



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Departamento de Química

Tesis de Doctorado en Química

"Cultivo y posibles aplicaciones de una cepa de Salinas Chicas de la microalga extremófila *Dunaliella salina*"

Lic. Ana María Martínez

Directores: Dr. Rubén Hugo Freije
Dr. Jorge E. Marcovecchio

- 2008 -

PREFACIO

La presente tesis es presentada como parte de los requisitos necesarios para optar al grado Académico de Doctora en Química, de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La misma contiene los resultados obtenidos de las investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Química Ambiental, correspondiente al área III, (Química Analítica), del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur, durante el período comprendido entre el 21 de Diciembre de 2001 y el de Diciembre de 2008.

Esta tesis se desarrolló bajo la dirección de los Dres. Rubén Hugo Freije, Profesor Asociado de Química Ambiental del Departamento de Química de la UNS, y Jorge Eduardo Marcovecchio, Investigador Principal del CONICET y Encargado del Área de Química Marina del IADO.

Lic. Ana María Martínez
Departamento de Química - UNS -



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/....../..... , mereciendo la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Dres. Hugo Freije y Jorge Marcovecchio, por haber sido los primeros en creer en este proyecto y asociarse, por compartir sus experiencias, por su amistad de tantos años.

A la Dra. Patricia Leonardi por identificar las muestras un caluroso enero durante época de vacaciones, por su colaboración con la bibliografía, y su aliento.

A la Dra. Cecilia Popovich por entrenarme en el arte del conteo, por ayudarnos con las microfotografías, por su apoyo permanente y su amistad.

A los Dres. Federico Delucchi, Marcelo Pistonesi, Andrés Arias, M. Teresa Goitía y Alicia Pugliese, al Lic. Raúl Asteasuain y al Ing. Martín Negri, por facilitarnos material indispensable para el desarrollo de este trabajo.

A la Jefa Lic. Noemí Belloni, por los cationes, su amabilidad y comprensión.

A la Dra. Silvia De Marco por la bibliografía y su apoyo incondicional.

A las compañeras y compañeros del laboratorio, del IADO y de Química Analítica con quienes compartimos el esfuerzo del trabajo, el calor y el frío.

Gracias a mis Amigos

y gracias a mi Familia

por disimular mi ausencia, por el amor y la confianza, por mantenerme a salvo.

Les agradezco el sentirme acompañada en el vivir todos los días y les pido disculpas por las veces que han buscado en mí comprensión, generosidad, amabilidad ó solidaridad y no la han encontrado porque he estado mirando para adentro...

RESUMEN

Se aisló una cepa de la microalga extremófila *Dunaliella salina*, propia de las Salinas Chicas (Provincia de Buenos Aires) y se la mantuvo en cultivo con el fin de realizar diferentes ensayos para comparar su comportamiento con el que se cita en la literatura para la misma especie. Se desarrolló un medio de cultivo de muy bajo costo con agua de mar y nutrientes con el que se obtuvieron buenas tasas de crecimiento y se propone el uso de agua subterránea, que no es apta para la agricultura tradicional, de la región de Médanos como medio alternativo de cultivo.

Pudo constatarse que la cepa autóctona es carotenogénica y los niveles de glicerol que es capaz de acumular son elevados. Se establecieron las condiciones de cultivo en efluentes cloacales con regulación de pH mediante CaCO_3 proponiéndose como una alternativa para el tratamiento y revalorización de estos residuales por remoción del amonio. Se evaluó la inmovilización de la biomasa sobre discos de la esponja *Luffa cylindrica* como alternativa a los métodos tradicionales. Se establecieron las condiciones de coagulación y floculación destacando la recuperación de la biomasa de este tratamiento.

ABSTRACT

An autochthonous strain of the extremophilic algae *Dunaliella salina* was isolated from Salinas Chicas (Provincia de Buenos Aires). Cultures were sustained to compare the performance of this algae with that mentioned in the literature. A low-cost, seawater-based medium was developed yielding very good growing velocities, and another regional salty groundwater is proposed as an alternative application in the arid region of Médanos, near Bahía Blanca.

It was assessed that the local strain produces β -carotene and accumulates glycerol in considerable amounts. Cultures were carried on urban wastewater with CaCO_3 as pH-regulator, to assay its capabilities in ammonia-N removal.

Cells were also immobilized onto little disks of the vegetal sponge *Luffa cylindrica*, showing good stability and growth condition.

Coagulation and flocculation were performed giving easy recovery of the cellular biomass.

Índice

"Cultivo y posibles aplicaciones de una cepa de Salinas Chicas de la microalga extremófila *Dunaliella salina*"

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Salinas Chicas	4
<i>Dunaliella salina</i>	6
Cultivos y tolerancia a la sal de Dunaliella	11
Comportamiento osmótico de Dunaliella	11
REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO	14
Carbono	14
Nitrógeno	15
Fósforo	15
Sulfato	15
Magnesio	16
Otros Nutrientes	16
BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	20
SALA DE CULTIVOS	20
MEDIO DE CULTIVO	21
ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO	22
METODOLOGÍA ANALÍTICA	24
Clorofila "a", Feopigmentos y Carotenoides	24
Fósforo	26
Nitratos y Nitritos	27
Amonio	27
Glicerol	28
Cromo (VI)	29
CURVAS DE CALIBRADO	29

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO	34
Conteo en cámara	34
Elección de la longitud de onda	36
DEFINICIÓN DEL MODELO	39
VALORES CONTADOS Y CALCULADOS A PARTIR DE LOS MODELOS	41
CAROTENOIDES	44
Carotenogénesis en la cepa de Salinas Chicas	45
GLICEROL	52
Acumulación de glicerol en la cepa de Salinas Chicas	52
REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO	
EN EFLUENTES CLOACALES	61
Características del efluente de PTLC	62
Evaluación del crecimiento de la cepa de <i>Dunaliella</i> salina a elevadas concentraciones de amonio.	67
Aplicación a una muestra real	71
Ensayos de producción de Oxígeno	74
RECOLECCIÓN DE BIOMASA	75
Filtración	76
Floculación	76
INMOVILIZACIÓN en <i>Luffa</i> cilíndrica	84
Evaluación de la disminución de Nitratos y Fosfatos	90
Evaluación de la disminución de Amonio	92
BIOELIMINACIÓN DE Cr (VI)	94
MEDIOS DE CULTIVO ALTERNATIVOS	99
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFIA	111

Introducción

"Cultivo y posibles aplicaciones de una cepa de Salinas Chicas de la microalga extremófila *Dunaliella salina*"

INTRODUCCIÓN

Los ambientes extremos se caracterizan por tener uno o varios parámetros como temperatura, pH, presión hidrostática, irradiación solar, concentración de nutrientes, potencial redox o salinidad, con valores poco favorables para la vida de la mayoría de los seres vivos. Los organismos que viven en estos ambientes se denominan extremófilos.

En principio se pensaba en "ambientes de reducida diversidad y en los que están ausentes algunos grupos taxonómicos" (Brock, 1979). Sin embargo conforme pasan los años y los organismos extremófilos van estudiándose cada vez con mayor atención, se ha visto que su diversidad no es tan reducida (Jones y col., 1981; Oren y col., 1992, 2002; Ventosa y col., 1998; González-Toril y col., 2003; Cifuentes y col., 2003; Pedersen y col., 2004).

Los ambientes hipersalinos acuáticos se caracterizan por tener una concentración salina varias veces superior a la del agua de mar. Algunos de ellos tienen una composición similar porque sus aguas son talasosalinas, (del término griego "Thalassa", mar), indicando su origen marino, y la evaporación concentra las sales manteniendo las proporciones relativas entre ellas (Williams, 1981). Otros ambientes son de origen continental y la proporción iónica es función de las características geológicas, topográficas o climatológicas a las que están sometidos (Grant y Ross, 1986).

En Argentina a lo largo de todo el territorio se encuentran numerosas de las mencionadas cuencas de diferentes orígenes:

- ❖ Continental
- ❖ A partir de aguas termales
- ❖ Marino

Drago y Quirós (1996) han encontrado que la salinidad en lagos salinos e hipersalinos de Argentina se asocia fundamentalmente a las condiciones de evaporación más que al sustrato mineral, y por lo tanto, indirectamente se relaciona con la morfología de los cuerpos de agua.

Las salinas, salitrales, sulfateras, borateras y minas de sal se hallan en toda la franja árida del país, desde la Puna Jujeña hasta la provincia de Santa Cruz.

De algunas de ellas se extrae lo que comúnmente se denomina "sal" y que ha acompañado al hombre desde antes de la historia escrita. Esta "única piedra comestible" (Kurlansky, 2003) también acompaña la historia del sur continental siendo el primer tipo de comercio que hubo con la Araucanía (Bengoa, 2000). La sal siempre fue un elemento tan importante que su control otorgaba mucho poder y la negociación estratégica para mantener a Buenos Aires y a los españoles abastecidos, fue lo que le dio al cacique araucano Juan Calfucurá, que llegó del Mulú Mapu (país de la humedad) en 1835, apoyado aparentemente por el presidente Rosas (Zevallos, 1961), su reinado por más de 40 años en las pampas, encabezando un estado independiente con capital en Salinas Grandes.

En particular, se conocen tres lugares de origen marino en nuestro país: Triuquicó y Huitrín, cerca de Chos Malal en Neuquén, que son depósitos de halita (o sal de roca) originados en la evaporación de aguas marinas que cubrieron la región en la era Secundaria o Mesozoica; las de Colorada Grande, en el sur de La Pampa, y las Salinas Chicas y Chasicó, en el sur de la provincia de Buenos Aires, (Mogni, 1991), cuya génesis ocurrió hace unos 3000 años.

En el pleistoceno (20.000 años AP) el clima en la región del estuario de Bahía Blanca era frío y seco, y el mar se encontraba a -115m respecto del nivel actual. Iniciada la transición entre el Pleistoceno Tardío-Holoceno temprano (11.000 años AP) el clima comenzó a mostrar un incremento en la temperatura y humedad, dando lugar a un gradual ascenso del mar. A partir de los 7000 años AP el clima sigue más húmedo y más cálido y continúa el ascenso del mar hasta alcanzar los niveles actuales, y hacia los 6000 años AP el ascenso marino cubre entre 5 y 12 m por sobre el nivel actual, vinculando el actual estuario con el sector continental a través del Salitral de la Vidriera. **Fig. 1.** (Melo, 2007).

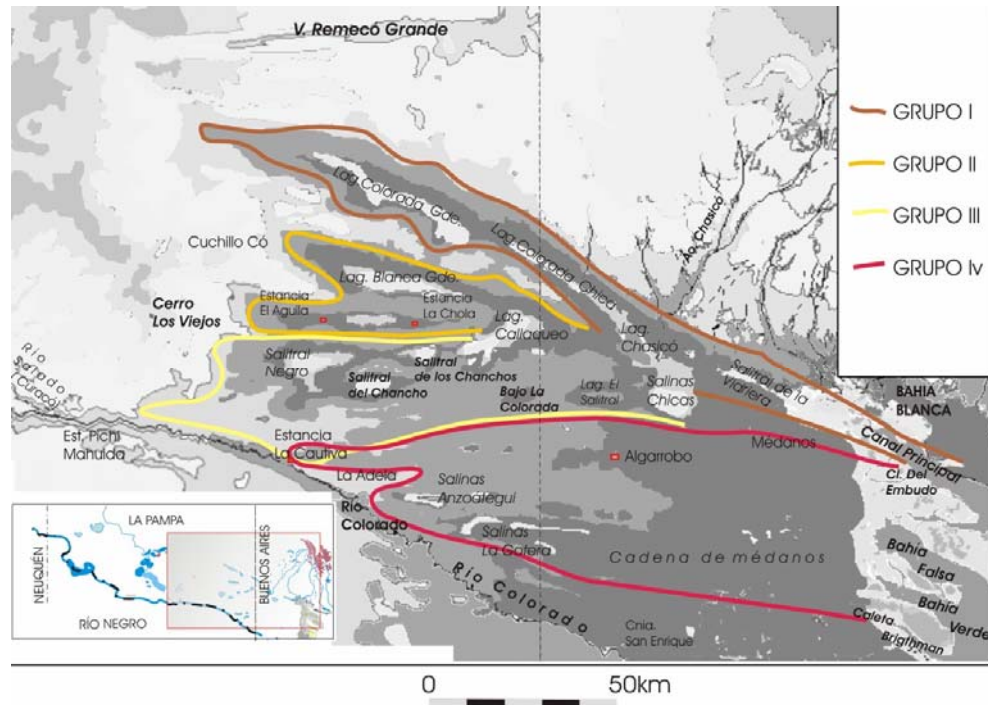


Fig. 1: Grandes depresiones, grupos de drenaje (Según Melo, 2007).

Hacia los 3000 años AP se habrían iniciado condiciones climáticas de templado-árido con características similares a las actuales, la actividad eólica generó una cadena arenosa cuya presencia determinó la división de este ambiente, en la depresión Chasicó-Salinas Chicas, generándose por un lado una laguna permanente y por el otro la extensa salina (Melo, 2007).

Es así como en una dirección SE-NO se encuentran dispuestos consecutivamente tres ambientes hipersalinos: Salitral de la Vidriera, Salinas Chicas y Laguna Chasicó. En escasos kilómetros se resumen los tres tipos de lagos salinos (Alcocer y Escobar, 1992) que se identifican de la **Fig. 2**: los de *llenado episódico*, que permanecen secos por largos períodos de tiempo llenándose en forma esporádica e impredecible, como el “Salitral de la Vidriera”; los *temporales*, que presentan un ciclo regular de desecación-llenado que corresponden a “Salinas Chicas” y los *permanentes*, que siempre tienen agua, como la laguna “Chasicó”.

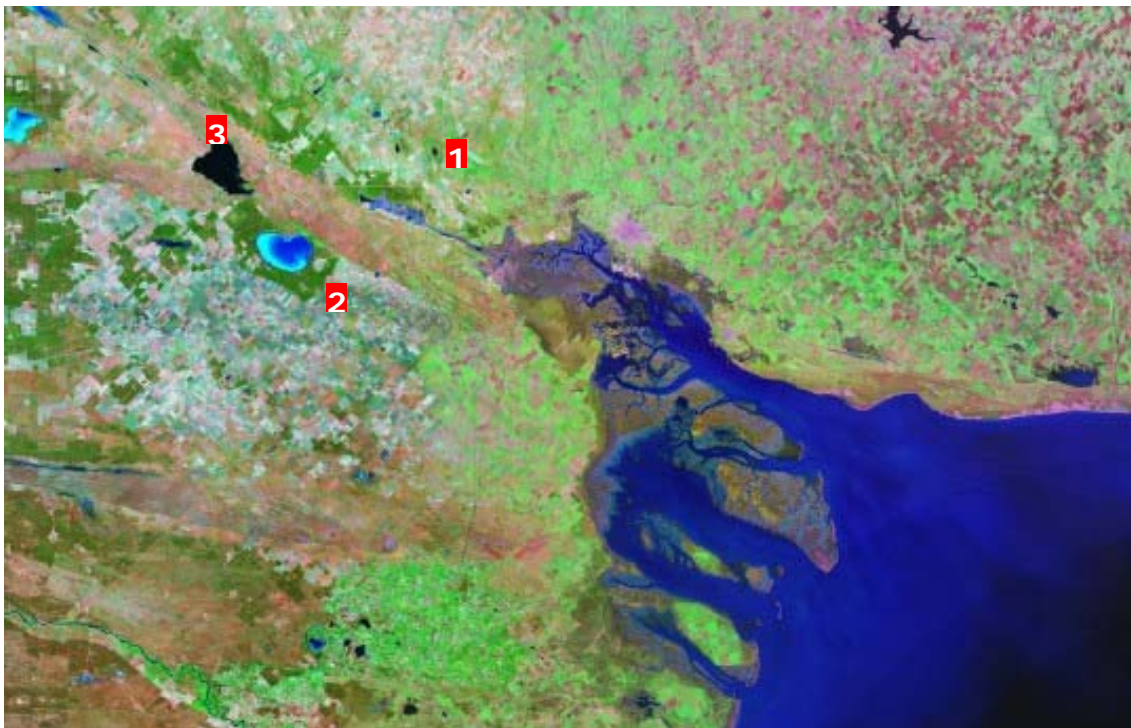


Fig. 2: Salitral de la Vidriera (1), Salinas Chicas (2) y Laguna Chasicó (3).

Salinas Chicas

Salinas Chicas es una importante depresión de la Provincia de Buenos Aires ($38^{\circ} 45' 27''$ S y $62^{\circ} 56' 44''$ O) ubicada en el actual Partido de Villarino que antiguamente formara parte del "Huecuvú Mapú" (país del diablo), a unos 50 km al oeste de Bahía Blanca. Su forma es ligeramente alargada, orientada hacia el noroeste. Tiene 40 km^2 y una reserva estimada en 20.000.000 de toneladas de NaCl 98.5% (Lefond, 1969).

A 42 m por debajo del nivel del mar, es la mayor depresión de América del Sur, explotada comercialmente para la obtención de sal de uso industrial de alta calidad, con una capa cosechable anualmente (o reserva temporaria) de 1-3 cm.

En esta salina endorreica la sal es recolectada durante el verano con unos pocos centímetros de agua que cubren parte de la zona de cosecha. Máquinas cortadoras, acordeonadoras y elevadores trabajan de sol a sol, camiones y hombres van y vienen por el terraplén y acopian en parvas la sal que distribuirán durante el resto del año. Pasado este tiempo, al llegar las lluvias la salina se llena

de agua, parte del piso salino se redisuelve, y entra en la fase de salina inundada convirtiéndose en una laguna. En la primavera comienza la fase de evaporación, aumenta la densidad de la salmuera, y se reanuda la cristalización diferencial de las sales, comenzando la formación de "sal nueva".

Para que esto sea posible "*la vida en la salina es múltiple y muy intensa representada por especies que persisten a lo largo de toda la vida de la salina y otros que se desarrollan en estrecha relación con los períodos del ciclo anual de la misma. El salinero se tranquiliza al ver el color rosa amaranto en las aguas de toda la salina. Le sigue la decoloración del agua, las bacterias han sido enclaustradas en los cristales de los estratos más abrigados junto con las algas y no quedan restos de lo que fuera arrastrado durante la fase de inundación hacia la laguna. Los seres halófilos se preparan para una vida reducida a cuerpos resistentes mientras el salinero prepara la cosecha*" (Colla, 1989).

Los fenómenos físicos de evaporación y precipitación de sales están íntimamente relacionados con los procesos biológicos que ocurren en todas las salinas, y los organismos que en ellas habitan son esenciales para la producción de la sal. (Herrmann y col., 1973; Krumbein, 1985; Davis, 1993). Coexisten allí una gran cantidad de microorganismos cuya biodiversidad depende de la variabilidad de una serie de parámetros como la salinidad, la solubilidad de oxígeno, el pH, la temperatura y composición iónica (Oren, 2002).

En ambientes cuya salinidad es superior a 3M de NaCl los microorganismos están representados fundamentalmente por arqueas incluidas en diversos géneros agrupados en la familia *Halobacteriaceae*, varias bacterias fotosintéticas del género *Halorhodospira*, la cianobacteria *Aphanocete halophytica*, y la bacteria *Salinibacter*. Los hongos están presentes con diferentes especies de los géneros *Aspergillus penicillium*, *Wallemia*, *Scopulariopsis* y *Alternaria* y el actinomiceto *Acetohalobium arabaticum*. Las levaduras están representadas por especies del género *Cladosporium* y por *Hortaea werneckii* (Sánchez-Porro, 2003).

El productor primario exclusivo en casi todos los ambientes tan extremos es la microalga del género *Dunaliella* siendo el único organismo fotosintético en lugares como el Mar Muerto y el Gran Lago Salado en Estados Unidos.

El ciclo de la salina está regido por una gran variedad de bacterias, un productor primario, *Dunaliella* sp. y un consumidor, *Artemia* sp. como último eslabón de la cadena trófica acuática.

En particular en Salinas Chicas, Barría y Parodi (comunicación personal) han informado la presencia de *Dunaliella salina* y *Dunaliella viridis*, entre otros organismos.

Dunaliella salina

El alga halotolerante del género *Dunaliella* es el microorganismo eucariota más ubicuo en ambientes hipersalinos siendo el único capaz de sobrevivir en rangos de salinidades que van desde menores a 0,1M de NaCl hasta soluciones saturadas con concentraciones superiores a 5M (Ben-Amotz y Avron 1983, 1987).

Dunaliella pertenece a la clase Chlorophyceae y al orden Volvocales. La característica morfológica de este género (en contraste con otras especies de Volvocales) es la ausencia de pared celular rígida, lo que le permite rápidos cambios de forma y volumen. (Ben-Amotz y Avron, 1973a).

El crecimiento de *Dunaliella* se da bajo complicadas interacciones de variables como temperatura, salinidad, radiación y concentración de nutrientes.

La primer descripción de una microalga biflagelada unicelular rojiza fue realizada por Michel F. Dunal en 1838, quien informó del organismo que hoy conocemos como *Dunaliella salina* encontrado en las salinas de Montpellier, sobre la costa mediterránea de Francia, y la denominó *Haematococcus salinus* y *Protococcus salinus* (Dunal, 1837). Su presentación la realizó en el marco de una investigación, invitado por la *Academie des Sciences* de París, sobre la causa de la coloración de las salmueras de la salinas. En ese momento se asumía que los responsables de la coloración eran parámetros fisicoquímicos.

En 1905 dos publicaciones presentan en profundidad la descripción de *Dunaliella* como un nuevo género: uno de E.C. Teodoresco de Bucarest, quien estudió el material colectado en un lago salado de Rumania, y el segundo escrito por Clara Hamburger de Heidelberg en Alemania, quien trabajó con muestras

traídas desde Cagliari (Cerdeña), aunque la publicación de Teodoresco precede a la de Hamburger (Oren, 2005).

A partir de entonces, gran número de especies y un gran número de variedades han sido descritas y estudiadas. Nuevas especies fueron descritas por Nicolai y Baas-Becking (1935), Lerche (1937) y Butcher (1959). Massyuk (1973a,b) examina sistemáticamente los conceptos taxonómicos y revisa comprensivamente el género reconociendo un total de 29 especies con un gran número de formas y variantes.

Han ido apareciendo algunas ambigüedades y discusiones entre autores originadas en la extraordinaria disparidad entre tamaños y formas de las distintas cepas que pueden aislarse. (Borowitzka y Siva, 2007)

El tamaño es variable dependiendo de las condiciones de crecimiento, sus dimensiones oscilan entre 8 – 25 μm de largo y 5 – 15 μm de ancho y pueden ser ovoides, periformes, alargadas o esféricas con una papila apical bien definida cuando se trata de individuos pequeños, y ovoides o elípticas con una papila pequeña o ausente en los individuos grandes (Butcher, 1959).

Las células tienen capacidad de moverse debido a la presencia de dos flagelos apicales de igual longitud de 12 μm (Avron y Ben Amotz, 1993). La ultraestructura de su aparato flagelar ha sido estudiada extensamente (Peterfi y Manton, 1968; Hyams y Chasey, 1974; Eyden, 1975; Hoshaw y Malouf, 1981; Melkonian y Preisig, 1984; Marano y col., 1985; Watanabe y Floyd, 1989; Marano, 1992), y es típica de las Chlorophyceae y Prasinophyceae.

Bajo condiciones extremas, como ocurre frente a un shock osmótico, las células pueden volverse esféricas por un tiempo antes de retornar a su forma normal.

En cultivos viejos y especialmente a bajas temperaturas se ha observado que se rodean de un mucílago de espesor variable (Oliveira y col., 1980; Melkonian y Preisig, 1984; Chardard, 1987, 1990; Leonardi y Cáceres, 1994; Hatanaka y col., 1998).

Dunaliella puede formar cistos vegetativos o aplanosporas a reducida salinidad (Hamburger, 1905; Liebetanz, 1925; Loeblich, 1969, 1972; Margulis y

col., 1980; Borowitzka y Huisman, 1993; Samanamud, 1998) y en condiciones de invierno, con días cortos y fríos (Labbé, 1925; Borowitzka y col., 1982).

Leonardi y Cáceres (1997) también informan la formación de aplanosporas en cultivos deficientes de nutrientes y envejecidos. Borowitzka y Huisman (1993) encontraron que reducida salinidad, deficiencia de N y presencia de sulfatos son las condiciones requeridas para la formación de aplanosporas. También se describe la formación de aplanosporas cuando se produce la desecación de su habitat natural (Margulis y col., 1980).

Las aplanosporas tienen una pared rugosa extremadamente resistente. (Leonardi y Cáceres, 1997). La característica más notable de esta forma celular es su diferente composición de pigmentos respecto de las células vegetativas, siendo la cantaxantina el carotenoide mayoritario en vez del β -caroteno (Loeblich, 1972). Se acumula en el citoplasma de manera similar a las aplanosporas de *Haematococcus* (Grung y col., 1992).

El género fue mencionado por primera vez en Argentina por Leonardi y Cáceres (1993) y el ciclo de vida de una cepa autóctona fue estudiado en detalle (Leonardi y Cáceres 1994, 1997).

Experimenta un complejo ciclo de vida donde se suma a la división de las células vegetativas móviles la posibilidad de la reproducción sexual inducida por factores ambientales.

Originalmente se consideraban individuos jóvenes y adultos (Teodoresco, 1905) pero parece más correcto referirse a individuos pequeños e individuos grandes y si bien los individuos grandes derivan de los pequeños (Leonardi y Cáceres, 1994), independientemente de su tamaño, ambos se reproducen por división longitudinal.

La descripción de la división vegetativa fue estudiada por numerosos autores, con algunas diferencias en las secuencias de la división nuclear, pirenoide y formación flagelar (Lerche, 1937; Marano, 1976; y Samanamud, 1998). La reproducción vegetativa se da por división longitudinal, manteniendo la movilidad celular durante el proceso de división. Comienza con una división nuclear, seguida inmediatamente por un hundimiento usualmente observado

primeramente en la parte anterior (entre los flagelos) y luego en la parte posterior de la célula. Este último se da en coincidencia con la división del cloroplasto y pirenóide hasta que las células hijas quedan conectadas únicamente por un fino puente citoplasmático localizado alrededor de la mitad de las células, crece el segundo flagelo de cada una de ellas y se separan las dos células.

