p.
- Páez-Osuna, F. 2005. Retos y perspectivas de la camaronicultura en la zona costera. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 1:21-31 p.
- Páez-Osuna, F., S.R Guerrero-Galván y A.C. Ruiz-Fernández. 1999. Discharge of nutrients from shrimp farming to coastal waters of the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*. 38:585-592 p.
- Palod, A., V.S. Chauhan y S.N. Bagchi. 1990. Regulation of nitrate reduction in a cyanobacterium *Phormidium uncinatum*: distinctive modes of ammonium-repression of nitrate and nitrite reductases. *FEMS Microbiology Letters*. 68:285-288 p.
- Pane, L., M. Feletti, C. Bertino y A. Carli. 1998. Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads. *Aquaculture International*. 6:411-420 p.
- Park, R.B., J. Kelly, S. Drury y K. Sauer. 1966. The Hill reaction of chloroplasts isolated from glutaraldehyde-fixed spinach leaves. *Botany*. 55: 1056-1062 p.
- Parsons, T.R., Y. Maita y C.M. Lalli. 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, Oxford. 173 pp.
- Perry, M.J., M.C. Talbot y R.S. Alberte. 1981. Photoadaptation in marine phytoplankton: Response of the photosynthetic unit. *Marine Biology*. 62:91-110 p.
- Phillips, M.J. 1998. Tropical mariculture and coastal environmental integrity. En: De Silva, S.S. (ed.). *Tropical Mariculture*. Academic Press, London. 17-69 pp.
- Phillips, M.J., C.K. Lin y M.C.M. Beveridge. 1993. Shrimp culture and the environment-lessons from the world's most rapidly expanding warm water aquaculture sector. En: R.S.V. Pullin, H. Rosenthal y J.L. Maclean (eds.). *I CLARM Conference Proceedings*. 171-197 p.
- Pirt, S.J. 1975. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific, Oxford. 137-142 p.
- Platt, T. 1981. Physiological Bases of Phytoplankton Ecology. *Dept. Fish. Oc. Bull. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 210. 145 pp.

- Polk, A.E., B. Amsden, D.J. Scarratt, A. Gonzal, A.O. Okhanafe y M.F.A Goosen. 1994. Oral delivery in aquaculture: Controlled release of proteins from chitosan-alginate microcapsules. *Aquacultural Engineering*. 13:311-323 p.
- Prezelin, B.B. y B.M. Sweeney. 1979. Photoadaptation of photosynthesis in two bloom-forming dinoflagellates. En: Taylor/Selinger. (eds.). *Toxic Dinoflagellates Blooms*. Elsevier, North Holland, Inc. 101- 106 p.
- Qiu, Y y K. Park. 2001. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 53:321-339 p.
- Rai, L.C. y N. Mallick. 1992. Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cell. *Journal World of Microbiology and Biotechnology*. 8:110-114 p.
- Renneberg, R., K. Sonomoto, S. Katoh y A. Tanaka. 1988. Oxygen diffusivity of synthetic gels derived from prepolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 28:1-7 p.
- Reyes, J.C., S. Chávez, M.I. Muro-Pastor, P. Candau y F.J. Florencio. 1993. Effect of glucose utilization on nitrite excretion by the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(9):3161-3163 p.
- Richardson, K., J. Beardall y J.A. Raven. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist*. 93:157-191 p.
- Richmond, A. 1986. Microalgae of economic potential. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton. 199– 243 p.
- Rinaudo, M., M. Milas y P. Le-Dung. 1993. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*. 15:281-285 p.
- Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman y R.Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 111: 1-61 p.
- Robinson, P.K. 1995. Effect of pre-immobilization conditions on phosphate uptake by immobilized *Chlorella*. *Biotechnology Letters* 17:659–662 p.
- Rodríguez-Sánchez, D. y C. Rha. 1981. Chitosan globules. *Journal Food Technology*. 16:469-479 p.