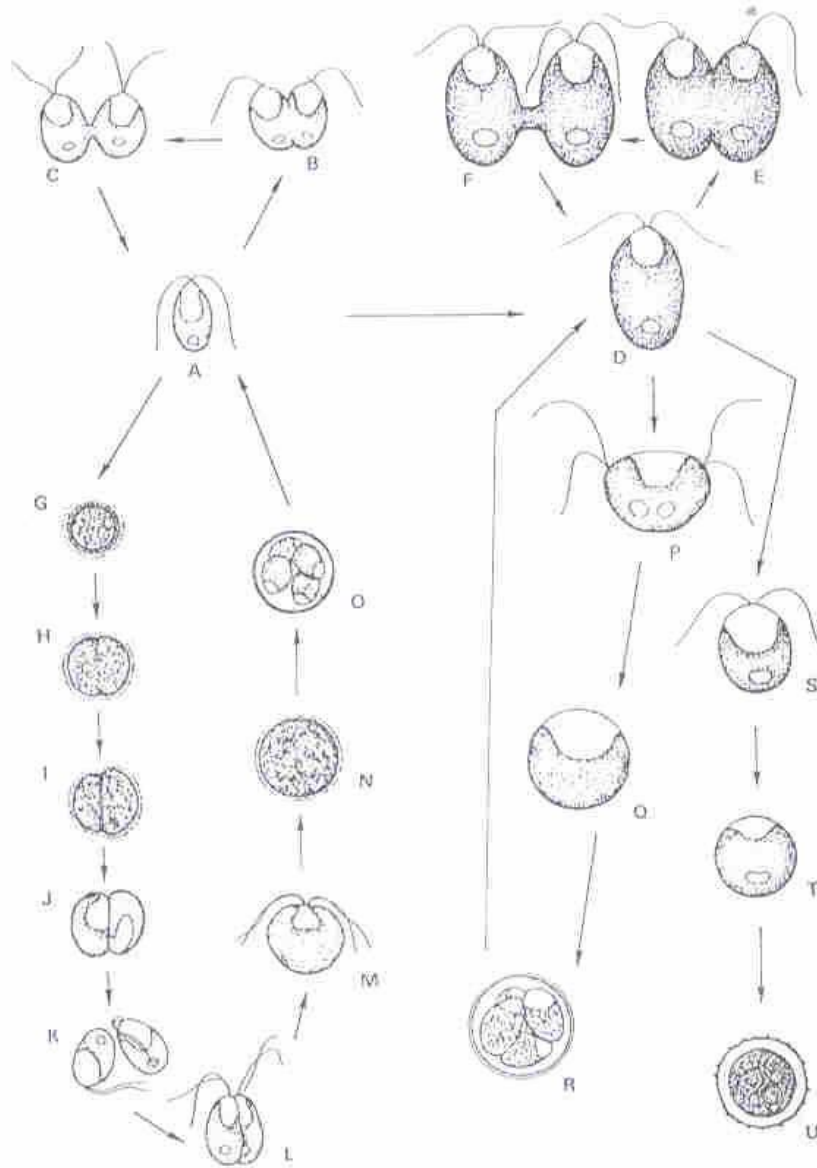


Fig. 3: Ciclo de vida de *Dunaliella salina* (Leonardi y Cáceres, 1997). A: individuo pequeño. D: individuo grande. B-C y E-F división longitudinal. G: estado palmeloide. H-K: gametogénesis. L: conjugación lateral. M-O: formación de cigoto y germinación. P: conjugación lateroposterior. Q-R: formación de cigoto y germinación. S-U: formación de cistos.

Cuando se exponen a condiciones que inducen la reproducción sexual (baja salinidad, baja temperatura o ausencia de nutrientes) ambos tipos de células responden de manera diferente. Leonardi y Cáceres (1997) observan los dos procesos de la reproducción sexual dependiendo del tamaño de los individuos involucrados en la cepa autóctona (**Fig. 3**). Los individuos grandes se conjugan directamente. La reproducción isogámica ha sido informada en trabajos de varios autores Teodoresco (1905), Hamburger (1905), Cavara (1906), Labbé (1925), Liebetanz (1925), Lerche (1937), (Massyuk, 1973c), Samanamud (1998) y Leonardi y Cáceres (1997) quienes describen el proceso en detalle.

Dos células grandes se conjugan y forman un cigoto con cuatro flagelos, luego pierde los mismos y forma una gruesa pared multicapa. Durante la germinación del cigoto se forman entre 4-8 células hijas que se liberan al romperse la pared del cigoto.

Las células pequeñas (7,8–11,7 μm de longitud y 4,7–7,8 μm de ancho) inicialmente forman un estado palmeloide. Esto ha sido observado en *Dunaliella salina*, (Teodoresco, 1906; Liebetanz, 1925; Lerche, 1937; Montoya y Olivera, 1993; Leonardi y Cáceres, 1997; Samanamud, 1998), en *Dunaliella viridis* (Artari, 1914; Baas-Becking, 1931), *Dunaliella minuta* (Massyuk, 1973c) y en *Dunaliella lateralis* (Watanabe, 1983).

En este estado la mancha ocular se desorganiza y los flagelos quedan embebidos en una capa de mucílago. Cuando las células palmeloides se pasan a un medio fresco con salinidad adecuada (>20%) normalmente vuelven a formar sus flagelos, recuperan su movilidad y adquieren la capacidad de actuar como gametos; estos son morfológicamente similares a las células vegetativas pero con el cloroplasto menos desarrollado. Los isogametos se conjugan lateralmente formando un cigoto esférico que al germinar origina de 4 a 8 nuevos individuos.

La diferencia en el proceso de reproducción sexual entre las células grandes y las pequeñas sugiere que las mismas necesitan alcanzar un cierto tamaño para ser sexualmente competentes. (Oren, 2005).

Massyuk (1973b) describe una variedad de *Dunaliella* donde el estado palmeloide es el estado dominante en la historia de vida.

Teodoresco (1905, 1906) describe dos especies: *D. Salina* como aquella que bajo determinadas condiciones sintetiza cantidades masivas de carotenoides, y *D. Viridis* como aquella que nunca produce células rojas, lo cual llevó a discusiones sobre si se trataba de dos especies ó si las células rojas y las verdes representaban diferentes formas de la misma especie.

Blanchard (1891) y Hamburger (1905) consideran a las células verdes, estadios juveniles de las rojas. Labbé (1925) es de la opinión que los diferentes colores observados son consecuencia de diferencias en la concentración salina del ambiente.

Se sabe hoy que no todas las especies de *Dunaliella* producen cantidades masivas de carotenos, y las que pueden sintetizarlo, sólo lo hacen bajo determinadas condiciones (Oren, 2005).

Cultivos y tolerancia a la sal de *Dunaliella*

Los primeros cultivos experimentales para evaluar los efectos de la salinidad sobre la velocidad de crecimiento de diferentes cepas de *Dunaliella* aisladas fueron informados en los años 1930.

Los requerimientos nutricionales fueron investigados en profundidad por Gibor (1956), Jonson y col. (1968), Van Auken y Mc Nulty (1973) y otros autores. Las concentraciones óptimas de sal varían de acuerdo a la cepa, pero se encuentra en todos los estudios que la salinidad óptima es mucho menor que las salinidades de los ambientes de donde se aislan las cepas. Esto refleja muy bien el hecho – conocido por los científicos - de que el crecimiento de un organismo ocurra en ciertos ambientes, no necesariamente indica que sea aquel que es óptimo para su desarrollo.

Comportamiento osmótico de *Dunaliella*

Las células de *Dunaliella* carecen de pared celular rígida y la célula es encerrada solamente por una fina membrana elástica de plasma. Por este motivo, la morfología de la misma es fuertemente influenciada por los cambios osmóticos.

Los primeros indicios de que *Dunaliella* acumula glicerol para lograr el balance osmótico habrían sido publicados en 1964 por Craige y McLachlan (Oren, 2005) trabajando con *D. tertiolecta*, pero el rol del mismo en la osmoregulación queda establecido por los estudios de Ben-Amotz y Avron (1973a) y Borowitzka y Brown (1974), quienes demostraron que la habilidad para crecer bajo rangos de salinidad extrema se debe a la producción de glicerol como soluto compatible. El concepto de "soluto compatible" fue acuñado por Duncan Brown para indicar solutos que no solamente contribuyen a mantener el equilibrio osmótico de la célula, sino que además mantienen intacta la actividad enzimática en condiciones de baja actividad en fase acuosa. Este conocimiento se basó fundamentalmente en el estudio de la función que ejerce el glicerol en el género *Dunaliella* (Oren, 2005).

La ausencia de pared rígida permite un ajuste rápido de la presión osmótica intracelular por flujo de agua a través de la membrana citoplasmática. Luego, lentamente la célula retoma su forma original. Durante este período de ajuste metabólico produce y acumula glicerol por encima del nivel original en condiciones hipertónicas, mientras que si se transfiere a condiciones hipotónicas el alga reduce el contenido de glicerol (Ben-Amotz, 1975; Ben-Amotz y Avron, 1983).

La osmorregulación celular puede definirse entonces como la capacidad o habilidad de la célula para mantener el volumen aproximadamente constante. La cinética de la síntesis y eliminación del glicerol durante la transición de baja a altas salinidades o viceversa indica que el proceso es muy rápido y la síntesis es independiente de la síntesis de proteínas o de la iluminación.

De esta forma el mecanismo de respuesta está siempre presente y responde rápidamente. Hay evidencia que *Dunaliella* retiene glicerol dentro de la célula especialmente a altas salinidades y por otra parte también hay evidencia de que no tendría una permeabilidad específicamente baja (Jones y Galloway, 1979).

Se ha estudiado la permeabilidad al glicerol de la membrana plasmática de *D. Parva* en el intento de comprender si minimiza el flujo saliente de glicerol mostrando una estrategia de evitarlo o si reemplaza el glicerol difundido al medio

mediante síntesis continua del mismo (Enhuber y Gimpler, 1980). Su conclusión fue que el glicerol difunde al medio y *Dunaliella* paga el costo energético de esta estrategia de tolerancia sintetizando continuamente glicerol. La velocidad varía dependiendo de la concentración externa de NaCl. Después de 1 día más del 25% del glicerol total de la suspensión algal se encuentra en el medio, mientras que a los 10 días este valor puede incrementarse hasta un 60% dependiendo de la constante de crecimiento del cultivo.

Estudios más recientes demuestran la implicancia de algunas proteínas en el proceso de osmorregulación. Dos proteínas de membrana son fuertemente inducidas con el incremento de la salinidad: una con una masa molecular de 60 kDa que es una anhidrasa carbónica duplicada internamente que se regula transcripcionalmente por la disponibilidad de CO₂ (Fisher y col., 1994, 1997), que se induce a pH alcalino, ausencia de CO₂ o alta concentración salina, y otra de 150 kDa cuyos niveles se incrementan en respuesta a altas concentraciones de sal (Sadka y col., 1991), que se trataría de una transferrina con algunas características especiales, implicada en la incorporación de hierro a la célula (Fisher y col., 1997).

Con el mejoramiento de las técnicas de identificación de proteínas, otras 76 han sido identificadas (Liska y col., 2004) y los resultados indican que *Dunaliella* responde al transferirse a altas salinidades aumentando la asimilación fotosintética de CO₂ y derivando el carbono y la energía a la síntesis de glicerol.

En la **Fig. 4** se observa un esquema de la acumulación de glicerol a distintos valores de fuerza iónica en el medio, con un componente rápido del metabolismo y otro más lento.

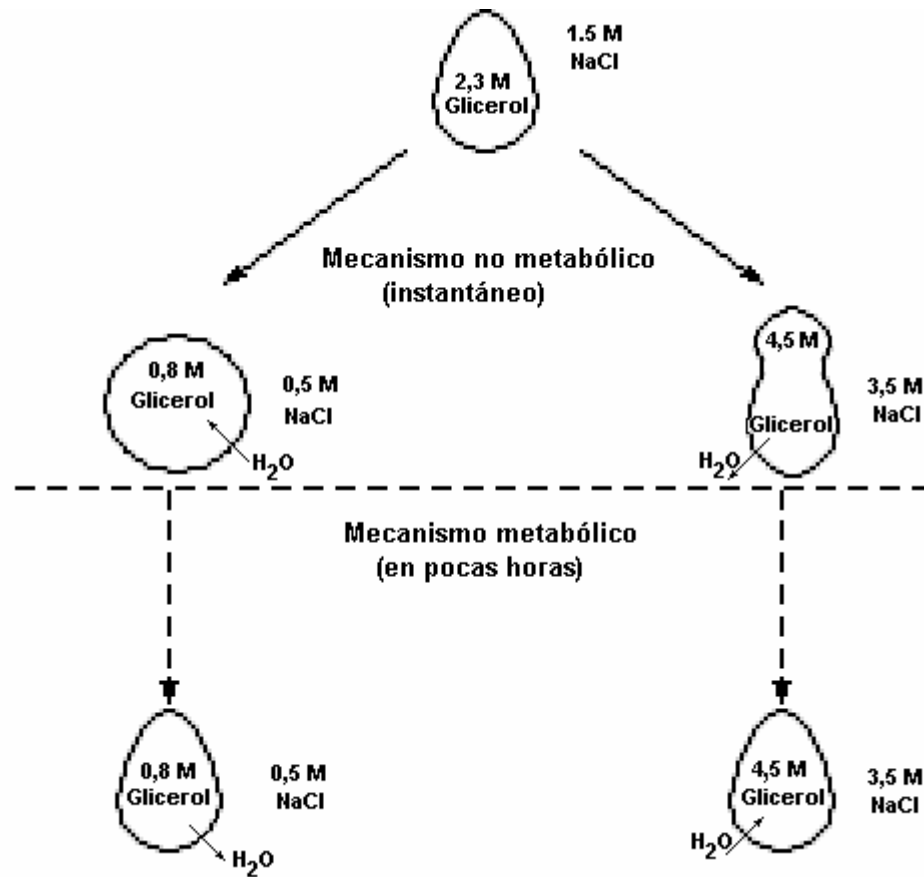


Fig. 4: Mecanismos de la acumulación de glicerol en *D. Salina*.

REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO

CARBONO

Existen múltiples evidencias de que *Dunaliella* puede utilizar tanto CO_2 como bicarbonato como fuente de carbono (Loeblich, 1972). En las condiciones naturales de los ambientes donde vive, la mayor parte del carbono aparece como carbonato. El alga tiene gran afinidad por el CO_2 ($K_m = 2\mu M$) y acumula hasta 20 veces más C inorgánico del que se encuentra en el medio gracias a la presencia de una enzima, la anhidrasa carbónica (Zenvirth y Kaplan, 1981). La adición de CO_2 ó de $NaHCO_3$, estimula el crecimiento mientras no se produzca precipitación

de carbonatos. El efecto es mayor cuando se burbujea el medio de cultivo con aire enriquecido en CO₂ (Van Auken y McNultry, 1973).

NITRÓGENO

Esta especie puede utilizar tanto nitrato, nitrito como amonio como fuente de nitrógeno. El nitrato es la fuente preferente para los cultivos obteniéndose máximas tasas de crecimiento a concentraciones próximas a 5 mM. Este nitrógeno no se almacena en forma significativa en el interior celular, cesando el crecimiento cuando se agota o deja de suministrarse (García-González y col., 2000).

FÓSFORO

Requiere concentraciones inferiores a 0,1 mM para un crecimiento óptimo. Es capaz de acumular fosfatos hasta alcanzar contenidos intracelulares de 0,5 M. Cuando las células se transfieren a un medio sin este elemento, son capaces de utilizar sus reservas durante varios ciclos de división celular antes de que el estado deficitario empiece a ser patente.

La presencia conjunta de calcio y fosfato en los estanques de cultivo, particularmente cuando el pH está por encima de 8, provoca la precipitación de fosfato cálcico disminuyendo su crecimiento (Sukenik y Shelef, 1984).

SULFATO

Requiere concentraciones en torno a 2 mM para un óptimo crecimiento. Cuando el sulfato es limitante la división celular se detiene, aumenta el tamaño de las células y estimula la acumulación de carotenos. Puesto que es abundante en el agua de mar (alrededor de 30 mM) no es necesario añadirlo. Cuando está

en altas concentraciones y en presencia de calcio puede precipitar y disminuir el crecimiento.

MAGNESIO

Se requiere aproximadamente 1 mM en el medio, sin llegar a ser tóxico incluso a 150 mM. Es capaz de acumularlo hasta valores del orden de 300 mM. El magnesio está presente en el agua de mar a una concentración próxima a 50 mM. Si el pH sube por encima de 9 puede precipitar como hidróxido o carbonato de magnesio.

OTROS NUTRIENTES

Necesita 1mM de **potasio**, pero lo acumula hasta 200 mM. El agua de mar tiene potasio a una concentración de 10 mM y por lo tanto no se necesita agregarlo.

El **calcio** se necesita en 0,1 mM (el agua de mar tiene cantidades más que suficientes, llegando hasta 10 mM).

El medio normalmente contiene FeCl_3 a una concentración de 1 mM y por último **manganeso** 5 μM , **cinc** 1 μM , **cobalto** 0,1 μM y **cobre** 0,01 μM . En cualquier medio que contenga sal comercial o agua de mar no es necesaria la adición de ninguno de estos elementos.

BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS

Las algas vienen siendo utilizadas por la Humanidad desde antes de Cristo (Chapman y Chapman, 1980) pero la primera utilización trazable de microalgas data de 2000 años atrás en la China, cuando se empleó Nostoc para sobrevivir durante una crisis alimentaria (Spolaore y col., 2006).

Desde entonces los registros indican que las microalgas se asocian fundamentalmente con producciones que tienden a suplementar la alimentación o sostener la vida de la población en diferentes circunstancias y en distintos países.

En la década de 1940 tomaron importancia ante el avance de la acuicultura, mientras que en la década de 1950 la algología aplicada se desarrolló rápida y estratégicamente en busca de nuevas fuentes de proteínas debido a que los datos estadísticos del crecimiento de la población indicaban la futura insuficiencia de alimentos (Spolaore y col., 2006).

Los cultivos comerciales a gran escala de microalgas comenzaron en Japón con el cultivo de *Chlorella* en los años 60 (Tsukada y Kawahara, 1997). En los comienzos de los años 70 comenzó el cultivo de *Spirulina* en México y también en los 70 la agencia alemana de cooperación técnica desarrolló en Perú, India, Tailandia, Egipto y Alemania Federal proyectos piloto para producir *Scenedesmus accutus* (Ayala, 2004).

La crisis energética de 1970 desencadenó el empleo de biomasa para su utilización como combustible renovable, el de *Dunaliella salina* en Australia en 1986 como fuente de β -caroteno y en el mismo año la producción de cianobacterias en India (Borowitzka y Borowitzka, 1989b). En 1990 en Estados Unidos e India se establecen varias plantas de producción de *Haematococcus pluvialis* como fuente de astaxantina (Olaizola, 2003; Spolaore y col., 2006).

Particularmente en las últimas décadas la Biotecnología ha crecido a gran velocidad, las industrias dedicadas al cultivo masivo se expandieron, se fue diversificando la producción incorporándose otras microalgas y los sistemas de cultivo se fueron desarrollando. Una característica común a las especies de algas cultivadas masivamente que crecen en ambientes altamente selectivos es que permiten su cultivo al aire libre con bajos índices de contaminación ya sea en sistemas naturales o artificiales.

Sin embargo, la mayoría de las especies de las cuales se obtienen productos de interés biotecnológico requieren el empleo de sistemas cerrados utilizando fotobiorreactores. A diferencia de los canales abiertos, éstos permiten el control del cultivo facilitando la producción de grandes cantidades de biomasa. Se han desarrollado numerosos diseños (Tredici y Materassi, 1992; Tredici,

1999; Carvalho y col., 2006) y se han publicado gran cantidad de trabajos dedicados a la optimización de cada uno de ellos, estudiando la interacción entre las variables que afectan la producción como la disponibilidad de la luz y el estrés hidrodinámico, la orientación y la mayor superficie de exposición solar (Acien Fernández y col., 1997; Contreras y col., 1998; García Camacho y col., 2000, 2001; Sánchez Mirón y col., 1999, 2000, 2003;) y el escalado de los mismos (Molina Grima y col., 2000; Barbosa, 2003).

D. salina ha sido cultivada en fotobiorreactores para obtención de β -caroteno y luteína (García González y col., 2005; Zhu y Jiang, 2008).

En los procesos biotecnológicos las células cultivadas pueden crecer libres o inmovilizadas. La inmovilización celular es definida como la limitación por medios naturales o artificiales del movimiento independiente (Tampion y Tampion, 1987). Se distinguen seis métodos: unión covalente, inmovilización por afinidad, adsorción, confinamiento en emulsión líquido-líquido, captura por membranas semipermeables y entrampamiento (Mallick, 2002), siendo este último el más frecuentemente aplicado. Se basa en el confinamiento de las células en matrices de geles tridimensionales, siendo las células libres dentro de sus compartimientos, mientras sustratos y productos difunden de y desde las células (Abdel Hameed y Hammouda, 2007).

Las matrices para inmovilizar más comúnmente empleadas son perlas de vidrio, espuma de poliuretano y esponjas de fibra de vidrio cuando la técnica de inmovilización es adsorción de las células; poliacrilamida y polímeros naturales como agar, alginato, quitosano o carragenina cuando las células son entrampadas (Vilchez y col., 1997).

La Fitorremediación comprende varias aplicaciones como la remoción de nutrientes en efluentes de distintos orígenes, la remoción de compuestos xenobióticos, el tratamiento de aguas de desecho que contienen elevadas concentraciones de metales, el secuestro de CO₂ y la detección de tóxicos empleando las algas como biosensores (Mallick, 2002; Suresh y Ravishankar, 2004; Kalin y col., 2005; Olguín, 2003; Muñoz y Guieysse, 2006).

La idea de emplear microalgas para el tratamiento de aguas residuales fue originalmente desarrollada en California por William Oswald en los años 1950 (Oswald, 1963,1988), pero sigue desarrollándose debido al creciente grado de eutroficación de las zonas costeras, reservorios últimos de las aguas de desecho urbanas, y a los altos costos de los tratamientos terciarios.

La utilización de microalgas como proveedoras de diferentes tipos de biocombustibles renovables, metano, hidrógeno y biodiesel, resurge en los últimos años con el aumento del precio del petróleo y el calentamiento global que es asociado con el empleo de combustibles fósiles (Chisti, 2007).

Las algas empleadas en aditivos alimentarios, cosmética, alimento humano y animal, pigmentos, acuicultura, en la industria química y farmacéutica, en tratamiento de efluentes y combustibles son en general todavía producidas empleando organismos no transgénicos; los progresos de los últimos años prometen un desarrollo rápido del empleo de sistemas algales modificados genéticamente. En tal sentido ha sido demostrada la expresión estable del gen antígeno superficial de la hepatitis B en *Dunaliella salina* y siendo que es empleada en nutrición, no sería necesaria la purificación del antígeno, por lo que el alga intacta podría ser empleada para proveer la vacuna (Hallmann, 2007).

OBJETIVOS

La finalidad de este trabajo comprende el desarrollo de las capacidades para el cultivo axénico de microalgas en el laboratorio de Química Ambiental y el aislamiento, caracterización, cultivo y estudio de las posibilidades de aplicación de una cepa identificada como *Dunaliella salina* de Salinas Chicas.

Material y Métodos

"Cultivo y posibles aplicaciones de una cepa de Salinas Chicas de la microalga extremófila *Dunaliella salina*"

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se tomaron muestras de agua y de sedimento de la playa de la laguna a comienzo del verano, en diciembre del 2001. Se observó en el microscopio óptico el material recolectado y se identificó la presencia de células del género *Dunaliella* en las muestras.

Para estimular el crecimiento se preparó un cultivo con agua de la misma laguna enriquecido con $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de NO_3Na y $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ manteniendo los frascos inoculados con las muestras expuestos a luz natural y temperatura ambiente. Transcurridos 10 días y apreciando un crecimiento evidente, se repicaron los cultivos transfiriéndose a medio de cultivo artificial en 4 erlenmeyers a salinidades de 5M de NaCl y concentraciones de fosfatos de $0,026 \text{ mM}$ y de nitratos de $0,5 \text{ mM}$ considerando que especies como *Dunaliella viridis* y *Dunaliella pseudosalina* no crecen o lo hacen muy pobremente a esas concentraciones de NaCl tan elevada y concentración de PO_4^{3-} y NO_3^- tan bajas. Luego de 10 días se repican manteniendo la concentración de fósforo pero empleando glicerofosfato, considerando que otras especies del género no lo asimilan y se ha demostrado que *D. Viridis* requiere mucho mayor concentración de fosfato inorgánico que *D. Salina*, lo que facilita su separación en cultivos (Cifuentes y col., 1995). Este manejo de las muestras enriquecidas en glicerofosfato se considera suficiente para obtener cultivos axénicos de *Dunaliella salina*.

SALA DE CULTIVO

Se acondicionó un espacio para ser empleado como sala de cultivos en el que se dispuso un armazón metálico con estantes de altura regulable y de fácil limpieza. Para la iluminación se preparó una serie de 8 tubos fluorescentes con opción de encendido individual, del tipo "luz día" de 40 W cada uno, separados

entre sí 3,71 cm, con una instalación eléctrica cuyo circuito pasa por un reloj control para permitir la regulación del fotoperíodo. Los tubos están dispuestos a la altura de un solo estante, para lograr máxima intensidad de luz en éste y disminución progresiva en los estantes inferiores considerando que se necesita emplear diferentes densidades de flujo fotónico: bajo para el mantenimiento de los cultivos stock, mayores para cultivos en crecimiento y máximo para experiencias de estrés.

Se emplearon erlenmeyers de distintas capacidades, tubos tipo nessler y tubos de ensayo, todos de vidrio, taponados con algodón hidrófilo, esterilizados antes de su empleo por calor húmedo y secados en estufa a 60°C durante 2 horas.

MEDIO DE CULTIVO

Para el crecimiento de los cultivos se prepararon y conservaron refrigeradas:

1. soluciones individuales de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,33M, Na_2CO_3 0,28M, NaNO_3 65,8mM, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 22,0mM y H_3BO_3 47mM.
2. solución de metales traza de composición: $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 13,5mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7,3mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,9mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,076mM, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,036mM y $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,027mM.

El medio de cultivo se preparó con 5,0 g.L⁻¹ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,6 g.L⁻¹ de KCl que se pesan directamente, 1mL.L⁻¹ de la solución de metales traza y de las soluciones individuales que resultan volúmenes adecuados para obtener una composición final de:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,50mM
Na_2CO_3	0,28mM
H_3BO_3	0,47mM

MgSO ₄ .7H ₂ O	20mM
KCl	8mM

De las soluciones de NaNO₃ y de K₂HPO₄.3H₂O se agregan volúmenes variables ya que, al igual que la cantidad de NaCl, dependen de las condiciones en que se plantee realizar el cultivo.

ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO

La evolución del crecimiento de un cultivo de microalgas puede ser estimando por el aumento en el número de células por unidad de volumen del medio de cultivo o por la velocidad de división celular.

Se busca emplear estimadores de rápida y sencilla obtención como medidas de fluorescencia *in vivo* de la suspensión celular (Sosik y Mitchell, 1994) ó medidas de absorbancia o turbidez *in vivo*. Para ello debe probarse que el aumento del indicador representa un aumento en la densidad de la población (Cifuentes y col., 1995).

La disparidad entre distintos autores en la elección de la longitud de onda para monitorear el crecimiento de microalgas del género *Dunaliella* se relaciona con los varios factores que influyen en la correspondencia de la absorbancia y el aumento de la densidad de la población. Se emplean por ejemplo: 660nm (Gómez Pincheti y col., 1992), 680nm (Roubericek y col., 1986), 490nm (Samanamud, 1998), 660 nm (Thakur y Kumar, 1999), 750nm (Singh y col., 2000), 670nm (Phadwal y Singh, 2003).

El volumen, el tamaño y la pigmentación de la población, que son características a su vez de las condiciones del cultivo, involucran variaciones en la medida de la absorbancia ó turbidez.

En este sentido, es útil obtener una curva que relacione la medida de absorbancia y la densidad celular para cada cepa bajo definidas condiciones de cultivo (Cifuentes y col., 1995).

En este trabajo se evalúa si las estimaciones de Transmitancia (T) a la longitud de onda elegida es adecuada para ser empleada como indicador de crecimiento. Se busca la mejor función que relacione la respuesta

espectrofotométrica con el número de células obtenido mediante conteo en una cámara de Sedgwick-Rafter y un microscopio binocular.

A partir de un cultivo en crecimiento en medio ASP-H (modificado) a 4 M de CINa se prepararon las muestras indicadas en la Tabla I por triplicado (A, B y C) partiendo del cultivo homogeneizado y logrando las distintas diluciones. Según el esquema de la **Fig. 5**, de cada una de las tres réplicas por dilución se leyeron las T y se fijan con solución de lugol/ácido acético en una relación de volumen 1 : 100 (lugol : muestra) para su posterior conteo.

Tabla I: preparación de las muestras para medidas de T y conteo en cámara.

Muestra	mL cultivo	mL ASP-H isotónico	dilución (%)
M8	8	0	0
M7	7	1	87,5
M6	6	2	75,0
M5	5	3	62,5
M4	4	4	50,0
M3	3	5	37,5
M2	2	6	25,0
M1	1	7	12,5

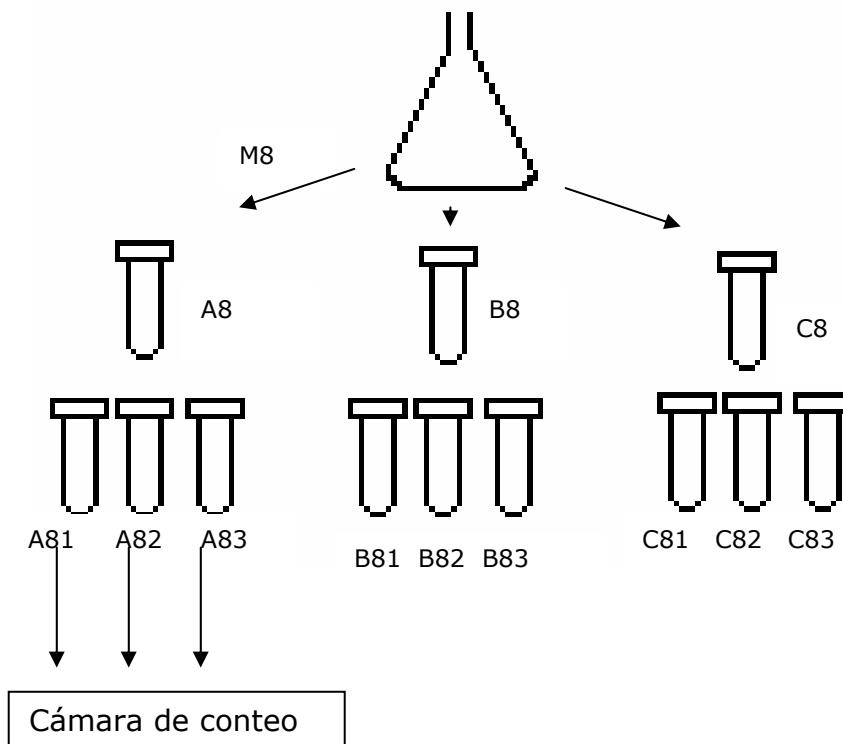


Fig. 5: esquema de preparación de muestras.

De cada submuestra se tomaron 1,00 mL y se colocaron en la cámara que tiene 1000 campos de 1mm x 1 mm que constituyen el reticulado de la misma. El número de células que se cuenta es regulado por el número de campos recorridos dentro de la cámara. Asumiendo una distribución al azar de las células se seleccionan al azar los campos a ser contados tomando el criterio de excluir toda célula que se superponga a los límites del mismo. En la bibliografía hay varios criterios sobre cuantos campos contar (McAlice, 1971). En este trabajo se contaron 50 campos de cada una de 3 cámaras para cada submuestra. De esta forma cada réplica genuina de cada dilución se estimó a través del conteo de 3 cámaras.

Un cultivo en crecimiento de *Dunaliella* tiene una densidad aproximada del orden de 10^6 células por mililitro que divididas en los 1000 campos resultaría una distribución de 1000 células por campo, muchas células para contar, por lo que aún cuando se siga agregando incertidumbre al procedimiento, no queda más alternativa que diluir, de manera que los recuentos se realizan con diluciones que van desde 1:10 a 1:100.

Finalmente se valida la función obtenida contrastando el número de células obtenido por conteo siguiendo el mismo procedimiento anterior y el estimado a través de las medidas de Transmitancia de distintos cultivos en crecimiento bajo condiciones de control intermedio.

METODOLOGÍA ANALÍTICA

Clorofila "a", Feopigmentos y Carotenoides

La determinación de clorofila y feopigmentos se realizó empleando el método de Lorenzen (1967) y la concentración de carotenoides se estimó según Strickland y Parsons (1972).

Se filtran entre 2mL y 4 mL de muestra, dependiendo de la densidad del cultivo, a través de un filtro Whatman GF/C de $0,45\mu\text{m}$ de poro y 25 mm de diámetro, tratado previamente con una suspensión al 1% (p/v) de MgCO_3 para evitar la acidificación de la molécula clorofílica. El filtro se seca con papel

absorbente y se mantiene refrigerado en desecador y en sobre de papel aluminio hasta la extracción. La extracción se realiza colocando el filtro con 6 mL de acetona al 90% adicionada con MgCO_3 , durante 24 horas, manteniendo los tubos refrigerados y al abrigo de la luz. Se filtra para clarificar el extracto y se obtiene el espectro de absorción entre 430nm y 760nm corrigiendo la línea de base con acetona 90%. Se acidifica el extracto con 2 gotas de HCl 1M y se registra la señal a 665nm y 750nm a los 3 minutos de agregado el ácido.

La clorofila se degrada naturalmente por senescencia o muerte celular en feofitina, clorofilida, etc., denominados feopigmentos. Estos productos de degradación presentan máximos de absorbancia a similares longitudes de onda que la clorofila *a*, por lo que la absorbancia a 665 nm incluye la clorofila y los feopigmentos. La clorofila "a" es susceptible de ser transformada en feopigmentos acidificando con HCl. El proceso de degradación se completa entre 1 y 3 min. La diferencia entre la absorbancia de la muestra sin acidificar y la acidificada permitirá conocer la concentración de clorofila "a" sin productos de degradación.

Para calcular la concentración de clorofila "a" y feopigmentos se utilizan las ecuaciones de Lorenzen (1967):

$$\text{Clorofila "a"} \text{ (mg.m}^{-3}\text{)} = v \times [26,7 \times (A_{665} - A_{750}) - (A_{665a} - A_{750a})] / V$$

$$\text{Feopigmentos} = v \times [26,7 \times (1,7 A_{665a} - A_{665})] / V$$

donde:

v : volumen del extracto acetónico en mL

V : volumen de cultivo filtrado en L

A₆₆₅ y A₇₅₀ : Absorbancia a 665nm y 750nm

A_{665a} y A_{750a}: Absorbancia a 665nm y 750nm después de la acidificación

La concentración de carotenoides se calcula según Strickland y Parsons (1972).

$$\text{Carotenoides(g.L}^{-1}\text{)} = (A_{480} - A_{750}) * v / V (100 * 2500)$$

Fósforo

La estimación de la concentración de fósforo se realizó como ortofosfatos sobre muestras previamente filtradas por GF/C de 0,45µm de poro, según Murphy y Riley (1962). El método empleando se basa en reacciones específicas para el ión ortofosfato, que reacciona en medio ácido con el molibdato de amonio y el tartrato de antimonil potasio para formar ácido fosfomolibdico; éste heteropoliácido es reducido por ácido ascórbico a un azul de molibdeno. Las lecturas de las señales de absorbancia se obtienen a $\lambda=885$ nm en un espectrofotómetro.

Se realizó la calibración con testigos a partir de una solución de trabajo, preparada diariamente, por dilución 1:100 de una solución estándar de PO_4^{3-} , en un rango de concentraciones de 0 a 16 µM, empleando el Reactivo Color en una proporción 10 : 1 (muestra : reactivo). El reactivo color se prepara inmediatamente antes de iniciar las determinaciones debido a que es estable por no más de 4 h. La composición del mismo es la siguiente: H_2SO_4 5N, tartrato de antimonio y potasio $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 8,21E-03M, molibdato amónico $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3,24E-02M, ácido ascórbico 0,01M y las proporciones empleadas son 5 : 1 : 2 : 2. Las soluciones individuales de cada sal se conservan refrigeradas en heladera a excepción del ácido ascórbico que se mantiene en freezer. Para esta determinación se dispuso de material de vidrio de uso exclusivo, tratado para evitar la contaminación con fosfatos, lavando todo el material con HCl diluido y caliente y enjuagado con agua destilada. Las muestras son analizadas dentro de las 24 h. y los filtros que se emplean al tomar las muestras son lavados por filtración con varias porciones de agua destilada antes de ser empleados.

La calibración se realizó en condiciones de precisión intermedias entre días y se estableció el criterio de aceptación de futuras estimaciones mediante el empleo de un blanco y 2 testigos.

Nitratos y Nitritos

La estimación de la concentración de nitratos se realizó empleando el método de reducción en columna de Cd/Cu según Strickland y Parsons (1972). El método empleado se basa en la reducción cuantitativa a nitritos al pasar la muestra acondicionada por una columna de cadmio cuperizada; los nitritos son determinados por diazotación con sulfanilamida y acoplamiento con dihidroclorhidrato de N (1-naftil)-etilendiamina para formar un colorante azo cuya concentración es proporcional a la Absorbancia obtenida a $\lambda=543$ nm.

Debido a que la especie que se cuantifica es NO_2^- , para determinar la concentración de NO_3^- se le deben restar los NO_2^- originales, que se determinan con el mismo procedimiento sin el pasaje de la muestra por la columna reductora y empleando testigos preparados a partir de una solución estándar de NO_2Na .

Blancos, testigos y muestras se acondicionan con NH_4Cl 6.5M 50 : 1 (muestra : NH_4Cl). Se pasan 3 fracciones antes de recolectar una alícuota exactamente medida de la solución eluída a la que se le agrega inmediatamente los reactivos que desarrollan color, en una proporción 12,5 : 1 : 1 (muestra : sulfanilamida : etilendiamina).

La columna de reducción se preparó según Strickland y Parsons (1972) y el proceso de calibración se realizó en condiciones de precisión intermedias con testigos de concentraciones en el rango 4 a 22 μM preparados a partir de una solución de trabajo que se obtiene diariamente por dilución 1:100 de un estándar de NO_3K .

Amonio

Para la determinación de la concentración de amonio se emplea el método basado en la reacción de Berthelot modificada por Verdouw y col. (1978) que usa el salicilato de sodio como análogo ortosustituido para el fenol según Treguer Le Corre (1975). Se fundamenta en la descomposición enzimática específica de la urea produciendo dióxido de carbono y amoníaco. Éste reacciona en medio alcalino con salicilato e hipoclorito de sodio para dar azul de indofenol.

Se emplean los siguientes reactivos: Reactivo 1 compuesto por buffer fosfatos 200 mM pH 7,0, ácido salicílico 750mM, nitroprusiato de sodio 20 mM y EDTA 10 mM; y el Reactivo 2 que es una solución de hipoclorito de sodio 10 mM en hidróxido de sodio 0,1 M. Ambos son diluidos 1 + 4 para su empleo.

Los testigos se prepararon a partir de una solución de trabajo obtenida por dilución 1 : 100 de un estándar de NH_4Cl en un rango de concentraciones de 10 a 160 μM ; los reactivos se agregan a blancos, testigos y muestras en la proporción 4 : 1 : 1 (Muestra : Reactivo 1 : Reactivo 2). Se leen y registran las Absorbancias que se obtienen a 570 nm.

Glicerol

Para estimar la concentración de glicerol se emplea la reacción de Malaprade que oxida el glicerol a formaldehído con periodato. El formaldehído reacciona con acetilacetona y amonio y se cuantifica colorimétricamente a 410nm como 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina según el método de Nash (1953).

Se emplean una solución oxidante compuesta por ácido periódico 4mM en ácido sulfúrico 0,1M, y un Reactivo Color formado por una solución buffer de acetato de amonio 5M y arsenito de sodio 190mM, y 2,4 pentanodiona. Los testigos se prepararon a partir de una solución de trabajo obtenida por dilución 1 : 100 de un estándar de glicerol en un rango de concentraciones de 0,5 a 22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; los reactivos se agregan a blancos, testigos y muestras en la proporción 2 : 1 : 6 (muestra : Oxidante : reactivo color).

La calibración se realizó en condiciones de precisión intermedias entre días y se estableció el criterio de aceptación de futuras estimaciones mediante el empleo de un blanco y 2 testigos.

Cromo (VI)

La concentración de Cromo hexavalente se determinó sobre muestras previamente filtradas por GF/C de 0,45 μ m de poro, según APHA (1989) empleando el método colorimétrico que cuantifica el Cr(VI) por lecturas de absorbancia a 540nm del compuesto coloreado que se forma en la reacción con difenilcarbazida en medio ácido (pH 1,0 \pm 0,3).

La calibración se realizó con testigos a partir de una solución de trabajo, preparada diariamente, por dilución 1 : 100 de una solución estándar de K₂Cr₂O₇, en un rango de concentraciones de 45 a 450 μ g.L⁻¹.

Los testigos, blancos y muestras se llevan a volumen con agua destilada acidulada con H₂SO₄ a pH 1 y se agrega H₃PO₄ concentrado y solución acetónica de 1,5-difenilcarbohidrazida (5mg.mL⁻¹) en proporción Muestra : H₃PO₄ : difenilcarbazida de 400 : 1 : 8.

La calibración se realizó en condiciones de precisión intermedias entre días y se estableció el criterio de aceptación de futuras estimaciones mediante el empleo de un blanco y 2 testigos.

CURVAS DE CALIBRADO

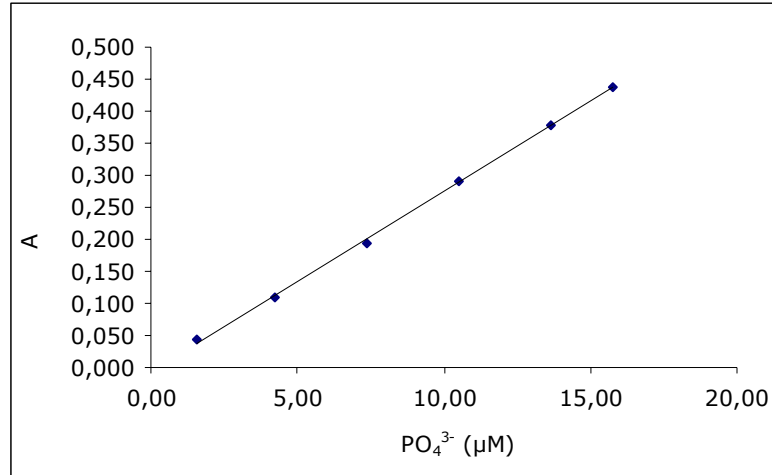
Se presentan en este punto los resultados obtenidos de las lecturas de Absorbancia promedio para los testigos, los diagrama de dispersión de las respuestas para la evaluación gráfica del ajuste de los mismos al modelo:

$y_i = \beta_0 + \beta_1x + e_i$ así como la estimación de los parámetros β_0 y β_1 y los correspondientes intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen.

En todos los casos para las futuras determinaciones de cada analito se establecen los intervalos de confianza (IC) y los de aceptación (IA) para valores de la pendiente obtenida con un blanco y dos testigos.

FOSFATOS

μ M	1,58	4,21	7,37	10,53	13,68	15,79
Medias	0,0494	0,1099	0,1991	0,2946	0,3807	0,4388
N	3	3	3	3	3	3



Parámetro	estimación	Sb _i	b _i ± tS _{b_i}
β ₀	-1,27E-03	1,59E-03	-1,27E-03 ± 3,37E-03
β ₁	2,78E-02	1,56E-04	2,78E-02 ± 3,31E-04

$t_{0,025,16} = 2,12$

$y = 0,0278 x - 0,00127$

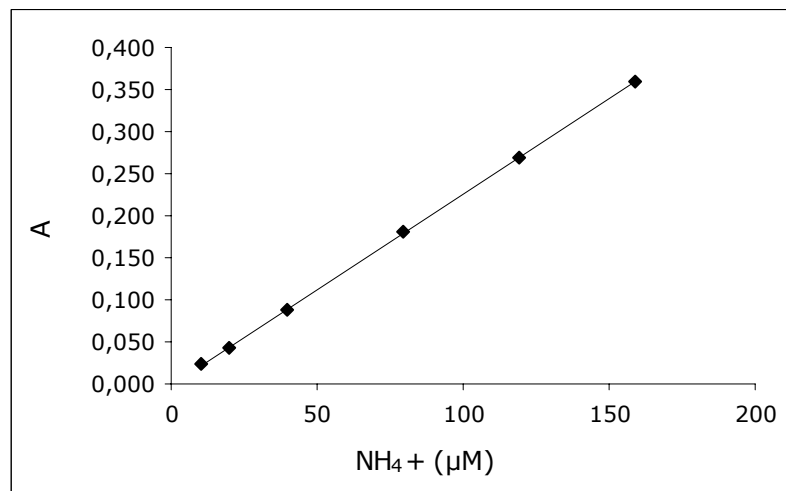
S (error estándar) = 6,74E-03

I.C. para la pendiente [0,0275;0,0282]

I.A. para la pendiente [0,027;0,029]

AMONIO

µM	9,94	19,88	39,76	79,52	119,28	159,05
Medias	0,0232	0,0433	0,0872	0,1810	0,2684	0,3605
n	3	3	3	3	3	3



parámetro	estimación	S _{b_i}	b _i ± tS _{b_i}
β ₀	-9,4E-04	4,19E-04	-9,4E-04 ± 8,9E-04
β ₁	2,27E-03	4,68E-06	2,27E-03 ± 9,9E-06

$$t_{0,025,16} = 2,12$$

$$y = 2,27 \text{ E-03 } x - 9,4\text{E-04}$$

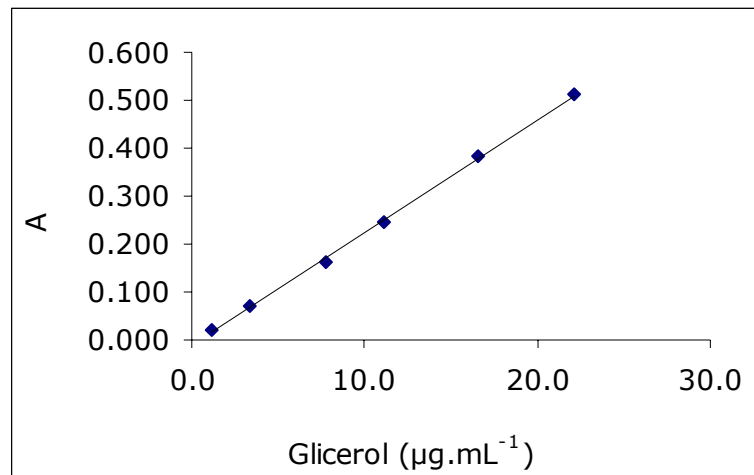
$$S \text{ (error estándar)} = 1,78\text{E-03}$$

I.C. para la pendiente [2,26E-03;2,28E-03]

I.A. para la pendiente [2,2E-03;2,3E-03]

GLICEROL

μM	1,11	3,32	7,75	11,07	16,61	22,14
Medias	0,0201	0,0701	0,1607	0,2430	0,3837	0,5107
n	3	3	3	3	3	3



parámetro	estimación	S _{b_i}	b _i ± tS _{b_i}
β ₀	-9,8E-04	1,45E-03	-9,8E-04 ± 2,5E-04
β ₁	2,34E-02	1,18E-04	2,34E-02 ± 3,2E-03

$$t_{0,025,16} = 2,12$$

$$y = 0,0234 x - 9,8\text{E-04}$$

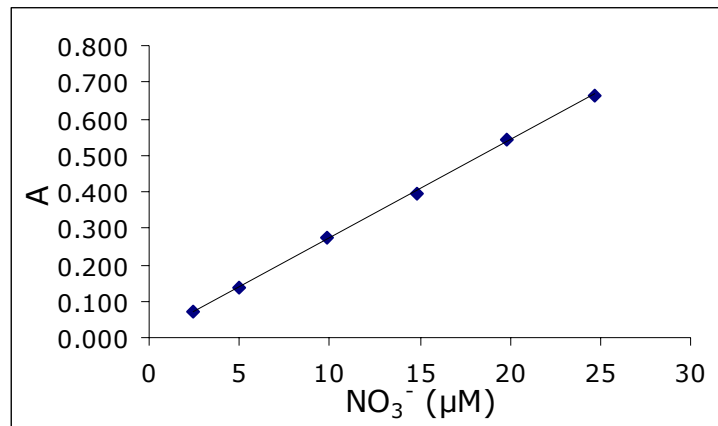
$$S \text{ (error estándar)} = 6,3\text{E-03}$$

I.C. para la pendiente [0,0231;0,0236]

I.A. para la pendiente [0,023;0,024]

NITRATOS

μM	2,473	4,947	9,893	14,841	19,787	24,734
Medias	0,0701	0,1358	0,2750	0,3968	0,5405	0,6648
n	3	3	3	3	3	3



parámetro	estimación	Sb_i	$b_i \pm tSb_i$
β_0	3,90E-03	1,17E-03	3,90E-03 \pm 2.5E-03
β_1	2,68E-02	7,85E-05	2,68E-02 \pm 1.7E-04

$$t_{0,025,16} = 2,12$$

$$y = 2,68E-02 x + 3,9E-03$$

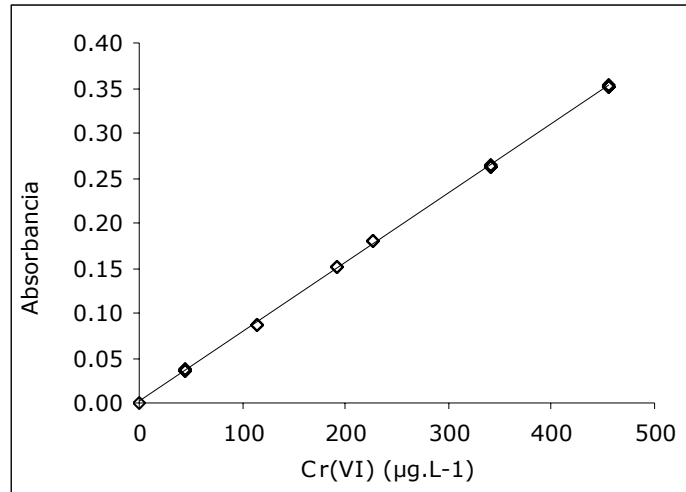
$$S \text{ (error estándar)} = 5,0E-03$$

I.C. para la pendiente [0,0266 ; 0,0270]

I.A. para la pendiente [0,0261 ; 0,0275]

CROMO (VI)

$\mu\text{g.L}^{-1}$	45,5	113,7	191,9	227,4	341,1	454,8
Medias	0,0366	0,0872	0,1510	0,1794	0,2632	0,3522
N	3	3	3	3	3	3



Parámetro	estimación	S _{b_i}	b _i ± tS _{b_i}
β ₀	1,29E-03	1,95E-03	1,29E-03±4,1E-03
β ₁	7,70E-04	7,33E-06	7,70E-04±1,6E-05

$$t_{0,025,16} = 2,12$$

$$y = 7,70E-04 x + 1,29E-03$$

$$S \text{ (error estándar)} = 8,3E-03$$

I.C. para la pendiente [7,54E-04 ; 7,86E-04]

I.A. para la pendiente [7,5E-04 ; 7,9E-04]

Resultados y Discusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO

Tal como se plantea en la INTRODUCCIÓN de esta tesis, los primeros esfuerzos estuvieron encaminados a obtener un estimador de la densidad de biomasa que reemplace los conteos en microscopio por diluciones, en cámara de Sedwich-Rafter. Con tal fin se estudió la variabilidad de los mismos y sus posibles relaciones con la simple medición de la transmitancia del cultivo a 750 nanómetros.