- Romo, S y C. Perez-martinez. 1997. The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena-galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. *Journal of Phycology*. 33:1073–1076 p.
- Sakamoto, T., V.B. Delgaizo y D.A. Bryant. 1998. Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(7):2361-2366 p.
- Sasikala, C.H. y C.H.V. Ramana. 1994 Growth and H<sub>2</sub> production by *Synechococcus* spp. using organic/inorganic electron donors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10:531-533 p.
- Schuenhoff, A., L. Mata y R. Santos. 2006. The tetrasporophyte of *Asparagopsis armata* as a novel seaweed biofilter. *Aquaculture*. 252:3-11 p.
- Skulberg, O.M., G.A. Codd y W.W. Carmichael. 1984. Toxic Blue-green algae blooms in Europe: a growing problem. *Ambio*. 11(4):244-247 p.
- Smidsrød, O. y G. Skjak-Braek. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 8:71–78 p.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H Blume Ediciones. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weigh, packed cell volume and optical density. En: J. R. Stein (ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement*. Cambridge University Press, New York. 321-343 pp.
- Spiller, H. y K.T. Shanmugam. 1987. Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain SF1. *Journal of Bacteriology*. 169(12):5379-5384 p.
- StatSoft, Inc. 2002. *Statistica for Windows [Computer program manual]*. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14<sup>th</sup> Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email:info@statsoft.com.
- Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement*. Cambridge University Press, New York. 448 pp.
- Sukenik, A., J. Bennet y P.G. Falkowski. 1987. Light saturated photosynthesis limitation by electron transport or carbon fixation?. *Biochimica et Biophysica Acta*. 891:205-215 p.

- Suzuki, I., N. Horie, T. Sugiyama y T Omata. 1995. Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. *Journal of Bacteriology*. 177(2):290-296 p.
- Syrett, P.J. 1981. Nitrogen metabolism of microalgae. En: Platt, T. (ed.). *Physiological Bases of Phytoplankton Ecology*. Dept. Fish. Oc. Bull. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 210. 182-210 p.
- Tam, N.F.Y. y Y.S. Wong. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution* 107:145-151 p.
- Tampion, J. y M.D. Tampion. 1987. *Immobilized Cells: principles and applications*. Cambridge UK: Cambridge University Press. 257 pp.
- Tamponnet, C., F. Costantino, J.N. Barbontin y R. Calvairac. 1985. Cytological behaviour of *Euglaena gracilis* cells entrapped in a calcium alginate gel. *Physiologia Plantarum*. 63:277-283 p.
- Toledo, G., B. Palenik y B. Brahamsha. 1999. Swimming marine *Synechococcus* strains with widely different photosynthetic pigment ratios form a monophyletic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12):5247-5251 p.
- Tong, Y.Z. Jing-Jiang, L. Zhensheng y A.J. Miller. 2005. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *The Plant Journal*. 41:442-450 p.
- Trevan, M.D. y A.L. Mak. 1988. Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*. 6:68-73 p.
- Turpin, D.H. 1991. Effect of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*. 27:14-20 p.
- Urrutia, I., J.L. Sierra y M.J. Llama. 1995. Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Enzyme and Microbial Technology*. 17:200-205 p.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacultural Engineering*. 4:175-190 p.
- Valenzuela-Espinoza, E., R. Millán-Núñez y F. Núñez-Cebrero. 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) culture with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*. 20:135-147 p.

- Vorlop, K.D. y J. Klein. 1987. Entrapment of microbial cells in chitosan. *Methods in Enzymology*. 135:259-268 p.
- Wang, T.H., H. Fu y Y.J. Shieh. 2003. Monomeric NarB is a dual-affinity nitrate reductase, and its activity is regulated differently from that of nitrate uptake in the unicellular diazotrophic cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain RF-1. *Journal of Bacteriology*. 185(19):5838-5846 p.
- Wanner, J. 1994. Activated sludge bulking and foaming control. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster. 156 pp.
- Waterbury, J.B., S.W. Watson, F.W. Valois y D.G. Franks. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*. 472:71-120 p.
- Weston, D.P. 1991. The effects of aquaculture on indigenous biota. En: Brune, D. E. y J. R. Tomasso (eds.). *Aquaculture and Water Quality*. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. 534-567 pp.
- Wood, A.M., R.C. Everroad y L.M. Wingard. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Anderson, R.A. (ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Press. Amsterdam. 269-286 p.
- Yang, P.Y. y M.L. Wang. 1990. Entrapment of microbial cells for wastewater treatment. En: Tyagi, R. D. y K. Vembu (eds.). *Wastewater Treatment by Immobilized Cell*. CRC Press. New York. 45-77 pp.
- Yan-Tan, E.W. y V.R. Lee. 2002. Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin. Final year research and develop of proyect. Department of Chemical Engineering. Loughborough University. United Kingdom. 68 pp.
- Yean-Chang, C.H., 2001. Long-term storage for immobilized microalgae. *The Advocate*. 12:22-23 p.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.