Conteo en Cámara

Se presentan en la **Tabla II** los resultados de los conteos realizados para el cultivo "madre" del cual se toman 3 muestras (A, B y C) como réplicas genuinas, de acuerdo al diagrama explicado anteriormente. Cada muestra se diluye 1 : 100 y se estima el número de células mediante conteo de 3 cámaras.

Tabla II: número de células estimado para el cultivo inicial.

A	B	C	prom	s
2.234.000	2.064.667	1.990.000	2.096.222	125.023

Para las diluciones realizadas a partir de este cultivo, se espera que estén relacionadas de la forma

$$N = N_0 - N_0 (d/100) + \epsilon$$

donde la variable aleatoria ϵ resultante se atribuye al error de dilución y conteo en el proceso de estimación de N_0 .

En la **Tabla III** se presentan los datos experimentales promedio obtenidos por conteo para las diferentes diluciones.

Tabla III: número de células promedio y porcentajes de dilución del cultivo inicial .

d %	N (cél.mL ⁻¹) prom
12,5	1.533.433
25,0	1.313.756
37,5	1.072.735
50,0	909.856
62,5	645.722
75,0	457.333
87,5	192.058

Puede observarse en la **Fig. 6** el gráfico de dispersión de los valores experimentales y la función del modelo predictivo para las mismas diluciones.

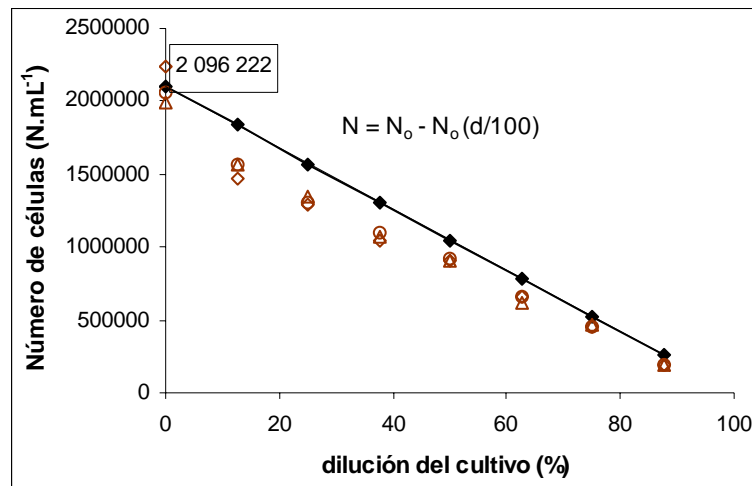


Fig. 6: valores experimentales de N (cél.mL⁻¹) y función predictiva.

Es evidente que los datos experimentales obtenidos para cada dilución no se ajustan con los esperados a partir de N_0 . Sin embargo, el conjunto de datos sugiere una apreciable relación lineal entre todos los valores excepto para $d=0\%$. Dado que la relación planteada se basa en un solo valor experimental (N_0) se puede pensar que la falta de ajuste observada se debe a un error en la estimación de N_0 . Una evidencia de esto es el gráfico obtenido al omitir el valor inicial y realizar un nuevo cálculo para los N esperados para cada dilución.

En la **Fig. 7** se presenta el gráfico correspondiente a los valores de la **Tabla III** y los valores del modelo predictivo partiendo de $N_0=1.533.433 \text{ cél.mL}^{-1}$ que corresponde a la dilución $d=12.5\%$.

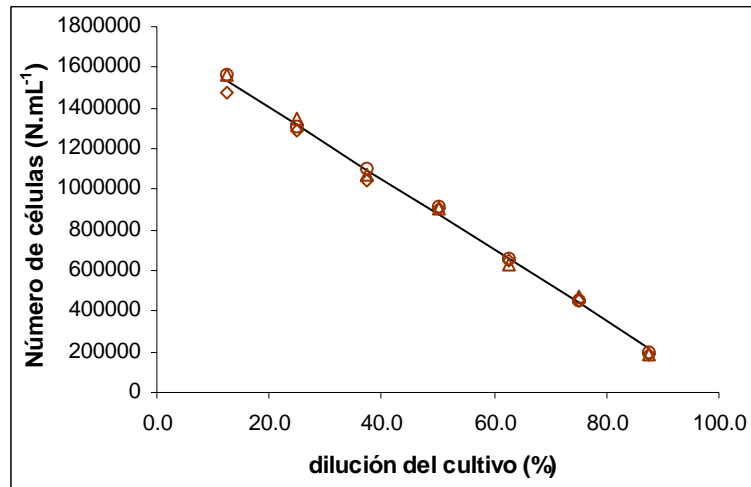


Fig. 7: Valores experimentales y esperados para N con $N_0= 1.533.433 \text{ cél.mL}^{-1}$

Elección de la longitud de onda

Mediante el análisis del espectro de absorción "in vivo" de la **Fig. 8** se eligió 750 nm como una longitud de onda donde se espera obtener una respuesta proporcional de la interferencia de la luz debida a las células en suspensión considerando que no hay en esta región absorción de los pigmentos de la biomasa.

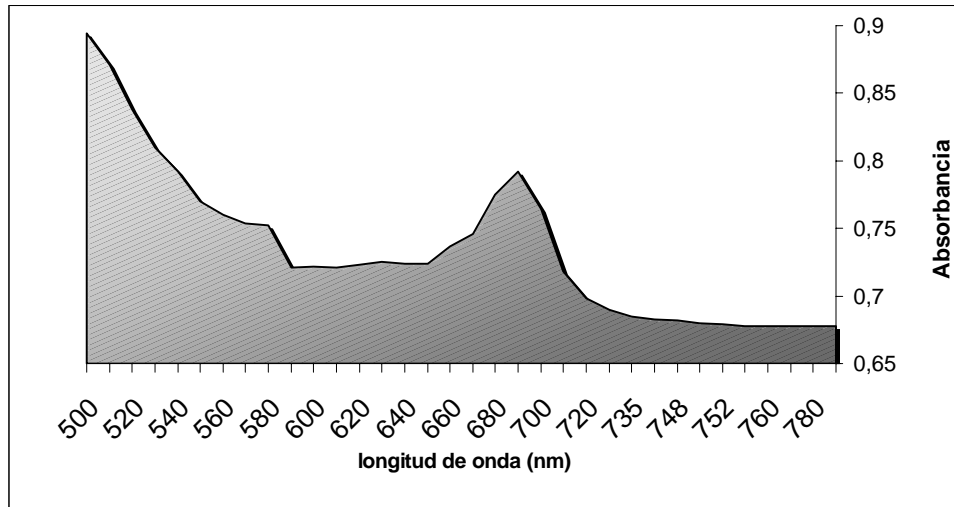


Fig. 8: Espectro de absorción *in vivo* de suspensión algal.

La **Tabla IV** presenta los resultados de la señal obtenida mediante la calibración a T= 100% empleando como blanco la matriz del medio de cultivo.

Tabla IV: Porcentajes de cultivo inicial y valores de transmitancia promedio de las réplicas a 750nm.

%d	T
12,5	0,571
25,0	0,624
37,5	0,665
50,0	0,719
62,5	0,785
75,0	0,855
87,5	0,935

Se obtuvo un gráfico diagnóstico entre las lecturas de Transmitancia de las diluciones que se aprecia en la **Fig. 9**.

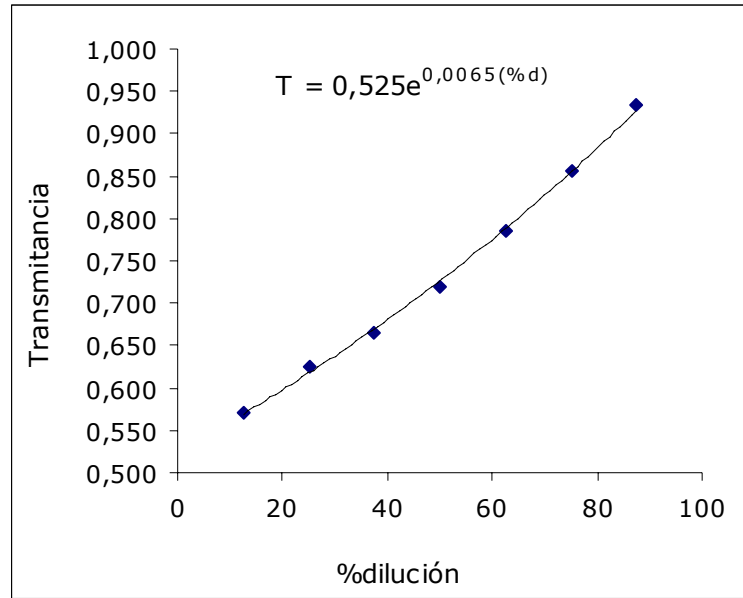


Fig. 9: valores de T promedio para cada dilución.

La linealización de la relación exponencial se realiza mediante la transformación $\log(1/T)$ de todos los datos. La dispersión de los datos así transformados se muestra en la **Fig. 10**.

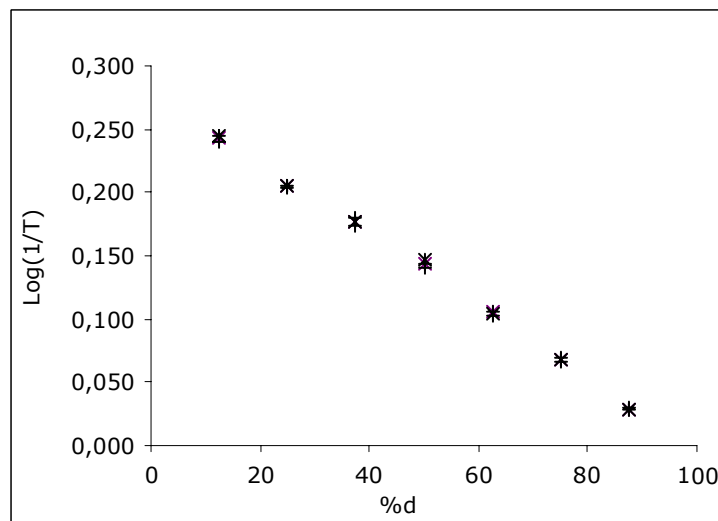


Fig. 10: linealización de la señal obtenida para las diluciones del cultivo.

DEFINICIÓN DEL MODELO

Se busca una función que relacione $\log(1/T)$ con N cuya correlación sea aceptable y que permita estimar la concentración celular a partir de medidas de transmitancia a 750 nm.

Modelo I: Se puede plantear que A , B y C corresponden a réplicas de cada dilución, sin embargo se obtienen de forma que son datos independientes por lo que se pueden emplear los 21 pares de (x,y) representados en la **Fig. 11** para la estimación de la pendiente (b_1) y de la ordenada al origen (b_0).

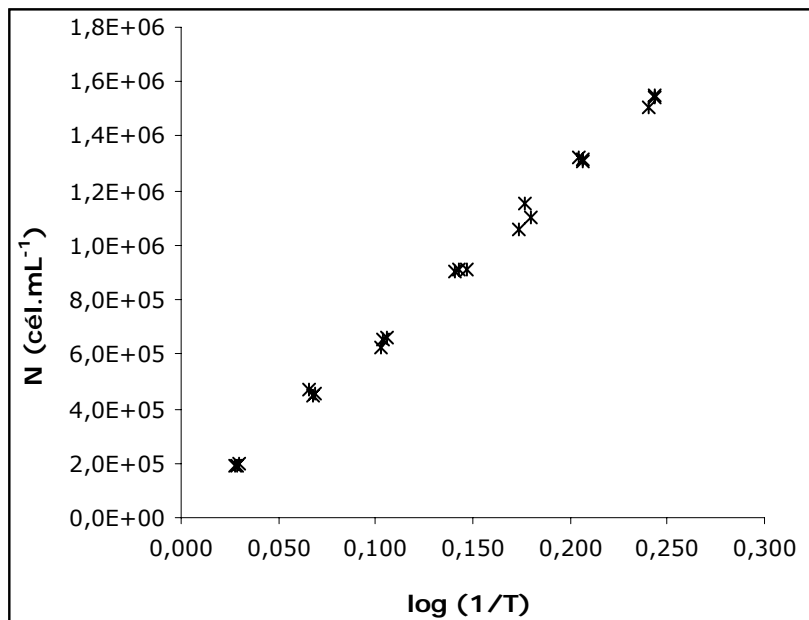


Fig. 11: Relación entre N y $\log(1/T)$ para el Modelo I.

En este caso se obtiene como ecuación para la recta:

$$y = 6.261.096 x + 12.436$$

Modelo II: Si se considera que cada punto puede representarse por 3 réplicas de $\log(1/T)$ y 3 réplicas de N , ambos ejes están sujetos a error y la regresión lineal se realiza teniendo en cuenta:

1. para el eje "x", que la relación entre las varianzas obtenidas de las réplicas experimentales de cada x_i $\text{Var}(x_i)$ es pequeña respecto de la varianza de la variable x calculada como $\text{VAR}(x) = \sum(x_i - x_m)^2 / (n-1)$, y S_{ex}/S_x es $< 0,2$ por lo que no se esperan errores significativos en la pendiente debido a x (Cornbleet y Gochman, 1979).
2. para el eje "y", que el número de réplicas ($n=3$) es insuficiente para comprobar el supuesto de homocedasticidad por lo que se plantea una regresión lineal ponderada, calculando los factores de peso según Garden y col. (1980) considerando que la varianza es errática.

En este caso se obtiene la representación que se muestra en la **Fig. 12**.

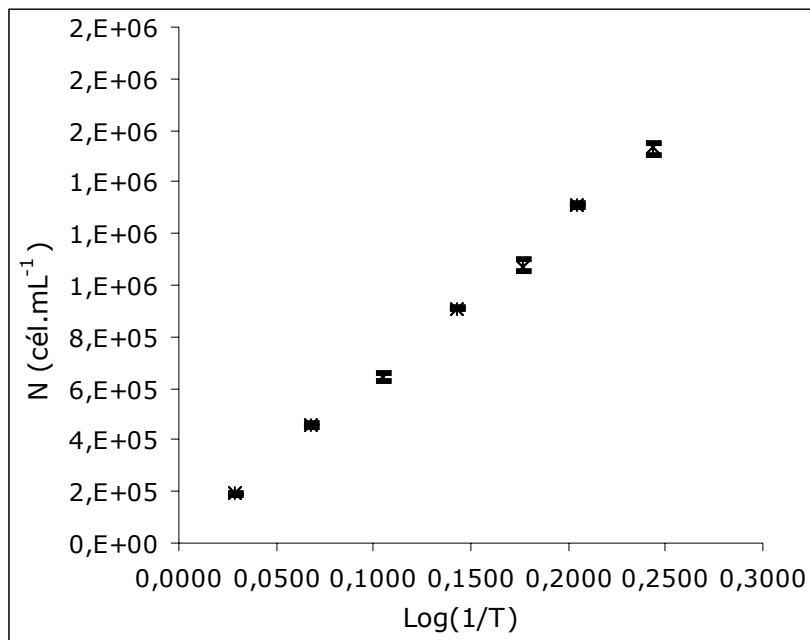


Fig. 12: Relación entre N y $\log(1/T)$ para el Modelo II.

Se obtiene de esta manera la relación:

$$y = 6.260.310 x + 11.900$$

VALORES CONTADOS Y CALCULADOS A PARTIR DE LOS MODELOS

Se obtuvieron las lecturas de transmitancia y se estimó el número de células.mL⁻¹ empleando los modelos propuestos. Se obtuvieron mediante el conteo, el número de células.mL⁻¹ de cultivos de diferentes molaridades de NaCl en diferentes etapas de crecimiento para evaluar el grado de relación lineal entre los valores determinados y los estimados por los modelos.

Los 23 pares de datos empleados se presentan en la **Tabla V**, y la representación gráfica de la distribución correspondiente al Modelo I se ilustra en la **Fig. 13**, siendo muy similar la que se obtuvo para el Modelo II.

Tabla V. Densidades contadas y calculadas por los modelos (cél. mL⁻¹)

N modelo I	N modelo II	N conteo
62.525	61.982	68.233
169.590	169.034	130.367
240.340	239.775	239.644
239.088	238.523	254.533
291.055	290.484	277.333
337.387	336.810	336.000
312.342	311.769	369.667
441.321	440.731	457.389
512.698	512.099	530.201
582.196	581.588	586.900
626.023	625.410	617.556
671.729	671.111	695.222
794.447	793.813	804.333
808.221	807.585	808.889
878.346	877.701	824.889
966.627	965.971	996.250
1.086.840	1.086.169	1.125.000
1.196.409	1.195.725	1.135.407
1.153.208	1.152.528	1.185.000
1.277.177	1.276.483	1.210.000
1.407.408	1.406.697	1.341.230
1.401.773	1.401.063	1.375.000
1.419.930	1.419.218	1.400.000

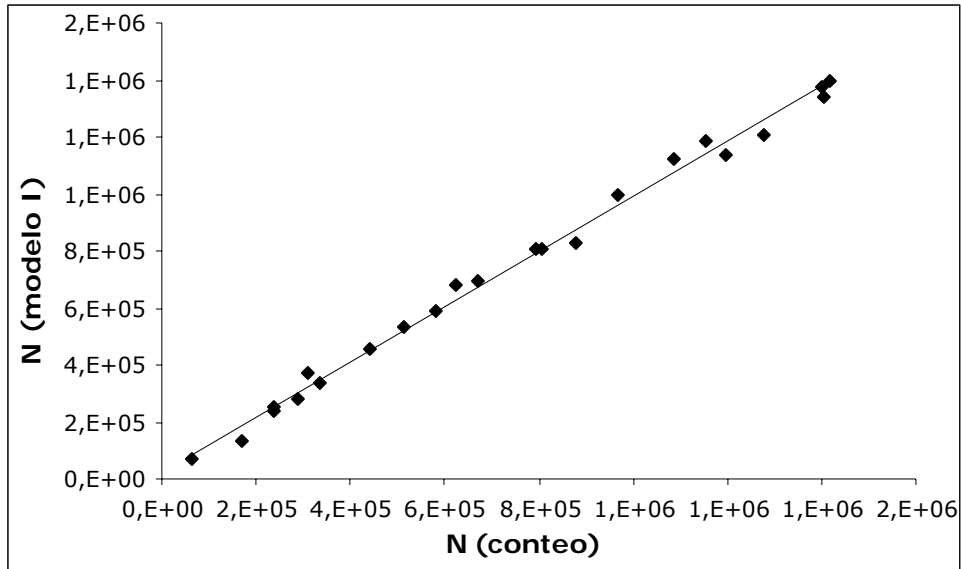


Fig. 13: Relación entre densidades contadas y calculadas por el modelo (cél.mL⁻¹).

Una gráfica de dispersión muy similar se obtiene para el modelo II.

Para comparar ambos métodos (Modelo I y conteo) se obtienen la pendiente (b_1) y la ordenada al origen (b_0) teniendo en cuenta que ambas variables contienen un término de error (Massart y col., 1997). En estos casos los coeficientes de regresión se obtienen por minimización de las distancias ortogonales a la recta (*“orthogonal distance regresion”*) mediante las expresiones:

$$b_1 = \frac{var(y) - var(x) + \text{RAIZ} [(var(x) - var(y))^2 + 4 (cov(y,x))^2]}{2cov(y,x)}$$

$$\text{y } b_0 = y_p - b_1 x_p.$$

donde:

$var(x)$ y $var(y)$ son las varianzas de las variables x e y , respectivamente y

$$cov(y,x) = (\sum(y_i - y_p)(x_i - x_p))/(n-1)$$

x_p e y_p son los valores medios de x e y , respectivamente.

Se obtiene: $b_1 = 0,9705$
 $b_0 = 19.594$

La pendiente no debiera diferir significativamente de uno, y la ordenada al origen de cero.

Para la evaluación conjunta de la ordenada al origen y la pendiente se plantean las siguientes hipótesis:

$$H_0: \beta_0 = 0 \text{ y } \beta_1 = 1$$

$$H_1: \beta_0 \neq 0 \text{ ó } \beta_1 \neq 1$$

Se calcula $F = [(\beta_0 - b_0) + 2X_m(\beta_0 - b_0)(\beta_1 - b_1) + (\sum X_i^2/n)(\beta_1 - b_1)^2] / 2S_e^2/n$

Con los valores experimentales y $\beta_0 = 0$ y $\beta_1 = 1$ se obtiene $F = 0,95$ que se compara con el valor tabulado $F_{0,05; 2, 21} = 3,47$.

Dado que el valor de F calculado es mucho menor que el tabulado se acepta la hipótesis nula, es decir la ordenada al origen "0" y la pendiente "1" caen dentro de la elipse de dispersión de puntos con un 95% de confianza.

El modelo:

$$y = 6.261.096 x + 12.436$$

puede ser empleado para obtener una estimación del número de células de un cultivo mediante lecturas de Transmitancia a 750nm *in vivo*.

Este método tiene la ventaja de ser no destructivo, lo que permite tomar tantas réplicas como se considere necesario, y obtener la información de la densidad de biomasa en cultivos entre 1M y 5 M de NaCl de forma rápida y sencilla.

CAROTENOIDES

Los carotenoides son una familia de más de 600 pigmentos orgánicos presentes en organismos fotosintéticos, hongos y bacterias; son tetraterpenoides derivados de un esqueleto de 40 átomos de carbono con enlaces alternos insaturados y son el segundo grupo de pigmentos más amplio en el planeta (Cañizares-Villanueva y col., 1998). Los no sustituidos son llamados carotenos y el término xantofilas se refiere a los carotenoides sustituidos que contienen grupos hidroxilo, ceto, metoxi, epoxi o carboxilos.

El color varía desde amarillo pálido hasta rojo oscuro relacionado con su estructura, siendo que al aumentar el número de dobles enlaces conjugados, aumenta la longitud de onda de absorción y aparece más rojizo dando diferentes colores a frutas, vegetales y otras plantas (Ben-Amotz y Fishler, 1998). Son muy empleados en la industria alimentaria, donde el color es el principal responsable de la percepción de calidad y frescura; a principios de los años 1980 se prohibió el uso de pigmentos sintéticos amarillos y rojos en los alimentos, al haberse demostrado su efecto carcinogénico en animales (Cañizares-Villanueva y col., 1998).

Alrededor de 50 de ellos son pro-vitamina A (Faure y col., 1999) y uno de los más conocidos precursores de retinol es el β -caroteno (Fuller y col., 2001). Dado que numerosos estudios señalan que el elevado consumo de carotenos disminuye el riesgo de contraer enfermedades degenerativas por su propiedad de secuestrar radicales libres, se ofrecen en el mercado una enorme cantidad de productos que contienen β -caroteno natural cuya fuente es *Dunaliella salina*. Naturalmente se encuentran los isómeros llamados todo-trans, 9-cis, 13-cis y 15-cis (Wang y col., 1994). La función de estos pigmentos en todas las plantas incluyendo las algas es prevenir la foto oxidación (Ben-Amotz y col., 1987). El β -caroteno es un componente del centro de reacción fotosintético acumulado en glóbulos lipídicos en el cloroplasto de *Dunaliella* (Vorst y col., 1994).

La mayor compañía productora del mundo es Cognis Nutrition and Health con dos plantas en Australia, una de ellas de 800 ha. de cultivo de *Dunaliella salina*, le siguen Cyanotech (Kona y Hawai, USA), Inner Mongolia Biological Eng.

(Mongolia, China), Nature Beta Technologies (Eilat, Israel), Tianjin Lantai Biotechnology (Tianjin, China) y numerosas empresas de menor envergadura (Spolaore, 2006).

Desde 1905, numerosas cepas han sido aisladas de ambientes hipersalinos de todos los continentes. El ensayo de sobreacumulación de carotenoides era empleado como una herramienta de identificación de *Dunaliella salina*, sin embargo existen numerosos informes de cepas que, cultivadas bajo condiciones de inducción de síntesis, presentan importantes diferencias en sus niveles de acumulación. La variabilidad fisiológica informada por distintos autores (Araneda y col., 1992a,b; Cifuentes y col., 1992, 1996 a,b; Markovits y col., 1993; Gómez y col., 1999; Aguilar y col., 2004; Polle y col., 2008) no permite extrapolar el potencial industrial del subgénero.

La correlación detectada entre las diferencias en la capacidad carotenogénica entre cepas y la diversidad genética entre las mismas es una clara demostración de la participación del genoma en determinar estos atributos (Gómez y González, 2004).

CAROTENOGÉNESIS en la cepa de Salinas Chicas

En este trabajo no se pretende optimizar las condiciones de inducción de carotenogénesis de la cepa aunque se obtienen algunos datos que permiten caracterizarla. Una referencia sobre las condiciones óptimas de carotenogénesis de una cepa de *Dunaliella salina* argentina ha sido informada por Miravalles y Leonardi (1999) para una cepa aislada de la laguna Guatraché (37°40'S, 63°30'O), sin embargo no hay motivos para esperar un mismo patrón dado que no es la proximidad geográfica de los ambientes de origen de las cepas suficiente para suponer características similares, como demuestran Gómez y González (2001) al comparar genéticamente cepas de ambientes próximos chilenos, y en este caso tampoco coincide el origen de las aguas de ambos ambientes.

Existe un prejuicio que surge de las observaciones de la salina en sus distintas fases, y el conocimiento de otros ambientes dominados por *Dunaliella*

altamente carotenogénica que presentan un intenso color naranja. Las Salinas Chicas muestran en sus estadios finales un color rosado, apreciado en otras salinas como la de Cagliero, al Sur de la Provincia de Buenos Aires, que se suele mantener hasta en las parvas de sal recién cosechada (ese color deriva de bacterias proteolíticas que se van eliminando en el "sangrado" de la parva, Colla, 1989). Esta diferencia que se observa lleva a plantear dos hipótesis:

- La cepa no produce carotenoides en cantidades masivas comparables a las propuestas con potencial biotecnológico en condiciones naturales, o
- La concentración de biomasa en la salina no es suficientemente alta para conferirle el color que otros investigadores observan en ambientes hipersalinos y que atribuyen a la acumulación masiva de carotenos en células de *Dunaliella salina*.

Con el fin de estudiar el comportamiento del alga en estudio, se realizaron cultivos por triplicado a 5M de NaCl y una densidad fotónica continua estimada en 280-300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se presentan en la **Tabla VI** los resultados del seguimiento de las concentraciones de nutrientes de N y P del ensayo de inducción de biosíntesis.

Tabla VI: concentraciones promedio \pm DS (n=3) de P y N en μM .

μM	Día 0	Día 3	Día 7	Día 10	Día 14
PO_4^{3-}	44,87 \pm 1,10	15,36 \pm 0,91	1,90 \pm 0,23	0,84 \pm 0,21	0,41 \pm 0,10
NO_3^-	2364,0 \pm 20,6	2056,4 \pm 21,3	1532,6 \pm 12,5	1506,4 \pm 23,5	1002,6 \pm 12,1

μM / días	17	21	24	28
PO_4^{3-}	*	*	*	*
NO_3^-	819,3 \pm 19,3	458,0 \pm 11,5	414,5 \pm 13,6	84,7 \pm 9,5

Este primer ensayo se realizó durante 28 días, y las concentraciones iniciales fueron: Cl^{a} = 128,16 \pm 8,30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y carotenoides totales = 41,50 \pm 2,50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; en la **Fig. 14** se observan las concentraciones promedio (n=3) obtenida para los 28 días de cultivo.

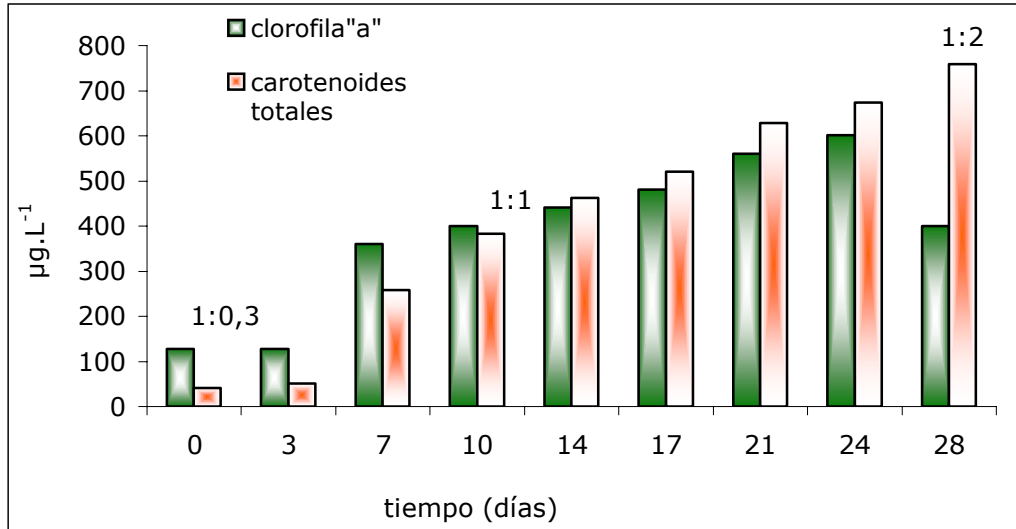


Fig. 14: concentraciones promedio (n=3) de clorofila "a" y carotenoides totales y relación Cl" a" : carotenoides totales.

El día 10 de cultivo la relación entre los dos pigmentos se hizo de aproximadamente 1 : 1 y esta proporción se mantuvo sin cambios significativos hasta el día 24, aunque las concentraciones fueran aumentando. Recién al día 28 se obtuvo 1 : 2. Estos resultados sugieren que el estrés causado por la irradiación continua y la concentración 5M de NaCl no son suficientes para provocar la acumulación de carotenoides en proporción mayor a 1 : 1, sino que la biosíntesis para alcanzar la sobre-acumulación se induce cuando además de estos factores el cultivo es deficiente en nitrógeno disponible, como se ve en la **Fig. 15**.

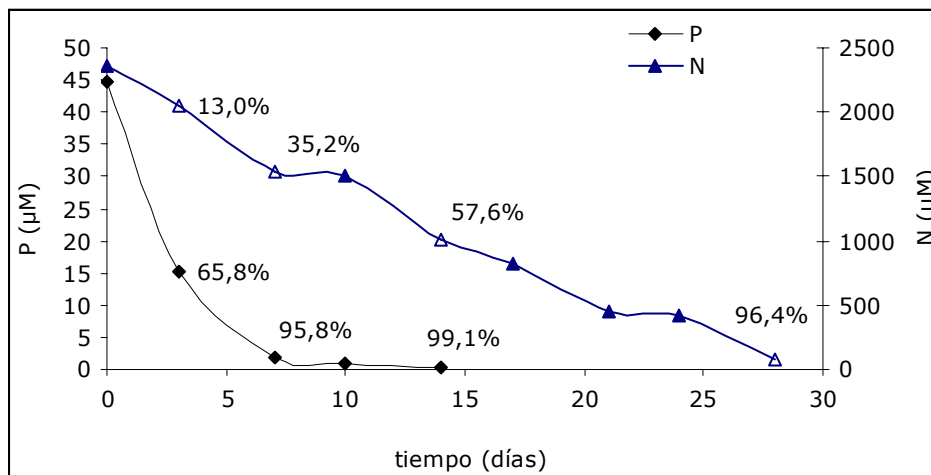


Fig. 15: Concentraciones promedio (n=3) de N y P en el medio y porcentajes de remoción respecto del inicial.

Los cultivos en "batch" en sus distintas fases, presentaron el aspecto macro y microscópico que se aprecia en la **Fig. 16**.



Fig. 16: Cultivos en distintos estadios de la carotenogénesis y microfotografías de *Dunaliella salina* en sus diversas fases.

Se realizaron ensayos en condiciones similares pero iluminando con un fotoperíodo de 12 x 12 h. La Cl^a inicial fue de 106,82 ± 8,10 µg.L⁻¹ y los carotenoides totales de 39,64 ± 1,80 µg.L⁻¹ y en la **Fig. 17** se observan las concentraciones promedio.

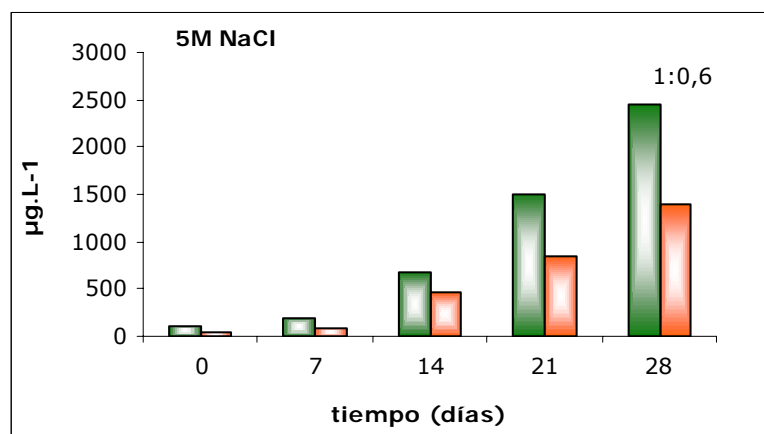


Fig. 17: Concentraciones promedio de clorofila "a", carotenoides totales y relación Cl^a : carotenoides. Fotoperíodo = 12h x12h.

En la **Tabla VII** se aprecia la diferencia que existe entre los cultivos el día 28 para las condiciones de luz continua y períodos de 12 horas de luz : 12 horas de oscuridad. Mientras que con luz continua en 28 días de cultivo la concentración de carotenoides es el doble de la de clorofila, en el tratamiento con fotoperíodo en condiciones comparables la concentración de carotenoides es apenas mayor a la mitad de la de clorofila^a. Esto pone en evidencia la influencia del estrés lumínico en la composición relativa de los pigmentos.

Tabla VII: Concentración promedio de pigmentos al inicio y a 28 días, con y sin fotoperíodo.

µg.L ⁻¹	día 0		día 28	
	fotoperíodo	luz continua	fotoperíodo	luz continua
Cl ^a	106,80	128,16	2456,40	400,50
Carotenoides	39,64	41,50	1400,04	759,35

Por otra parte, considerando los valores iniciales en cada condición de luz, se puede apreciar la inhibición de la fotosíntesis y la disminución del crecimiento de los cultivos.

Con el objeto de analizar el comportamiento a diferentes condiciones de fuerza iónica se realizaron distintos ensayos. En la **Fig. 18** se muestra la evolución de un cultivo a 1M de NaCl con fotoperíodo de 12 x 12h.

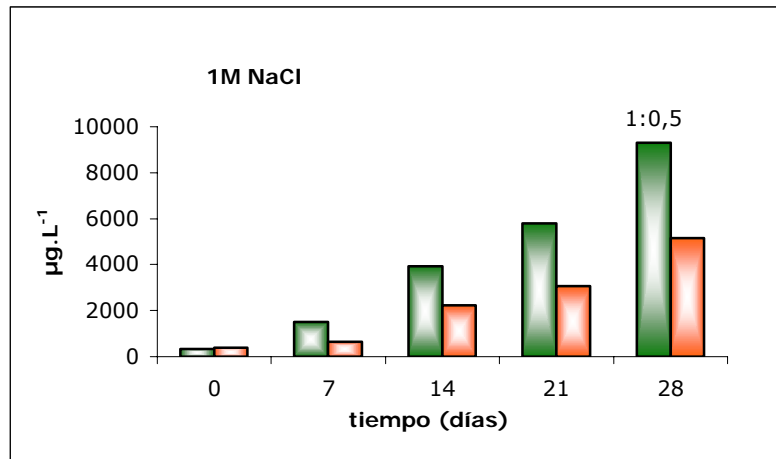
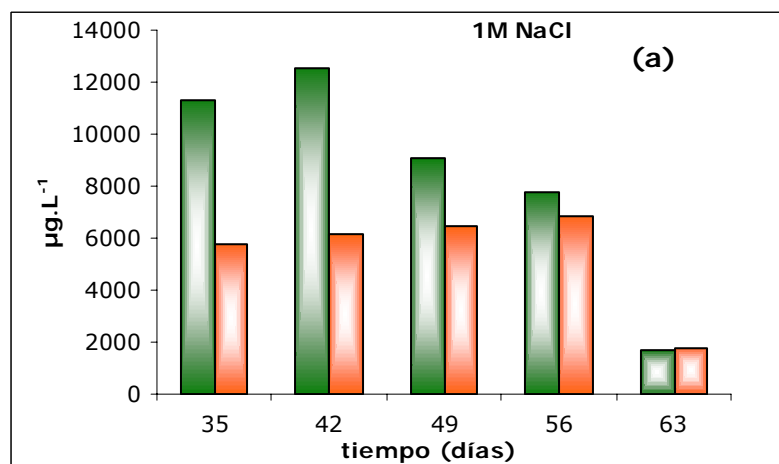


Fig. 18: Concentraciones promedio de clorofila "a", carotenoides totales y relación Cl"a" : carotenoides. Fotoperíodo 12 x 12h.

Para el día 28 la relación Cl"a" : carotenoides totales indica que a 1M de NaCl la clorofila "a" es el doble que la concentración de los carotenoides y la relación es muy similar que a 5M con una diferencia a favor de los carotenoides del 10%.

Los cultivos con fotoperíodo 12 x 12h requieren varias semanas más de cultivo para alcanzar una relación 1 : 1, como puede verse en las **Fig. 19(a)** y **(b)**, que continúan las **Fig. 17** y **18**.



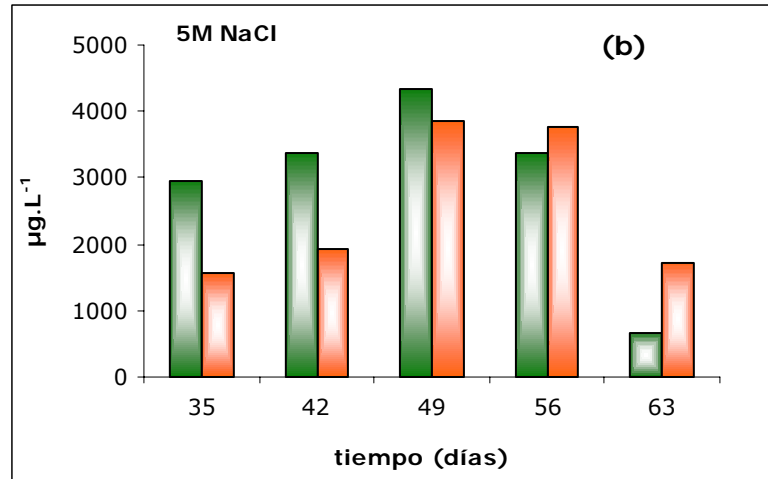


Fig. 19: Concentraciones promedio de clorofila "a", carotenoides totales y relación Cl^a : carotenoides. Fotoperíodo 12 x 12h (a) 1M y (b) 5M de NaCl.



En la fotografía se observan los cultivos a varias concentraciones de NaCl (1M, 2M, 3M, 4M y 5M) bajo régimen de 12 horas luz : 12 horas oscuridad.

Resumiendo los resultados de estos ensayos, y en relación con las hipótesis planteadas al comienzo, puede afirmarse que:

- La cepa propia de las Salinas Chicas es decididamente carotenogénica y es capaz de acumular concentraciones importantes de pigmentos carotenoides, como se observa en las fotografías.

- El hecho de no observarse el color característico en el sistema natural puede responder a que no se alcancen densidades celulares suficientes como para producirlo, y esto seguramente ligado al corto tiempo de duración de la fase de "salina en saturación", comparado con el que es necesario para sobreacumular el caroteno. También pueden contribuir a un control de la biomasa las considerables densidades de *Artemia sp.*, el natural predador del alga, que se observan en los estadios finales del ciclo, y cuyos cistos son cosechados en abundancia en las playas de la salina.

GLICEROL

El glicerol es un polialcohol que es empleado en diferentes industrias en grandes cantidades principalmente en cosmética, farmacéutica, tabaco, alimentos y bebidas, textiles, explosivos y otros.

La producción biotecnológica incluye el empleo de varios microorganismos tales como bacterias, levaduras, mohos y microalgas. La desventaja de los procesos fermentativos usando bacterias, hongos y mohos reside en la dificultad en la recuperación del producto del medio de cultivo (Tahezadeh y col., 2002).

Diferentes especies del género *Dunaliella* sintetizan, movilizan y acumulan cantidades variables de glicerol, dependiendo de la concentración de NaCl del medio de cultivo, y ha sido reiteradamente sugerido como un buen producto secundario en el cultivo de *Dunaliella* (Oren, 2005; Ginzburg y Ginzburg, 1993 ;Kaçka y Dönmez 2008). El proceso es económica y tecnológicamente posible con costos de producción competitivos siendo la energía requerida mucho menor que la de los procesos petroquímicos y fundamentalmente es una alternativa para minimizar la dependencia de los combustibles fósiles (Chen y Chi, 1980).

ACUMULACIÓN DE GLICEROL en la cepa de Salinas Chicas

Considerando que la acumulación de glicerol en el citoplasma es la estrategia de osmoregulación del género, se espera que la mayor concentración

intracelular corresponda a 5M de NaCl sin embargo, teniendo en cuenta que la velocidad de crecimiento es inversamente proporcional a la salinidad, la mayor concentración intracelular se correlaciona con la menor cantidad de biomasa. Además la cantidad de glicerol por célula depende del volumen celular que varía con las condiciones de cultivo y que difiere entre cepas de diferentes ambientes.

Dado que no se han registrado datos de producción de glicerol para esta cepa se diseñó la siguiente experiencia para evaluar el potencial productivo:

Partiendo de cultivos aclimatados a distintas salinidades, el ensayo se realizó durante 20 días para evaluar la salinidad a la cual la producción de glicerol presenta la mejor performance. La fase de aclimatación se lleva a cabo durante 4 días y se considera como día 0 del ensayo el quinto día de crecimiento. Los cultivos se realizaron por triplicado para 1M, 2M, 3M, 4M y 5M de NaCl. Se estableció un fotoperíodo de 12 : 12 (luz : oscuridad), una temperatura promedio de 19°C.

Se estimaron las concentraciones de Clorofila "a", carotenoides, Transmitancia de los cultivos a 750nm y concentraciones de glicerol extracelular y total para el día 0 y para el día 20, que corresponde al final del ensayo.

Una hipótesis que se plantea es que durante la primer semana de cultivo se espera la mayor contribución a la producción total, para todas las salinidades, ya que los cultivos aclimatados y en condiciones óptimas de crecimiento aumentarán la densidad celular en proporción mucho mayor a la que se espera para los siguientes días considerando que el agotamiento de nutrientes conlleva a la disminución de la velocidad de crecimiento, y que cualquiera sea la producción de glicerol, éste es consistente con el número de células. Para probar esta hipótesis se toman muestras por triplicado de cada cultivo el día 6 de la experiencia.

Las estimaciones de los parámetros mencionados para las condiciones del día 0 y los resultados obtenidos para el día 20 se presentan en las **Tablas VIII y IX**. La producción neta se presenta en la **Tabla X**.

Tabla VIII: resultados promedio de los datos experimentales y de los datos estimados para las condiciones iniciales del ensayo.

INICIALES	1M	2M	3M	4M	5M
Cl ⁻ a ⁻ (µg.mL ⁻¹)	3,93	5,55	4,62	2,75	0,67
Gli T (µg.mL ⁻¹)	34,43	51,25	58,13	45,77	18,18
Gli ex (µg.mL ⁻¹)	2,05	4,94	4,21	4,78	1,75
Carot. (µg.mL ⁻¹)	2,20	3,20	2,60	1,70	0,45
Gli In	32,38	46,31	53,92	40,99	16,43
carot/N (pg/cel)	1,25	1,54	1,59	1,68	1,76
N prom.(cél.mL ⁻¹)	1.764.420	2.077.420	1.639.220	1.013.220	255.760
Cl/N (pg/cel)	2,2	2,7	2,8	2,7	2,6
Gli In/N (pg/cel)	18,35.	22,29.	32,89.	40,45.	64,22.
Gli T/Cla	8,77.	9,23	12,58	16,64	27,23
Gli In/Cla	8,25	8,34	11,67	14,91	24,61
cla+carot/cel	3,47	4,21	4,40	4,39	4,37
%Gliex/total	6,0	9,6	7,2	10,4	9,6

Tabla IX: resultados promedio de los datos experimentales y de los datos estimados al finalizar el ensayo.

FINALES	1M	2M	3M	4M	5M
Cl ⁻ a ⁻ (µg.mL ⁻¹)	11,3	12,7	10,55	6,99	2,94
Gli T (µg.mL ⁻¹)	56,08	113,5	155,4	141,3	102,99
Gli ex (µg.mL ⁻¹)	5,6	12,5	17,44	20,89	9,75
Carot. (µg.mL ⁻¹)	5,15	7,13	5,8	3,61	1,4
Gli In (µg.mL ⁻¹)	50,48	101	137,96	120,41	93,24
Carot/N (pg/cel)	1,08	1,67	1,32	1,17	0,98
N prom.(cél.mL ⁻¹)	4.750.202	4.855.900	4.387.172	3.084.012	1.423.144
Cl/N (pg/cel)	2,38	2,98	2,404	2,26	2,06
Gli In/N (pg/cel)	10,62	23,73	31,44	39,04	65,51
Gli T/Cla	4,968	8,94	14,73	20,21	35,03
Gli In/Cla	4,47	7,95	13,07	17,22	31,71
cla+carot/cel	3,46	4,08	3,73	3,44	3,05
Gli ex/Gli T(%)	9,9	11,0	11,2	14,7	9,4

Tabla X: Producción neta de 20 días de crecimiento.

PROD.NETA en 20 días					
Cl ⁻ a ⁻ (µg.mL ⁻¹)	7,37	7,15	5,93	4,24	2,27
GliT (µg.mL ⁻¹)	21,65	62,25	97,27	95,53	84,81
Gli ex(µg.mL ⁻¹)	5,02	11,24	14,01	18,15	5,77
carot. (µg.mL ⁻¹)	2,95	3,93	3,2	1,91	0,95

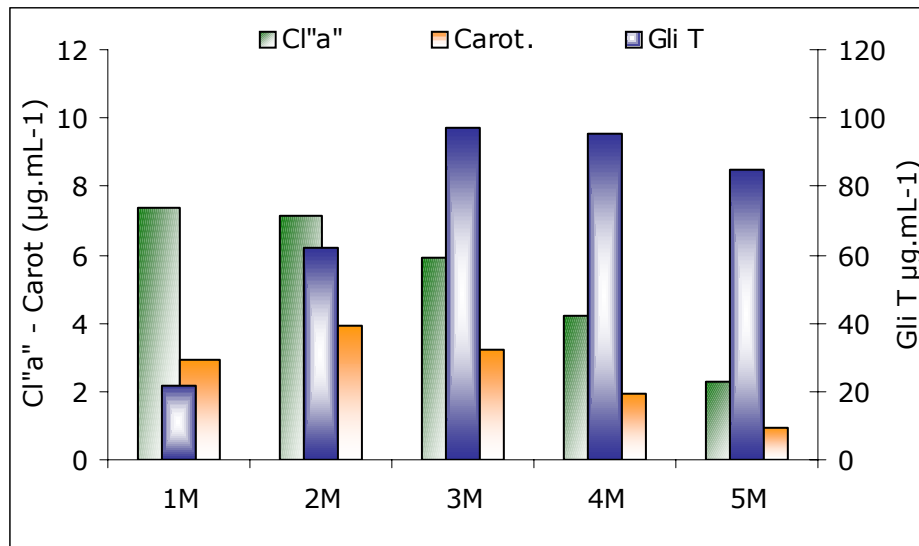


Fig.20: producción neta de Cl'a, carotenoides y glicerol en µg.mL⁻¹ de cultivo.

La producción neta de clorofila durante el control del ensayo disminuye a la tercera parte al aumentar la salinidad de 1M a 5M mientras que la producción de carotenoides es notablemente menor y se da con una relación Cl'a : carot > a 1,8 para todas las salinidades siendo máxima a 1M con una relación de 2,5.

La concentración mayor de glicerol producido es de 97,27 µg.mL⁻¹ a 3M de NaCl en el término de los 20 días, siendo la concentración acumulada de 155,4 µg.mL⁻¹.

En la Fig. 21 se aprecia el marcado efecto de la salinidad externa sobre la producción de glicerol respecto a la de clorofila aumentando de 2,5 veces a 1M hasta casi 34 veces a 5M.

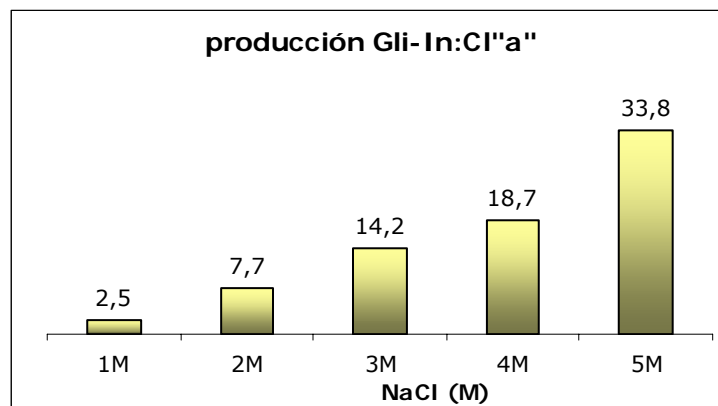
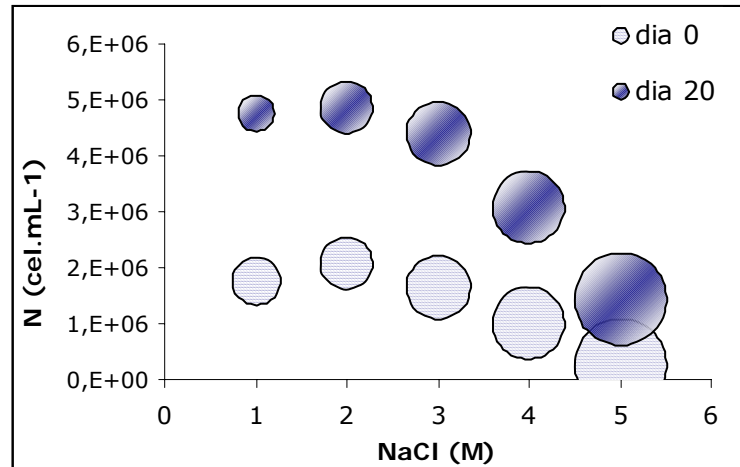


Fig. 21: relación Glicerol intracelular : Cl'a promedio para 20 días de crecimiento.

En la **Fig. 22** se compara el contenido estimado promedio de glicerol por célula entre el inicio y el final de la experiencia para cada molaridad de NaCl representado por el tamaño de las burbujas.

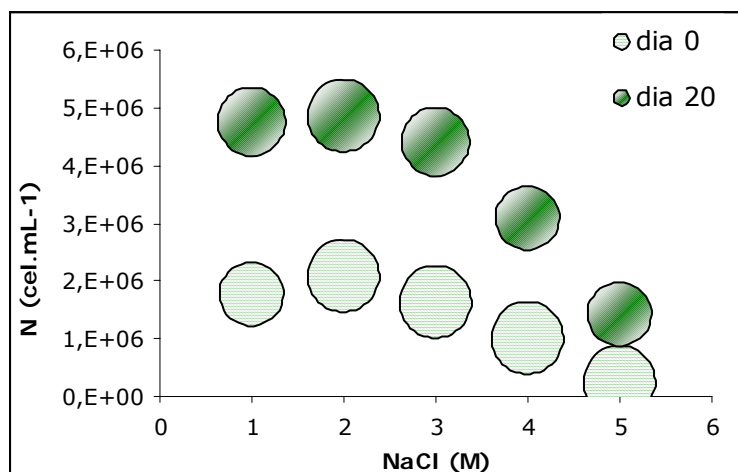


Gli In (pg.cel ⁻¹)	1M	2M	3M	4M	5M
dia 0	18	22	33	40	64
dia 20	11	21	31	39	66

Fig. 22: crecimiento a salinidades crecientes y Glicerol intracelular el día 0 y el día 20.

El número de células generado durante el ensayo es $1M > 2M > 3M > 4M > 5M$. El glicerol contenido en las células refleja el estrés osmótico creciente debido a la salinidad del medio y responde manteniéndose constante entre el inicio y el final de la experiencia, excepto para 1M que disminuye levemente.

En la **Fig. 23** se aprecia la concentración de clorofila "a" promedio representado por el tamaño de las burbujas, el cual se mantiene sin cambios significativos durante el cultivo y es independiente de la salinidad.



Cl"a" (pg.cel ⁻¹)	1M	2M	3M	4M	5M
dia 0	2,22	2,67	2,82	2,71	2,61
dia 20	2,38	2,60	2,40	2,27	2,07

Fig. 23: crecimiento a salinidades crecientes y clorofila "a" el día 0 y el día 20.

La concentración de glicerol extracelular determinada para el día 0 y el día 20 se muestran en la **Tabla XI**.

Tabla XI: Glicerol total, extracelular y porcentaje en el medio.

dia 0	1M	2M	3M	4M	5M
Gli T	34,43	51,25	58,13	45,77	18,17
Gli extra	2,05	4,94	4,21	4,78	1,75
% extra	6,0	9,6	7,2	10,4	9,6
dia 20	1M	2M	3M	4M	5M
Gli T	56,08	113,50	155,40	141,30	102,99
Gli extra	5,60	12,50	17,40	20,90	9,70
% extra	10,0	11,0	11,2	14,8	9,5

Durante los 20 días de ensayo, el porcentaje de glicerol del medio de cultivo (extracelular) es menor al 15%, indicando que la baja permeabilidad de la membrana permite mantener el gradiente de concentración, en condiciones normales (i.e.: aclimatadas y sin variaciones de salinidad).

Las células durante el tiempo del ensayo permanecen en buen estado fisiológico, lo cual es sugerido por la relación Cl^a : carot > 1,8 en todos los casos.

Para evaluar la hipótesis planteada sobre los primeros 6 días de cultivo se analizan los datos obtenidos para los primeros 6 días de cultivo para 3M y 5M. El aumento neto de biomasa se presenta en la Fig. 24a donde se observan los porcentajes de estos primeros días de control respecto del total; de la misma forma se presentan los resultados para las concentraciones de glicerol en la Fig. 24b.

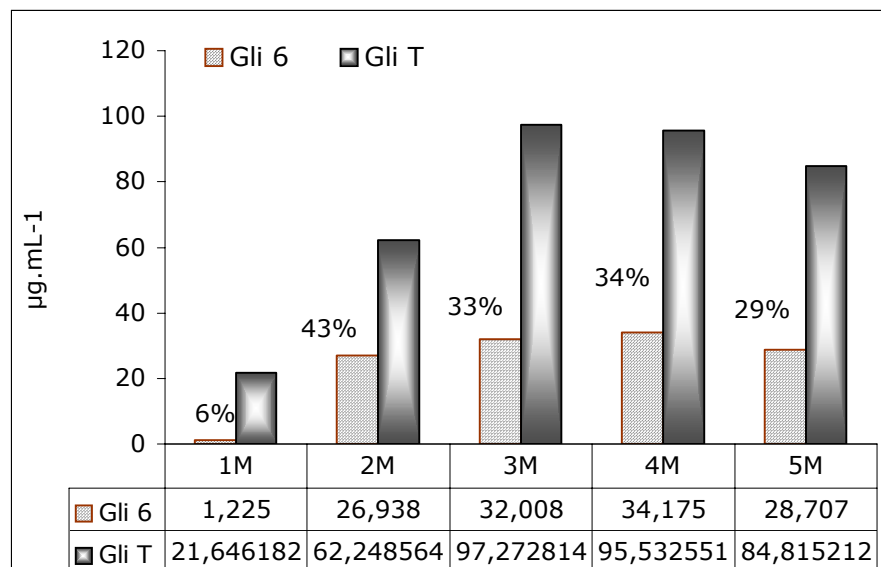
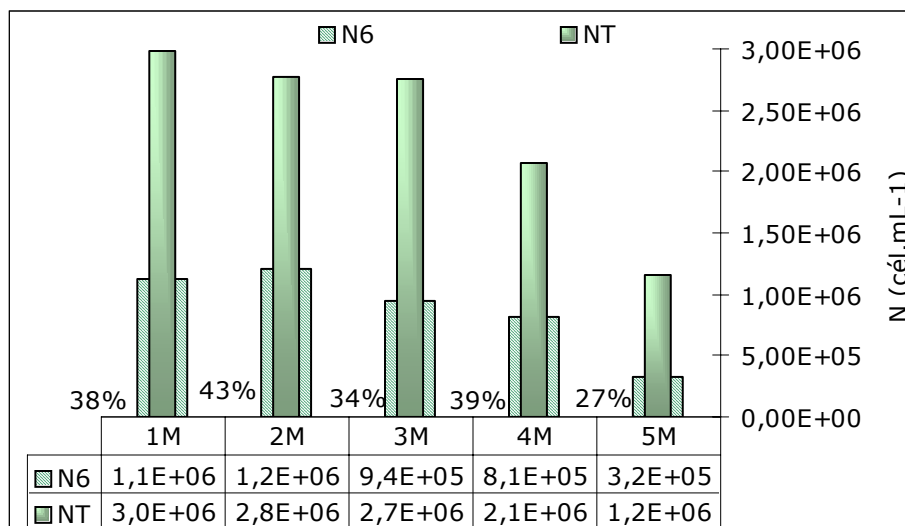


Fig. 24: a) Número de células; b) concentración de glicerol. 6=producción neta de los primeros 6 días; T= producción total.

Para las salinidades 2M, 3M, 4M y 5M el aumento en el número de células se da en porcentajes comparables a los del aumento del glicerol. Sin embargo el porcentaje del total es ligeramente mayor al 30% para 3M y 4M y ligeramente menor a 5M.

De la hipótesis planteada se comprueba que el aumento de glicerol es consistente con el número de células pero la velocidad de crecimiento no es lo significativamente mayor que se esperaba.

Para 1M solo el 6% del glicerol total se produce mientras el número de células aumenta en un 38%.

Varios autores informan la producción de glicerol de cepas aisladas de distintos ambientes,

- ❖ Phadwal y Singh (2003a) trabajando con una cepa de *D. salina* del lago Sambhar (India) obtienen 94,26 pg.cel.⁻¹ a 2M.
- ❖ Phadwal y Singh (2003b) informan 15,56 pg.cel.⁻¹ y 23,24 para *D.salina* y una nueva cepa de *Dunaliella* sp. respectivamente.
- ❖ Nakas y col. (1983) a 2M de NaCl informa la producción de *D. bardawill*, *D.tertiolecta*, *D.parva*, *D.salina* y *D.primolecta* indicando que los mayores contenidos de glicerol los obtiene de *D. salina* empleando como fuente de carbono NaHCO₃ con 27,6 pg.cel.⁻¹, siendo la de menor crecimiento relativo.
- ❖ Mishra y col. (2008) obtienen 0,13 ± 0,01 mL/10⁵ cel. a 0,5M y 3,7,±,0,18 mL/10⁵cel a 5,5M en un cultivo de 17 días.
- ❖ Kaçka y Dönmez (2008) con una cepa aislada de la laguna Tuz (Turquía) informa 55,01 pg.cel.⁻¹ como el mejor contenido a 25% de NaCl.
- ❖ Blackwell y Gilmour (1989) a 0,4 kmol.m⁻³ de NaCl obtienen 615 ± 27 mol.m⁻³ de glicerol y a 1,5 kmol.m⁻³ una concentración de 1.425 ± 59 mol.m⁻³.
- ❖ Ben Amotz y col. (1982) en ensayos al aire libre realizados durante 60 días en piletas de 60 cm de profundidad informan un promedio de 4,4 g glicerol/m²/día a 3,5M, aunque la mayor productividad la observan a 2M con una relación Glicerol : Clorofila de 27 : 3.

- ❖ Hernández Nazario y col. (2000) trabajando con una cepa cubana de *D.salina* informan $0,043\text{g.g}^{-1}$ de biomasa húmeda, lo que representa entre un 4% y 5% de rendimiento.
- ❖ Thakur y Kumar (1999) obtienen un máximo de $9,2\ \mu\text{M/mg Cl}^{\text{a}}$ con un máximo de células de $6,2 \times 10^9\ \text{cel.mL}^{-1}$.

Resumiendo la información obtenida experimentalmente en este trabajo:

- La mayor producción de glicerol es de $155,4\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ y $160,8\ \mu\text{M/mg Cl}^{\text{a}}$ y se obtiene a 3M creciendo en condiciones de no estrés con un promedio de 39 pg/cel.
- El glicerol del medio externo es sólo del 11,2% del total a 3M, permitiendo la obtención del mismo mediante la recolección de la biomasa, proceso que resulta más sencillo que recuperarlo del medio de cultivo.
- 3M de NaCl es una salinidad suficientemente alta para disminuir las probabilidades de contaminación del cultivo y permitir la producción al aire libre.
- Los resultados de producción son altamente satisfactorios en un corto tiempo lo cual minimiza las probabilidades de pérdida de glicerol producido por envejecimiento y muerte celular.

Remoción de Nitrógeno y Fósforo en efluentes cloacales

La disposición de las aguas residuales es una constante preocupación a escala global (de-Bashan y Bashan, 2004) y éstas necesariamente deben recibir tratamiento antes de ser volcadas a los receptores por ser responsables de la eutroficación de ríos, lagunas y mares del mundo (Lau y col., 1997; Trépanier y col., 2002).

Siendo que la generación de aguas residuales está inevitablemente ligada con la organización de las sociedades contemporáneas, nos encontramos con que, independientemente del lugar que económicamente ocupa un país en el ranking global, cada sociedad debe encontrar la manera de preservar sus recursos, preferentemente agregando valor al tratamiento de las aguas de desecho.

El cultivo de microorganismos en aguas residuales para la remoción de Nitrógeno y Fósforo ha sido estudiado desde hace décadas empleando bacterias y microalgas, inmovilizadas o libres. El proceso puede ser muy eficiente empleando cepas con atributos especiales (Olguín, 2003). Algunos de estos atributos son la tolerancia a altas o bajas temperaturas o a amplios rangos de variación de la misma, así como a cambios de composición química, una rápida sedimentación o la capacidad de crecer en sistemas mixotróficos.

Tang y col. (1997) proponen una cepa de *Phormidium* como apta para remover nutrientes en climas fríos o a temperaturas menores de 10°C,

Gronlund y col. (2004) usan *Coelastrum*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Selenastrum*, *Scenedesmus* y *Micractinium pusillum* en HRAPs ("High Rate Algal Ponds") con iluminación artificial y en invernadero.

Talbot y de la Noue (1993) presentan a *Phormidium bohneri* como una buena candidata para el tratamiento de aguas residuales a altas temperaturas, alrededor de los 30°C.

Olguín y col. (2003) resaltan de *Spirulina* su capacidad de floccular fácilmente resultando económica y sencilla la cosecha de la biomasa.

Craggs y col. (1995) señalan las posibilidades de tratamiento de aguas residuales en Escocia por dilución con agua de mar, logrando así la asimilación de nutrientes por microalgas marinas como *Phaeodactylum tricornutum*.

Shirai y col. (1998) ensayan el crecimiento de *Dunaliella* sobre aguas residuales de la producción de salsa de soja diluida con agua de mar.

Estudios sobre lagunas de estabilización muestran que las probables causas del bajo índice de sobrevivencia de bacterias son el aumento del pH y la salinidad cuando las aguas en tratamiento se mezclan con agua de mar, por lo que en lugares cercanos al mar la aplicación combinada de tratamiento con microalgas halotolerantes podría ser una buena alternativa. Tohá y col. (1990) demuestran la reducción drástica de *Escherichia coli* a pH > 9 obtenido por fotosíntesis.

Costa y col. (2004) ensayan un efluente de la planta de tratamiento de una compañía de Saneamiento brasileña como medio de cultivo alternativo para disminuir los costos en la producción de biomasa.

Chlorella y *Scenedesmus* (Travieso y col., 1996; González y col., 1997; Chacón y col., 2004), *Scenedesmus* y *Nannochloris* (Jiménez-Pérez y col., 2004) han sido propuestas para la remoción de nutrientes de aguas residuales de distintos orígenes.

Dunaliella tiene atributos destacables por lo que en este trabajo se evalúa la cepa de *Dunaliella* de Salinas Chicas para ser empleada en la depuración de aguas residuales provenientes de efluentes cloacales como tratamiento terciario para la remoción de Nitrógeno y Fósforo.

Características del efluente de PTLC

Para diseñar las experiencias se tomaron como base datos existentes de la Planta de Tratamiento de Líquidos Cloacales de la ciudad de Bahía Blanca (PTLC) publicados por la Municipalidad de Bahía Blanca (2004). Los resultados de 24 campañas realizadas por el Instituto Argentino de Oceanografía (IADO) en el término de un año con una frecuencia de muestreo quincenal indican que la variabilidad de las concentraciones de nutrientes de N y P es importante como puede observarse en la **Tabla XII**.

**Tabla XII: concentraciones de 24
muestras realizadas en el efluente de la PTLC.**

μM	Mínimo	Máximo	Promedio
NO_2^-	0,3	52	7,86
NO_3^-	0	640	64,72
NH_4^+	900	3600	1947,4
PO_4^{3-}	15	255	158,3

El pH promedio de todo el período muestreado es de $7,66 \pm 0,59$; el Oxígeno Disuelto de $4,12 \pm 0,76 \text{ mg.L}^{-1}$ implica un porcentaje de saturación que no excede en promedio el 60%; la variación de temperatura en el período muestreado se mantiene en el rango de $21,6 \pm 3,62 \text{ }^\circ\text{C}$; la alcalinidad total expresada como CaCO_3 es de $401,13 \pm 59,68 \text{ mg.L}^{-1}$ siendo la debida a bicarbonatos de $387,69 \pm 60,4 \text{ mg.L}^{-1}$.

La distribución de frecuencias de concentraciones de fosfatos se exponen en la **Fig. 25**. El 91,7% de las muestras se incluyen en el rango de $100\mu\text{M}$ a $250\mu\text{M}$. La concentración óptima para el crecimiento de *Dunaliella* es de $100\text{-}200 \mu\text{M}$ aunque es capaz de acumular fosfatos intracelularmente y cuando se pasa a un medio donde este nutriente está ausente emplea su reserva durante varios ciclos de división celular (García González et al., 2000).

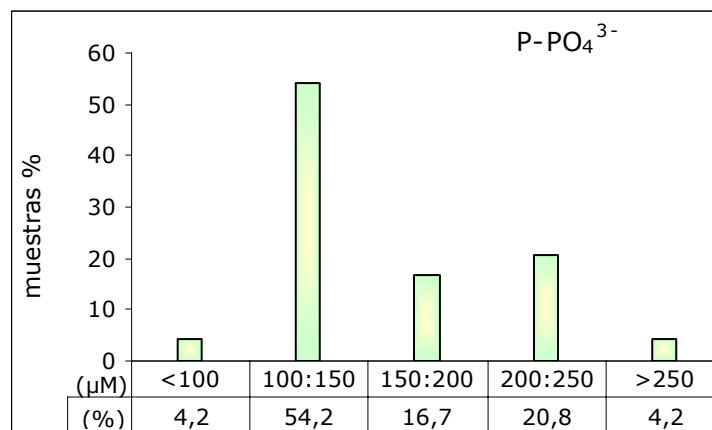


Fig. 25: rangos de concentraciones y porcentajes de muestras sobre 24 datos totales.

Las concentraciones de nitratos y nitritos tienen una distribución que puede observarse en la **Fig. 26**.

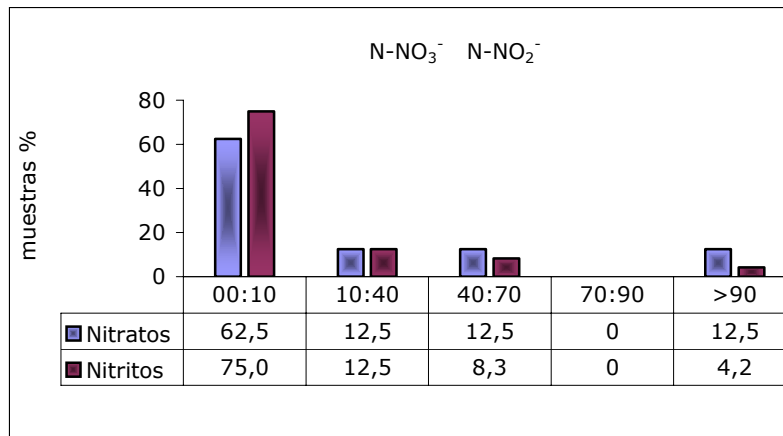


Fig. 26: rangos de concentraciones de Nitrógeno de NO_3^- y NO_2^- y porcentajes de muestras

Concentraciones de Nitrógeno de $600 \mu\text{M}$ se consideran deficientes, por lo que claramente la fuente de Nitrógeno deberá ser NH_4^+ , teniendo en cuenta la distribución que se presenta en la **Fig. 27**. En la misma se aprecia que el 83,3% de las muestras presentan concentraciones de NH_4^+ entre $1000\mu\text{M}$ y $2500\mu\text{M}$ mientras que un 12,5% de las mismas se hallan en un rango de $2500\mu\text{M}$ a $3600\mu\text{M}$ que es el máximo valor registrado.

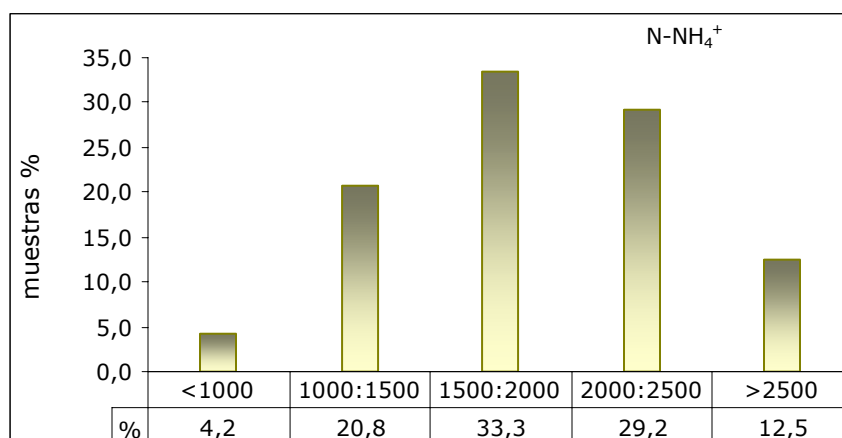
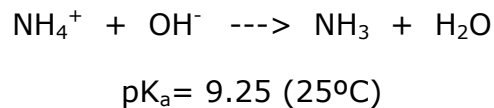


Fig. 27: rango de concentraciones de NH_4^+ .

La mejor fuente de nitrógeno para *Dunaliella* es el ión Nitrato (Mil'ko, 1962; Grant, 1968; Borowitzka y Borowitzka, 1988b), aunque el amonio es una

fuentes de nitrógeno común para plantas, algas y cianobacterias. Ha sido demostrado que en la mayoría de las eucariotas fotosintéticas, el amonio es asimilado fundamentalmente en el cloroplasto. Las algas verdes poseen dos isoenzimas, una en el cloroplasto y la otra en el citoplasma y asimilan amonio muy eficientemente (Pick y col., 1991). Sin embargo, sales de amonio como acetato, nitrato y cloruro de amonio son generalmente menos efectivas como fuente de Nitrógeno para *Dunaliella* y a elevadas concentraciones y elevadas temperaturas puede ser letal (Mil'ko, 1962).

La inhibición de la fotosíntesis que se observa en presencia de NH_4^+ es debida al NH_3 libre mediante el equilibrio de la reacción:



donde el pH establece el grado de disociación entre el NH_4^+ no tóxico y la especie tóxica NH_3 (Azov y Goldman, 1982).

En la mayoría de los ambientes naturales, particularmente en los marinos, la combinación de bajas concentraciones de ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) y el pH relativamente neutro y tamponado previene la toxicidad del NH_3 sobre el fitoplancton pero las posibilidades de inhibición en aguas residuales urbanas son mucho más altas considerando que se esperan concentraciones de varios cientos de milimoles de NH_4^+ que se combinan con elevados pH debido a que la fuente de carbono para la fotosíntesis es HCO_3^- . Por otra parte, la formación de NH_3 es promovida al elevarse la temperatura, por lo que se presentan habitualmente mayores problemas de toxicidad en piletas de tratamiento durante el verano.

Azov y Goldman (1982) destacan que a 25°C se requiere solo un tercio del total de amonio para producir el mismo NH_3 libre que a 10°C, y se provoca una reducción de la fotosíntesis del 50% con más de 15 veces menos amonio a pH 10 del que es necesario a pH 8.

Dunaliella tiene una excepcional capacidad de adaptación a pH extremos, estimaciones del pH intracelular indican que el pH citoplasmático es mantenido a un valor constante de alrededor de 7,4 en un rango de pH extracelular de 5,0 a

9,0 debida al transporte activo de Na^+/H^+ (Katz y col., 1990) conocido como sistema "antiporter Na^+/H^+ ". Sin embargo, amoníaco o amonio tienen varios efectos fisiológicos secundarios. Un exceso de amoníaco en el cloroplasto puede conducir al desacoplamiento de la fotofosforilación, a una disminución o cese en la producción de ATP y a la inhibición de la fijación de CO_2 . El amonio causa efectos en el pH intracelular por varios caminos. La asimilación de amoníaco por glutamina implica la liberación de protones y acidificación, con lo cual se necesita la extrusión del exceso de protones de la célula. El influjo de amoníaco dentro de la célula puede producir un rápido cambio en el pH citoplasmático, cuya dirección depende del mecanismo de transporte. La difusión de NH_3 dentro de la célula, la cual es favorecida a pH alcalinos, puede inducir la alcalinización citoplasmática debido a la protonación interna del NH_3 , mientras que el transporte de NH_4^+ dentro de la célula puede producir la acidificación debido a la disociación de H^+ resultante de la asimilación del NH_3 .

Los resultados de Pick y col., (1991) muestran que un influjo de amoníaco equivalente a una concentración intracelular de varios cientos de milimoles, induce un cambio en el pH citoplasmático de menos de 1 unidad de pH. Las estimaciones de la capacidad buffer de la célula es únicamente de 30 mM por unidad de pH., por lo que concluye que la mayoría de las aminos son compartimentalizadas y reguladas en espacios intracelulares. Estas vacuolas acídicas ocupan únicamente del 3 al 5% del volumen celular pero su capacidad buffer y de acumular cantidades masivas de aminos es sorprendente. La estrategia de compartimentalización de aminos dentro de vacuolas acídicas le confiere varios beneficios a los organismos fotosintéticos aportando un sistema buffer de alta capacidad, controlando el nivel de amoníaco de acuerdo a las necesidades y la capacidad de asimilación de amonio (Pick y col. 1991).

Evaluación del crecimiento de la cepa de *Dunaliella salina* a elevadas concentraciones de amonio.

Los tratamientos se realizaron en batch empleando 4 réplicas para cada uno, a dos concentraciones de biomasa inicial y dos concentraciones de amonio, contrastando con controles de nitrato.

Se prepararon dos series de 12 tubos cada una de 100 mL de capacidad y para cada tratamiento se usaron 4 réplicas con 60 mL de solución experimental cuya composición es: medio de cultivo ASP a 1M de NaCl empleando como única fuente de nitrógeno NH_4Cl y 13 mL de cultivo stock en estado estacionario con nutrientes agotados. Se determinó la concentración de clorofila "a" como indicador de biomasa, obteniéndose para el primer ensayo una concentración de clorofila "a" inicial de $520,7 \pm 35,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (n=12) y para el segundo $1.116,9 \pm 42,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (n=12).

Ambas series fueron expuestas a $2000\mu\text{M}$ y $3300 \mu\text{M}$ de NH_4^+ y los resultados se contrastan con controles cuadruplicados de NO_3^- .

Se expusieron a un fotoperíodo de 12 : 12 (luz : oscuridad) a un flujo fotónico de $280 - 300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ aportado por lámparas fluorescentes "luz día" y temperatura $23 - 26 \text{ }^\circ\text{C}$.

Durante el crecimiento los cultivos fueron periódicamente muestreados y analizados para determinar las concentraciones de clorofila "a", carotenoides, amonio, fosfatos y pH de cada tubo.

Los resultados obtenidos para el crecimiento evaluados mediante el análisis de pigmentos se presentan en la **Tabla XIII**.

Tabla XIII: concentración de clorofila promedio para los cultivos con inóculo inicial de $520,7 \pm 35,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para los tratamientos I: $\text{NO}_3^- 2000\mu\text{M}$; II: $\text{NH}_4^+ 3300\mu\text{M}$; III: $\text{NH}_4^+ 2000\mu\text{M}$.

Tiempo (días)	I	II	III
2	$624,8 \pm 79,0$	$608,8 \pm 36,3$	$640,8 \pm 51,3$
8	$2.322,9 \pm 64,1$	$2.136,0 \pm 62,4$	$2.899,6 \pm 79,0$
14	$4.293,4 \pm 49,9$	$2.162,7 \pm 63,3$	$3.043,8 \pm 80,6$
20	$5.158,4 \pm 192,2$	$1.537,9 \pm 96,4$	$1.377,7 \pm 98,8$

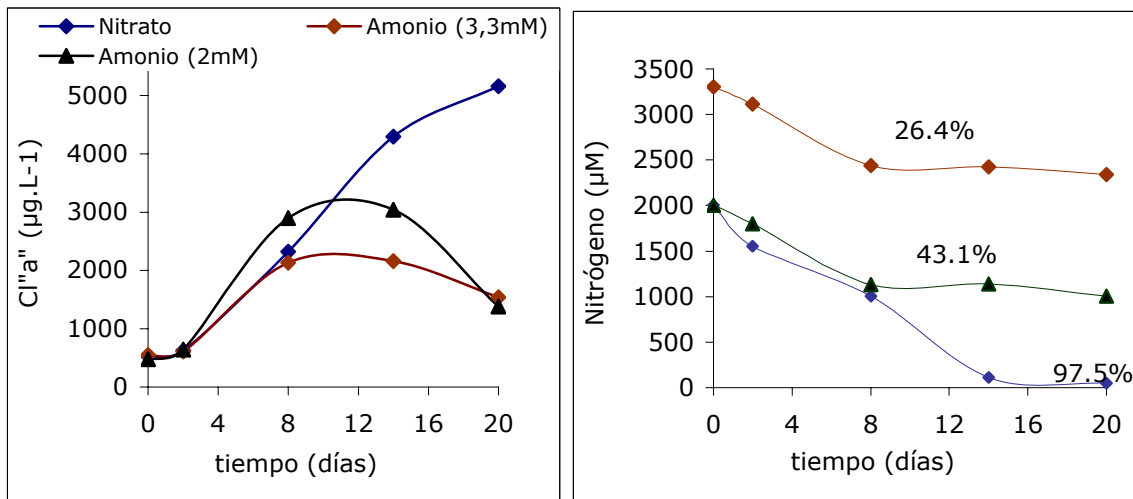


Fig. 28: Inóculo inicial = $520,7 \pm 35,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n=12) I: NO_3^- 2000µM; II: NH_4^+ 3300µM; III: NH_4^+ 2000µM. (a) concentración de clorofila "a". (b) concentraciones de amonio en el medio y porcentajes de remoción.

En la **Fig. 28** puede observarse que el crecimiento inmediato a la fase de aclimatación de los cultivos pareciera ser favorecido a NH_4^+ 2mM respecto del control de NO_3^- a la misma concentración, cuya velocidad de producción de clorofila es comparable con la de NH_4^+ 3,3 mM.

A partir del día 8 los cultivos con NH_4^+ disminuyen su velocidad de crecimiento y decaen rápidamente, en concordancia con el cese de la disminución de la concentración extracelular de NH_4^+ .

La evolución del pH de los cultivos se presenta en la **Fig. 29**.

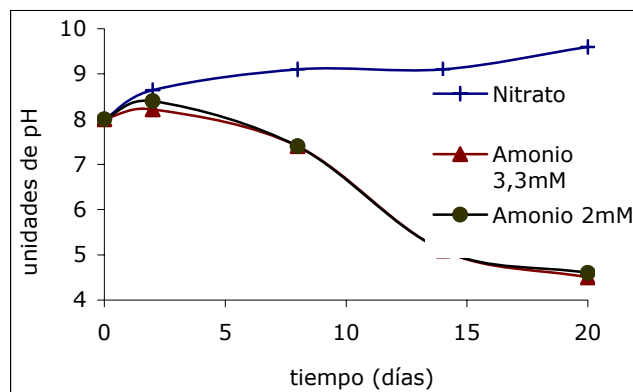


Fig. 29: evolución del pH en los cultivos a NO_3^- 2000µM; NH_4^+ 3300µM; NH_4^+ 2000µM.

Los resultados de la evolución en la concentración de clorofila se muestran en la **Tabla XIV**.

Tabla XIV: concentración de clorofila promedio para los cultivos con inóculo inicial de $1116,9 \pm 42,9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para los tratamientos I: $\text{NO}_3^- 2000 \mu\text{M}$; II: $\text{NH}_4^+ 3300 \mu\text{M}$; III: $\text{NH}_4^+ 2000 \mu\text{M}$.

Dias	I	II	III
2	$1.321,6 \pm 69,4$	$1.407,7 \pm 89,6$	$1.441,8 \pm 56,6$
8	$2.362,9 \pm 99,3$	$2.423,0 \pm 37,3$	$2.362,9 \pm 99,3$
14	$4.838,0 \pm 34,6$	$4.597,8 \pm 79,5$	$3.924,9 \pm 84,3$
20	$6.119,6 \pm 71,6$	$4.437,5 \pm 47,5$	$2.915,6 \pm 56,8$

El mismo patrón de comportamiento se observó para los tratamientos que se iniciaron con doble de biomasa inicial, como puede verse en la **Fig. 30**.

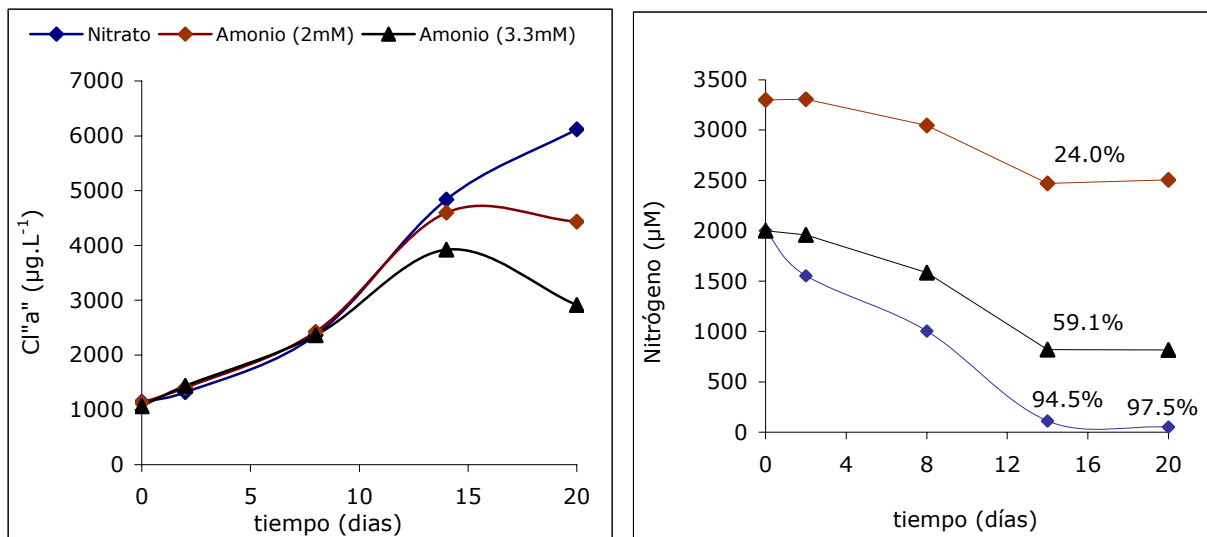


Fig. 30: (a) crecimiento en términos de clorofila "a". (b) curvas de concentraciones de amonio y porcentajes de remoción en las condiciones de Tabla XIV.

La disminución y decaimiento de los cultivos aparecen retardadas y se evidencian claramente a partir del día 14 pero el pH promedio final bajo estas condiciones es de 4.7.

La drástica disminución del pH provoca una entrada temprana en la fase estacionaria y los cultivos colapsan rápidamente como lo muestra la **Fig. 31**.

Esto confirmaría la aseveración de Borowitzka y Borowitzka (1988b) que afirmaban: *El "uptake" de amonio puede conducir a la acidificación del medio, lo cual eventualmente resulta en la muerte de las algas.*



Fig. 31. Cultivos de referencia (con NO_3^-) y colapsados por disminución del pH.

Una regulación del pH mediante "buffers" aseguraría un rango óptimo de crecimiento pero atendiendo a criterios económicos se planteó la posibilidad de utilizar una alternativa económica, como agregar al medio CaCO_3 para corregir la evolución del pH en los cultivos con amonio y evitar la acidificación por debajo del pH crítico (en su aplicación en escalas mayores puede reemplazarse por piedra caliza).

Se dispusieron para el ensayo 12 tubos con $2000\mu\text{M}$ y $3300\mu\text{M}$ de NH_4^+ siguiendo el mismo procedimiento que para las experiencias precedentes, a los que se les agregó CaCO_3 (aprox. 500 mg) y un inóculo inicial de $637,14 \pm 26,90 \mu\text{g.L}^{-1}$ de clorofila "a" ($n=12$).

La evolución de los cultivos experimentales se siguió durante 20 días y los valores de pH promedio medidos se muestran en la **Tabla XV**.

Tabla XV: pH promedio para los cultivos con CaCO_3 .

Día	0	2	7	8	14	15	20
2000 μM	8.2	8.7	8.8	9.2	9.1	8.9	9.1
3300 μM	8.1	8.8	8.7	9.0	8.8	9.2	9.0

Manteniéndose el pH regulado con CaCO_3 la concentración de clorofila al finalizar los ensayos fue de $5.660 \pm 269,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ para los cultivos con $2.000 \mu\text{M}$ de amonio inicial y de $4591,4 \pm 87,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $3.300 \mu\text{M}$ inicial de amonio.

Las concentraciones de amonio final y los porcentajes de disminución en el medio a los 20 días del ensayo se observan en la **Tabla XVI**.

Tabla XVI: Amonio promedio para los cultivos con CaCO_3 .

Inicial	Final	% disminución	n
2000 μM	$253,8 \pm 40,0$	$87,6 \pm 2,0$	6
3300 μM	$1105,5 \pm 91,2$	$66,5 \pm 2,8$	6

En base a estos resultados se plantea la hipótesis que el mismo patrón de comportamiento se obtenga al emplear una muestra de efluente cloacal de características similares a los ensayos realizados con medio simulado, regulando el pH para evitar la acidificación.

Aplicación a una muestra real.

Para el ensayo se tomó una muestra del efluente de la PTLC en el punto antes de ser volcada al estuario, el pH registrado fue de 8,40 unidades y la conductividad de $1540 \mu\text{S}$. Como pretratamiento antes de ser inoculado se filtró por arena y se esterilizó para eliminar agentes patógenos. La concentración de amonio del efluente luego de este pretratamiento resultó de $2064,95 \pm 24,3 \mu\text{M}$ y la concentración de fosfatos de $120,6 \pm 14,1 \mu\text{M}$. El efluente presentó una turbidez debida a material particulado en suspensión que le confería una $T_{420\text{nm}}$ de 77%.

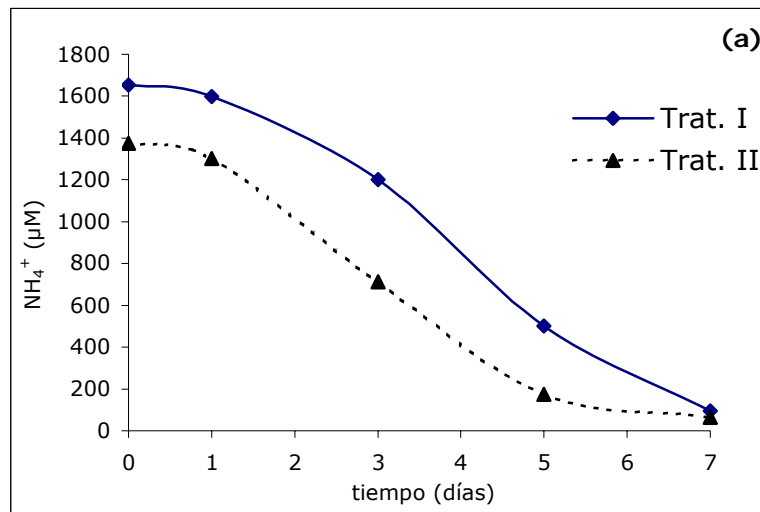
La densidad de biomasa del cultivo empleado para inocular las muestras fue de $1,95\text{E}+06 \text{cél.mL}^{-1}$ y con nutrientes agotados. Las experiencias se realizaron empleando triplicados para cada tratamiento, inoculando con una relación efluente : cultivo 4 + 1 (tratamiento I) y con una relación 2 + 1 (tratamiento II), agregando a todos los ensayos, $0,5 \text{g.L}^{-1}$ de CaCO_3 . De las observaciones fue posible establecer una fase de aclimatación de 24 horas. Los

resultados obtenidos para los 7 días de tratamiento se presentan en la **Tabla XVII**.

Tabla XVII: concentraciones promedio de amonio (μM) y fosfatos (μM) y controles de pH.

NH_4^+ /dia	0	1	3	5	7
I	1651.9 \pm 19.4	1599,5 \pm 51,8	1200,4 \pm 71,3	501,1 \pm 38,9	95,7 \pm 28,9
II	1376.6 \pm 16,2	1301,5 \pm 10,8	712,0 \pm 46,1	172,8 \pm 39,6	64,5 \pm 6,4
PO_4^{3-} /dia					
I	96,4 \pm 11,3	32,4 \pm 6,4	13,1 \pm 2,5	5,0 \pm 0,5	0,6 \pm 0,3
II	80,4 \pm 9,4	24,8 \pm 5,3	12,0 \pm 2,1	5,1 \pm 0,5	0,5 \pm 0,4
pH/dia					
I	9.05	9.05	9.1	9.35	9.55
II	9.1	9.15	9.55	9.45	9.65

En la **Fig. 32** se observan las concentraciones promedio iniciales considerando la dilución del efluente con el inóculo y su evolución en el tiempo.



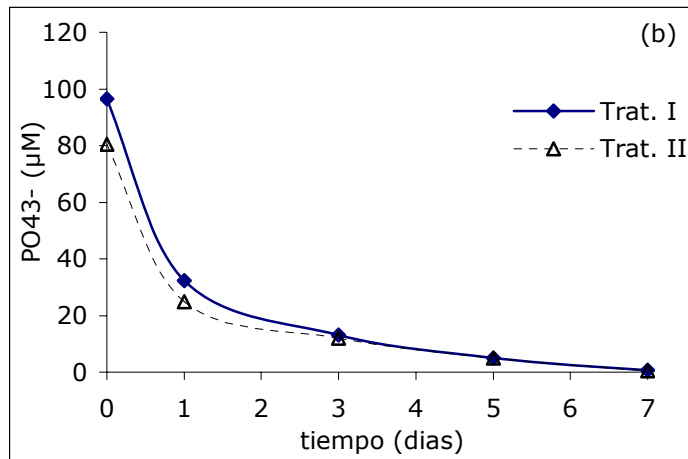


Fig. 32: (a) Concentración de NH_4^+ en el medio. (b) Concentración de fosfatos en el medio.

La remoción del medio tanto de amonio como de fosfato es altamente satisfactoria para un efluente de características promedio, ensayado inmediatamente de tomada la muestra, obteniéndose la remoción casi total en 7 días de tratamiento en "batch".

Tabla XVIII: porcentaje de remoción de nutrientes.

Trat. I	en 5 días	en 7 días
NH_4^+	69,6%	94,2%
PO_4^{3-}	94,8%	99,4%
Trat. II		
NH_4^+	87,4%	95,3%
PO_4^{3-}	93,7%	99,4%

Según se indica en la publicación oficial mencionada anteriormente el aporte de amonio al Estuario por el efluente cloacal es unas 15 veces superior al del resto del sistema, la remoción de estos nutrientes de N y P contribuiría a disminuir la magnitud de posibles eventos de eutroficación en la zona próxima a la desembocadura. Esto puede resultar de vital importancia considerando el aumento de la población esperado y las obras en marcha de ampliación de la cobertura por la red cloacal.

Ensayos de Producción de Oxígeno

Un beneficio adicional que ya ha sido mencionado es el aporte de oxígeno al efluente derivado de la fotólisis del agua al actuar de donante de electrones en las reacciones de fotofosforilación. Para estimar la productividad del cultivo se emplea el método de Gaarder y Gran (1927) y para la determinación del Oxígeno Disuelto el método de Winkler.

Se prepararon 6 botellas claras y 3 botellas oscuras empleando botellas de vidrio con tapa esmerilada de 130 mL de capacidad para la incubación. Se inocularon las botellas con 10 mL y se completó con medio de cultivo, resultando la densidad de cada botella de $4,86E+05 \pm 0,1E+05$ cél.mL⁻¹.

Se determinó el oxígeno disuelto inicial de las botellas a una temperatura de 18 °C, se incubaron durante 1 hora a $100-110 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz a una temperatura de 20,4 °C y se obtuvo la concentración de oxígeno disuelto de las 6 botellas obteniéndose los resultados presentados en la **Tabla XVIII**.

Tabla XIX: concentraciones de Oxígeno disuelto (OD)

OD	Inicial	Claras	Oscuras
mg.L ⁻¹	$6,69 \pm 0,14$	$8,54 \pm 0,19$	$6,33 \pm 0,13$

Fotosíntesis neta

$$[\text{OD (clara)} - \text{OD (inicial)}] = 1.85 \pm 0,24 \text{ mg O.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

Respiración

$$[\text{OD (inicial)} - \text{OD (oscura)}] = 0.36 \pm 0.19 \text{ mg O.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

Fotosíntesis bruta

$$2.21 \pm 0,23 \text{ mg O.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

Los resultados pueden expresarse como Producción Primaria Bruta (PPB), Producción Primaria Neta (PPN) y Respiración (R) considerando el cociente fotosintético (moles de oxígeno liberado a moles de carbono fijado) 1,2 (Bougis, 1974).

$$PPB = 99,36 \text{ mg C.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$PPN = 83,38 \text{ mg C.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad \text{y} \quad R = 15,97 \text{ mg C.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

En base a estos cálculos y teniendo en cuenta que la producción primaria neta equivale al carbono fijado y la fotosíntesis neta al oxígeno liberado por unidad de tiempo y volumen, podemos decir que un millón de células de *Dunaliella* fijan en promedio 2,65 mg de carbono por hora, liberando 0,05 mg de oxígeno por hora, quedando evidente la alta productividad de los cultivos de *Dunaliella*.

RECOLECCIÓN DE BIOMASA

Una de las claves para mantener el bajo costo productivo en el cultivo masivo de microalgas es la recolección de la biomasa del medio, la cual requiere uno o más pasos de separación sólido-líquido. La biomasa puede recolectarse por centrifugación, filtración, coagulación y floculación ó sedimentación gravitacional, dependiendo de varios factores como el tamaño, la movilidad, la densidad, el medio de cultivo y la aplicación de la biomasa, entre otros (Shelef y col., 1984).

Los cultivos son, en general, relativamente diluidos y el proceso de cosecha puede representar entre el 20 y el 30% del costo total de producción (Gudin y Therpenier, 1986, Neenan y col. 1986). Los diferentes procesos incluyen en su valoración la finalidad del cultivo (por la posible incorporación de sustancias extrañas, lisis de las células, viabilidad de las algas recolectadas, etc.) ponderándose además la eficiencia en la recolección y el costo final del producto.

Filtración

La recolección por filtración con presión o vacío según Mohn (1988) es adecuada para algunas microalgas como *Coelastrum proboscideum* ó *Spirulina platensis*, pero no para organismos de las dimensiones de *Scenedesmus*, *Dunaliella* ó *Chlorella*.

Para células pequeñas como *Dunaliella*, la filtración a través de arena, fibra de celulosa y otras fibras fueron probadas y no resultan prácticas (Ben-Amotz y Avron, 1987).

En Australia, uno de los mayores productores de *Dunaliella*, los cultivos se recolectan por filtración a través de tierra de diatomeas, y la biomasa filtrada se extrae directamente con solventes orgánicos para la extracción de β -caroteno (Ruane, 1997), la cual parece ser una de las mejores opciones para la filtración de *Dunaliella* en este caso, aún cuando los filtros se saturan rápidamente por lo que su eficiencia es baja.

Otro procedimiento es la filtración de flujo tangencial (Rose y col., 1992) que fue ensayada en la planta experimental de Agua del Pino con cultivo de *Dunaliella salina* (García González y col., 2000) empleando cartuchos de membranas de 0.22 μm de poro y operando en canal abierto consiguieron concentrar el cultivo 25 veces a un caudal de cosecha de 7-8 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Este sistema tiene un elevado costo de inversión inicial pero bajos gastos energéticos posteriores y escaso mantenimiento.

Floculación

Se emplean varios métodos para agregar las células microalgales incrementando el tamaño efectivo de la "partícula" y facilitando la sedimentación, la recuperación por centrifugación y filtración (Elmaleh y col., 1991). Las células están cargadas negativamente por lo que se busca la disminución o neutralización de las cargas por agregado de floculantes como cationes multivalentes ó polímeros catiónicos. Los floculantes deben ser económicos y efectivos a bajas concentraciones, pero sobre todo no tóxicos para no afectar su empleo.

Las sales metálicas multivalentes como $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ han sido empleados como floculantes en tratamiento de aguas residuales y se ha probado su efectividad en *Scenedesmus* y *Chlorella* (Golueke y Oswald, 1965) pero no es posible su empleo para el empleo de la biomasa en acuicultura y otras aplicaciones. En su trabajo, Jian y col., (1993) presentan al sulfato poliférrico como el mejor floculante comparado con los mas tradicionales (sales metálicas no polimerizadas) para *Anabaena* y *Asterionella*.

A elevadas salinidades como ambientes marinos la floculación por polielectrolitos es inhibida (Bilanovic y col., 1988). A medida que la fuerza iónica aumenta la eficiencia en la remoción disminuye exponencialmente. El quitosano es un floculante de origen natural, no tóxico y de fácil obtención que requiere bajas dosis (Richmond y Becker, 1986) y cuya efectividad se ha evaluado satisfactoriamente para varias microalgas (Nigam y col., 1980; Morales y col., 1985) pero su poder floculante es muy reducido en agua de mar.

La floculación de *Chlorella* por cambio de pH sin agregado de otros floculantes fue ensayada Yahi y col. (1994). Estudios con *Skeletoma costatum* muestran una eficiencia en la recolección del 80% a pH 10,2 pero si bien las células floculan, se produce la lisis con pérdida de los contenidos intracelulares (Blanchemain y Grizeau, 1999). Varios autores indican que la recolección de biomasa por floculación es un proceso más conveniente que la centrifugación y la filtración gravitacional (Lee y col. 1998).

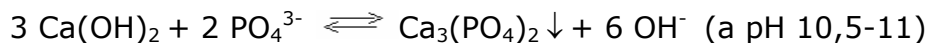
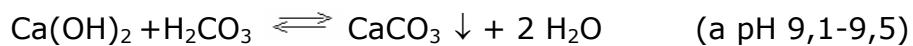
La autofloculación producida por modificación del medio de cultivo es un proceso muy interesante para su aplicación y ha sido estudiada para cultivos de algas tanto en aguas dulces como en sistemas con agua de mar, por varios autores, (Cannell, 1990; Lee y col. 1998).

En cultivos de la cepa que se estudia en este trabajo se observa que a valores de pH mayores a 9.5 un apreciable porcentaje de biomasa tiende a sedimentar espontáneamente en los recipientes de cultivo. Estas observaciones condujeron a realizar ensayos para evaluar la posibilidad de inducir la autofloculación del cultivo mediante la alcalinización del medio entendiendo como

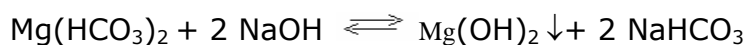
autofloculación la aparente formación espontánea del floc y la sedimentación de las microalgas, según la definición dada por Shelef y col. (1984).

En algunos casos este fenómeno es asociado con la elevación del pH debido al consumo de CO₂ durante la fotosíntesis. Bajo condiciones alcalinas algunos iones del medio precipitan junto con la biomasa algal. Las concentraciones de Ca²⁺ y PO₄³⁻ son importantes en la autofloculación ya que la precipitación de fosfato de calcio promueve la agregación y floculación algal (Sukenik y Shelef, 1984).

Cuando se tratan aguas residuales que contienen suficiente alcalinidad de bicarbonatos, agregando cal se producen una serie de reacciones de precipitación que simplificadas se pueden representar:



Cuando la alcalinización se realiza mediante el agregado de NaOH y en el medio hay cantidades considerables de Mg²⁺ como por ejemplo en agua de mar, la precipitación ocurre según la reacción:



El efecto del pH sobre la coagulación se determinó mediante una serie de ensayos en batch, empleando 30 mL de cultivo en tubos de 100 mL de capacidad y alícuotas de NaOH 0,1 N para alcalinizar el medio. Luego de cada agregado de NaOH las muestras fueron mezcladas durante un minuto mediante un agitador magnético a temperatura ambiente, se interrumpió el agitado y se registró el valor de pH. Se midió a intervalos regulares la A_{420nm} de sobrenadante como indicador de la turbidez del medio y la A_{750nm} como indicadores de densidad de biomasa.

Una primer experiencia se realizó sobre un cultivo con una densidad de biomasa calculada de $6,618E+06 \pm 6.4E+04$ cél.mL⁻¹ promedio, con una $A_{420nm} = 1,301$ y un pH inicial promedio de 9,3 unidades. La clarificación obtenida por el aumento de pH se desprende de los promedios presentados en la **Tabla XX**.

Tabla XX: Valores de pH, densidad y turbidez del sobrenadante.

pH	N prom. (cél.ml-1)	Turbidez
9,30	6,62E+06	1,301
9,50	6,21E+06	1,200
9,70	5,46E+06	1,155
10,00	3,73E+06	0,824
10,10	3,38E+06	0,757
10,50	2,83E+06	0,678
10,80	2,68E+06	0,688
10,90	4,07E+05	0,114
10,90	1,50E+05	0,044

Se representa en la **Fig. 33** la disminución de la turbidez (A_{420}) con el aumento del pH y el tamaño de las burbujas indican la concentración de la biomasa en suspensión (T_{750nm}), el 98% de la biomasa flocula a pH=10,9 en pocos minutos.

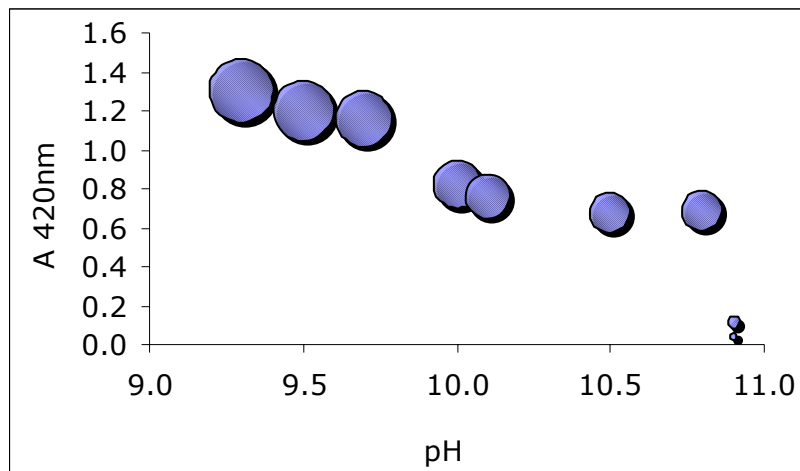


Fig. 33: Turbidez en función del pH y densidad de población.

La clarificación del medio puede observarse claramente en las fotografías de la **Fig. 34**.

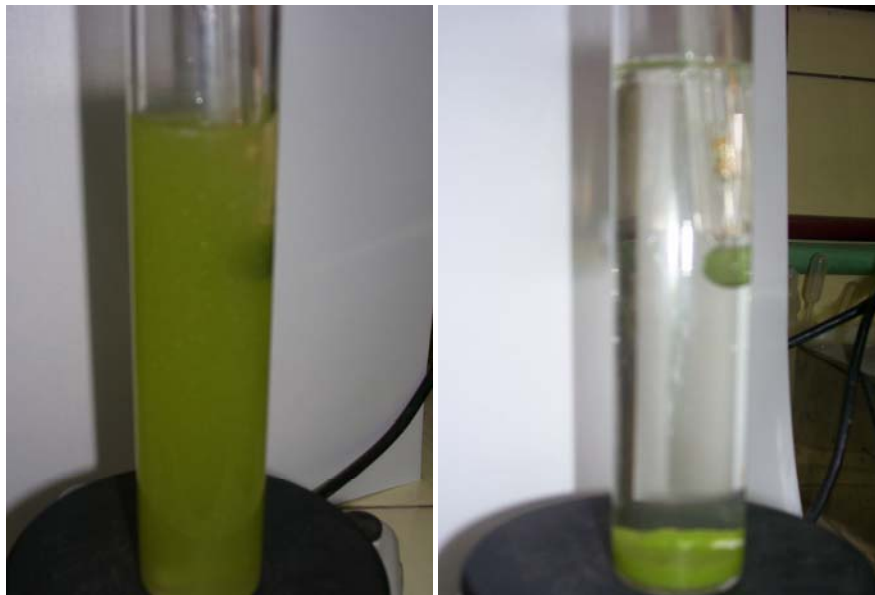


Fig. 34: a) cultivo a pH inicial. b) a pH 10,9

Sobre otra serie de tubos de Absorbancia a 420nm = 0,710 y una densidad celular de $3,575 \text{ E}+06 \pm 4,47\text{E}+04 \text{ cél.mL}^{-1}$ ($T_{750\text{nm}} = 0,569$) y un pH inicial de 10,1 se agregó NaOH 0,1N y se registró la modificación del pH, obteniéndose los valores de la **Tabla XXI**.

Tabla XXI: Valores de pH, densidad y turbidez del sobrenadante.

pH	N prom. (cél.ml ⁻¹)	Turbidez
10,10	3,57E+06	0,710
10,70	3,07E+06	0,629
10,85	2,31E+06	0,481
10,90	1,31E+06	0,297
10,90	9,45E+05	0,260
10,90	8,33E+05	0,222
10,90	2,69E+05	0,066

En ambos casos, independientemente del número de células y del pH inicial la clarificación sigue el comportamiento de la **Fig. 35**.

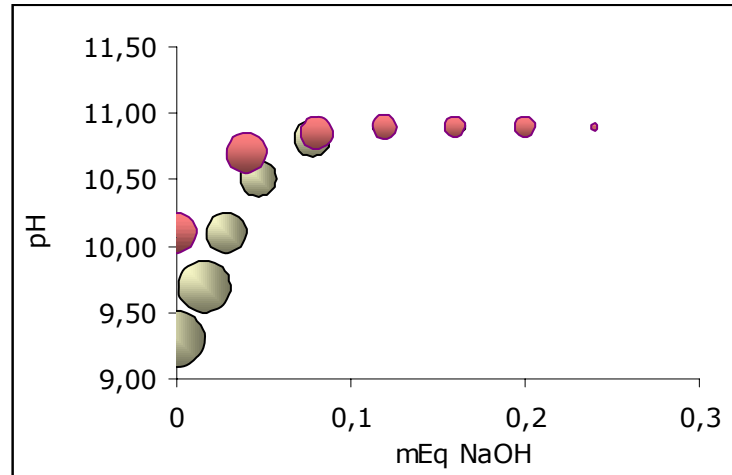


Fig. 35: pH en función del NaOH agregado en ambas series (el tamaño de las burbujas representa la densidad de biomasa del sobrenadante).

Se preparó una serie de ensayos separando el medio de cultivo y la biomasa. Para esto se filtró un cultivo de $2,642E+06 \pm 2,23E+04$ cél.mL⁻¹ con una turbidez de $A_{420nm} = 0.677$ por filtros GF/C de $0,45\mu\text{m}$ de poro sobre el cual se ensayó la floculación alcalina y una cantidad equivalente de células resuspendidas en medio isotónico y se sometieron al mismo procedimiento.

Las células en isotónica no presentaron floculación ni puntos de inflexión evidentes, mientras que en el medio sin células, el pH aumentó rápidamente hasta pH 10,6 y luego siguió el comportamiento que se muestra en la **Fig. 36**.

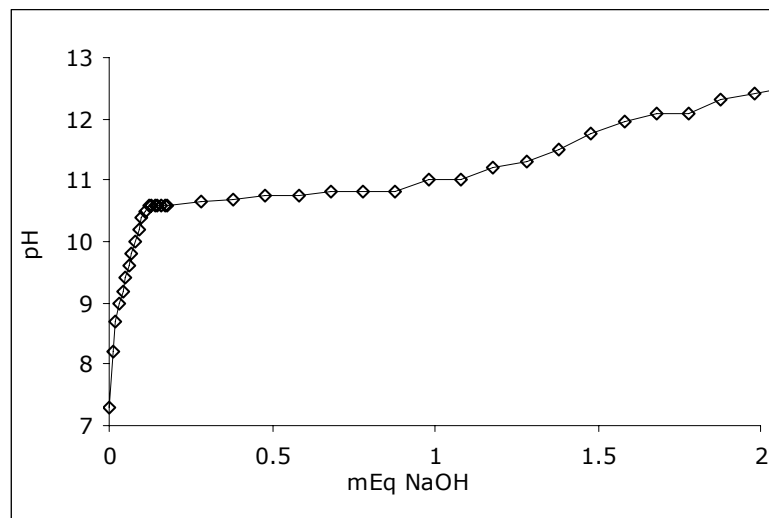


Fig. 36: pH en función del NaOH agregado, en medio de cultivo sin células.

De estos resultados se interpreta que la clarificación ocurre por la formación de un precipitado originado por los iones del medio de cultivo.

Teniendo en cuenta el rango de pH en el que ocurre la precipitación y los componentes mayoritarios del medio se puede pensar que la precipitación de CaCO_3 y/o de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ podrían ser responsables de la clarificación, considerando que la concentración de PO_4^{3-} es baja en el cultivo. Para identificar la acción del Mg^{++} se ensayó el comportamiento del medio de cultivo sin la presencia del mismo, agregando SO_4^{2-} equivalente (ya que el ensayo anterior incluía MgSO_4 en el medio) no observándose precipitado y una curva que presenta un aumento sostenido de pH. **Fig. 37.**

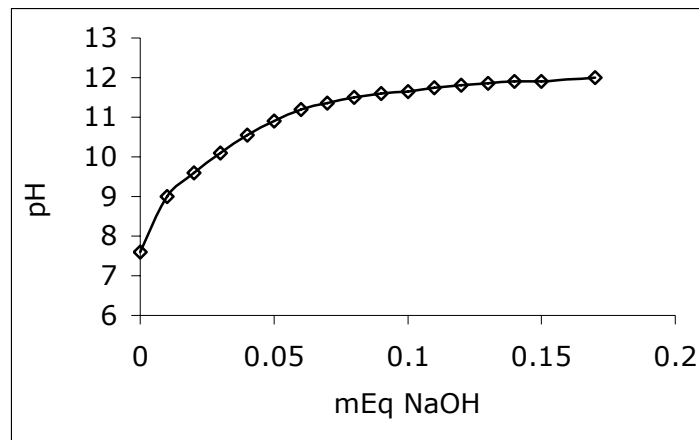


Fig. 37: pH en función del NaOH agregado (sin Mg^{++} en el medio)

El precipitado de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ comenzaría a un pH de 9,5 siendo significativo por encima de 10,5 y es completado a pH 11,0. El precipitado es gelatinoso y tiene un buen factor de peso.

Por otra parte es conocido que el precipitado de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ tiene un gran área superficial con carga positiva, atrayendo a partículas coloidales cargadas negativamente e induciendo la aglomeración que incluye también los flocs de CaCO_3 explicando la eficiencia del mismo. Ésta aumenta abruptamente cuando el

valor de pH se acerca al valor teórico de precipitación del $Mg(OH)_2$ que es 11,3 (Leentvar y Rebhun, 1982; Elmaleh y col., 1996).

La floculación alcalina mediada por $Mg(OH)_2$ da lugar a una forma de recolección sencilla y muy eficiente, siendo de bajo costo y fácil manipulación.

La biomasa floculada fue recuperada y resuspendida en medio de cultivo fresco a pH restituido, observándose el crecimiento en pocos días, lo cual significa que al menos parte del cultivo de *Dunaliella* se mantiene viable a pesar del estrés alcalino al que han sido sometido.

INMOVILIZACIÓN en *Luffa cylindrica*

Dunaliella salina ha sido inmovilizada en polímeros naturales como agar-agar, agarosa, carragenato y alginato de calcio (Thakur y Kuman, 1999, 2000; Leach y col., 1998) con resultados muy satisfactorios. Sin embargo, se asocian varias desventajas con el entrapamiento en geles, incluyendo la limitación en la velocidad de difusión, resistencia mecánica insuficiente que conducen a la ruptura y dispersión de la biomasa, falta de espacio para el crecimiento celular y prohibitivos costos de aplicación (Saeed y Iqbal, 2006).

En este trabajo se empleó una matriz vegetal para limitar el movimiento de las células de *Dunaliella* realizando una serie de experiencias para evaluar las propiedades de la matriz y la respuesta de la cepa microalgal.

Preparación del soporte

La Luffa cylindrica es una planta trepadora rústica cuyo fruto es conocido por su empleo con fines cosméticos. **Fig. 38.**

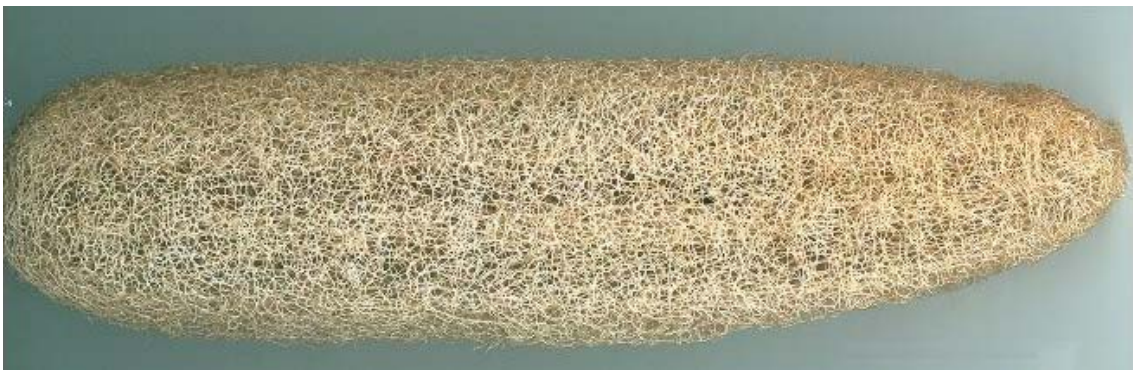


Fig. 38: mesocarpio del fruto seco.

Se separó una capa exterior del mesocarpio del fruto seco de entre 3 y 5 mm y se cortaron con sacabocados pequeños discos (lufitas) de 13 mm de diámetro. **Fig. 39.**



Fig. 39: discos "lufitas" de 13 mm de diámetro.

Para preparar las 4 réplicas que se emplearon en esta experiencia, se pesaron en balanza analítica grupos de 10 lufitas elegidas al azar y se dividieron en 4 grupos de 100 unidades cada uno con los pesos indicados en la **Tabla XXII**.

Tabla XXII: peso en gramos de los grupos asignados a cada réplica.

1	2	3	4
0,4022	0,4229	0,4005	0,3935
0,4138	0,3795	0,3649	0,3962
0,3713	0,4356	0,4598	0,3946
0,3622	0,3730	0,4059	0,4023
0,3571	0,4124	0,4264	0,3840
0,3743	0,4284	0,3964	0,3725
0,4225	0,3853	0,4385	0,3914
0,3727	0,3710	0,4164	0,3695
0,3973	0,3502	0,3597	0,3555
0,4334	0,4559	0,3665	0,4242

Para evaluar si los 4 grupos tienen el mismo peso promedio de lufitas se recurre a un ANOVA simple. Se evalúa si la variabilidad entre grupos de lufitas es superior a la variabilidad dentro de cada grupo ($\delta_A^2 \neq 0$) empleando los datos de la **Tabla XXI** y planteando la hipótesis: $\delta_A^2 = 0$. Se acepta el supuesto de normalidad

mediante el análisis de un gráfico de Probabilidad Normal de los residuales, no encontrando fallas evidentes; y el supuesto de homocedasticidad mediante el test de Levene comparando el estadístico $F = 2,063$ obtenido ($p=0,122$) con una distribución $F_{0.05}(3;36) = 2,87$.

Tabla XXII: Tabla de ANOVA

f. de v.	S.C.	g.l.	C.M.	F	P
Entre	0,001721455	3	0,000573818	0,6830	0,5683
Dentro	0,030246593	36	0,000840183		
Total	0,031968048	39			

Se acepta la hipótesis a un nivel de significación $>50\%$. Para cada réplica se asignan 10 grupos de 10 lufitas cada uno lo que representa un promedio de $3,960 \pm 0,091g$ de matriz para cada réplica.

Se disponen 4 erlenmeyers de 250 mL de capacidad con medio de cultivo de composición normal y 1M de NaCl y se inoculan con un cultivo isotónico en fase de crecimiento. De las 100 lufitas que son asignadas a cada cultivo, 98 son sumergidas en la suspensión algal y sobre 2 lufas de cada grupo se determina la concentración blanco de clorofila. La concentración inicial promedio de Cl^a de los cultivos es de $825,03 \pm 48,06 \mu g.L^{-1}$ y el blanco de lufitas es $0,998 \pm 0,05 \mu g.g^{-1}$ Se colocan en la sala de cultivo con un fotoperíodo de 12 x 12, **Fig. 40**.



Fig. 40: “lufitas” sumergidas en suspensión algal en crecimiento.

Se observa que las lufitas mantienen su estructura, la expansión de las mismas se estima en un 10% a las 24 horas de ser sumergidas en la suspensión.

Durante el tiempo de incubación se tomaron muestras por duplicado, de 2,5mL, del medio de cultivo que contiene las células libres, se filtran por GF/C de 0,45µm que se conservaron para la determinación de clorofila "a".

Simultáneamente se tomaron muestras de 2 lufitas de cada unidad para determinar Cl"a". En la **Tabla XXIII** se resume la información obtenida.

Tabla XXIII: concentración de Cl"a" en el cultivo (µg.L⁻¹) y en las lufas (µg.g⁻¹).

dia	µg.L ⁻¹	µg.g ⁻¹
0	825,0 ± 48,06	0,99 ± 0,05
5	1.906,4 ± 62,5	60,85 ± 6,13
10	3.908,8 ± 169,5	89,77 ± 6,21
17	3.604,5 ± 165,6	152,62 ± 7,30

La relación entre la clorofila "a" del total de las células libres y la Cl"a" en el total de lufas promedio para los 4 cultivos de la Tabla IV se muestran en la **Fig. 41** evidenciando colonización de la matriz.

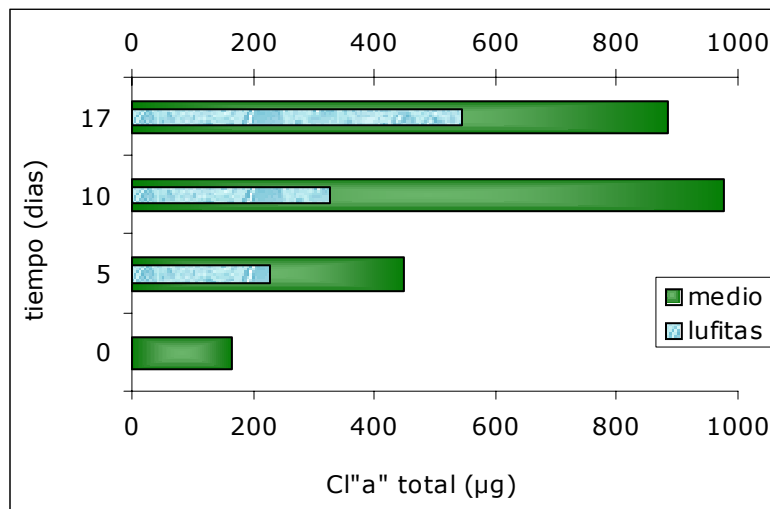


Fig. 41: clorofila (µg) en la matriz y en el medio.

Las células inmovilizadas en los discos de lufa fueron separadas del medio de crecimiento luego de 17 días y colocadas en cuatro columnas de vidrio cuyo diseño se observa en la **Fig. 42**.

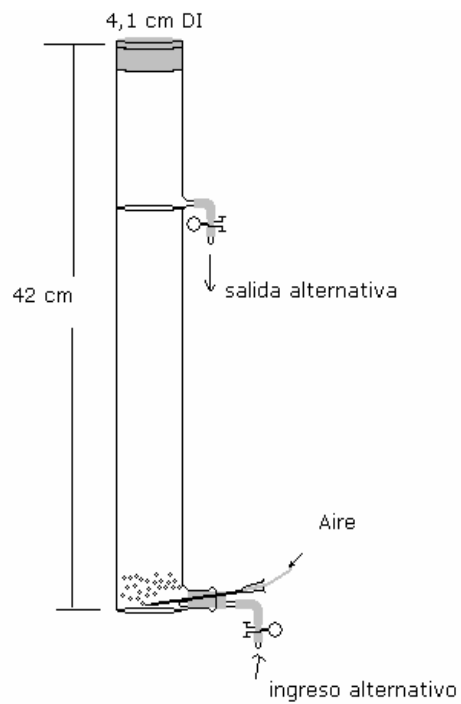


Fig. 42: esquema y foto de un fotobioreactor .

El aire que ingresa por la parte inferior en finas burbujas, se filtra previamente al pasar por una columna de carbón activado con los extremos ocluidos con tapones de algodón, según Paniagua (1995).



Fig. 43 a): detalle del extremo superior de un fotobioreactor .

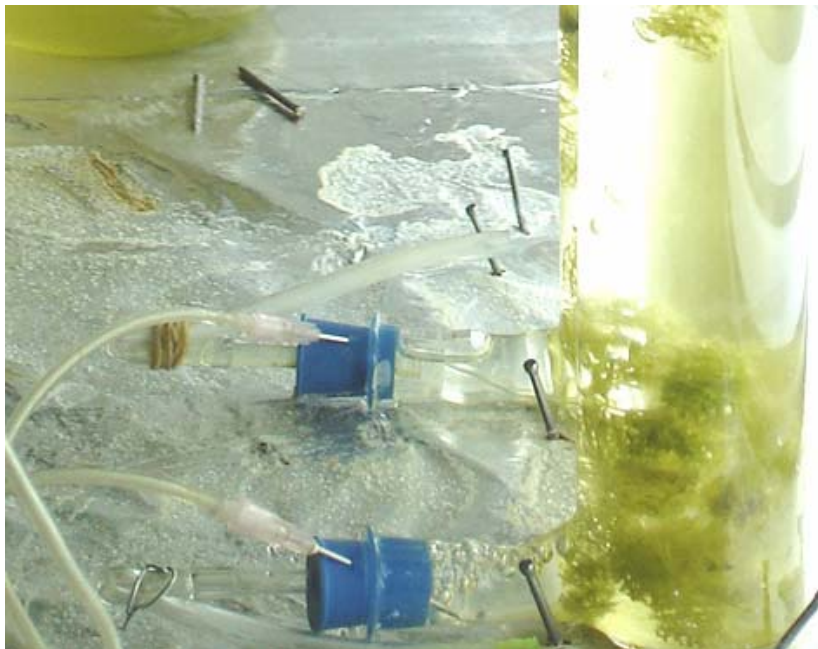


Fig. 43 b): detalle del extremo inferior de un fotobioreactor .

En la **Fig. 43 a) y b)** donde se observan en detalle el extremo superior y el inferior de un fotobioreactor se destaca el intenso color de las lufas.

Se operan durante 12 días, con fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con regulación del ingreso de aire filtrado durante 10 minutos cada 24 horas, que evita la posible estratificación del cultivo y favorece la liberación del oxígeno generado, lo cual es indispensable en todos los cultivos, especialmente cuando los diseños de los reactores no tienen gran superficie expuesta para el intercambio.

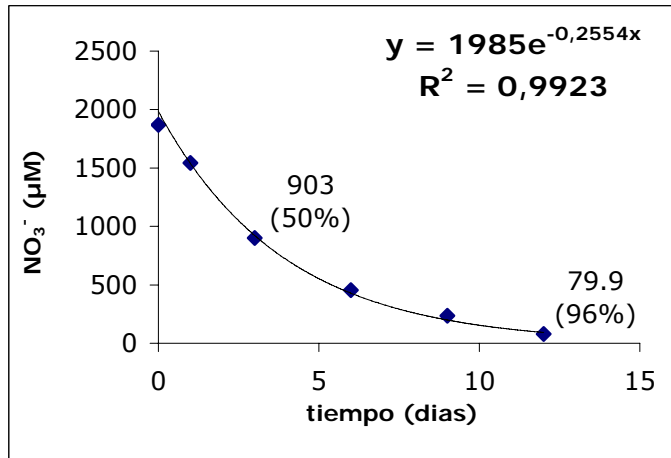
Se toman muestras para seguir la evolución de la concentración de fosfatos, nitratos y la transmitancia a 750nm de la solución que indica el crecimiento de células libres.

Al finalizar los 12 días de operación la matriz contiene una concentración de clorofila de $551,50 \pm 58,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n=8$) lo que representa $1.967,80 \pm 252,5 \mu\text{g}$ en promedio en el total de las lufas, siendo éste más de 3,5 veces mayor al valor inicial, mientras que el medio fue observado mediante lecturas de $T_{750\text{nm}}$ e indican una estimación de $0,313 \pm 0,07 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ al final de la experiencia, con una concentración de clorofila promedio de $0,70 \pm 0,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Estos resultados indican que la lufa empleada en forma de discos es una biomatriz que puede ser utilizada para mantener la biomasa de *Dunaliella* creciendo dentro de su entorno, con una muy baja dispersión de células libres en los 12 días de operación dentro de los biorreactores. El aumento de clorofila en las lufitas indica que su tejido fibroso y abierto permite la exposición a la luz de las células.

Evaluación de la disminución de Nitratos y Fósforos

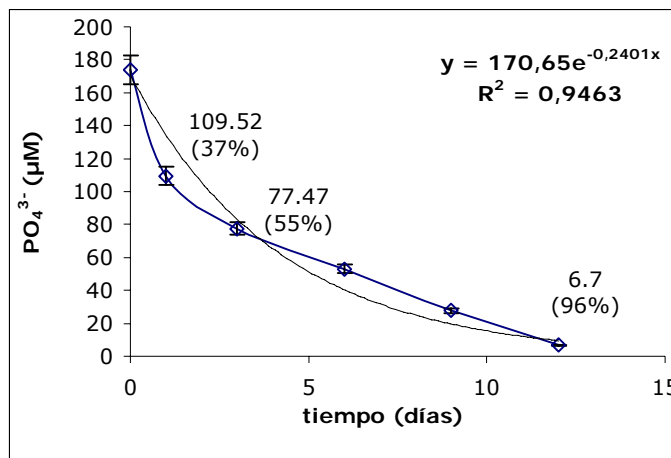
Los nutrientes NO_3^- y PO_4^{3-} presentaron el comportamiento que se observa en la **Fig. 44** y **Fig. 45**.



	μM
tiempo (días)	NO ₃ ⁻
0	1.870,7
1	1.544,3
3	903,0
6	456,0
9	234,4
12	79,9

Fig. 44 : concentraciones promedio de N en solución.

Las concentraciones promedio de los cuatro fotobiorreactores para NO₃⁻ en el medio siguen una disminución que puede aproximarse a una exponencial destacándose que el 50% del total disminuye en los primeros 3 días de operación, mientras que la remoción es del 96% en 12 días.



	μM
tiempo (días)	PO ₄ ³⁺
0	173,75
1	109,52
3	77,47
6	52,98
9	27,63
12	6,7

Fig. 45 : concentraciones promedio de fosfatos en solución

La curva que muestra la disminución de la concentración de fosfatos en el medio, puede aproximarse también a una exponencial y se asume que la falta de ajuste responde a la incorporación rápida de fosfatos en las primeras horas,

característica de todos los cultivos, seguido por una disminución en la velocidad. El primer día de cultivo la disminución es del 37% contra el 17,5% de Nitrato, igualándose al tercer día de tratamiento, donde ambos nutrientes disminuyeron en un 50%.

La *Luffa cylindrica* ha sido sugerida para la inmovilización de hongos, levaduras, bacterias (Iqbal y Zafar, 1994; Ogbonna y col., 1997, 2001) y microalgas como *Porphyridium cruentum* (Iqbal y Zafar, 1993), *Chlorella sorokiniana* para remover Niquel (Akhtar y col, 2003) y *Synechococcus sp.* para la remoción de cadmio (Saeed y Iqbal, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos la matriz ensayada muestra una buena performance en la inmovilización de *Dunaliella*, siendo el proceso simple, económico y efectivo.

Evaluación de la disminución de Amonio

Con el mismo procedimiento se preparan las lufitas para operar los fotobiorreactores empleando como fuente de Nitrógeno NH_4^+ , dejando uno de ellos como control sin microalgas. Este control responde al monitoreo de la posible pérdida de amonio por volatilización.

Tabla XXIV: peso en gramos de los grupos asignados a cada réplica.

1	2	3
0,3950	0,3737	0,4036
0,4049	0,3946	0,3391
0,3822	0,3698	0,3720
0,4093	0,3423	0,3700
0,3816	0,3525	0,3705
0,3413	0,3574	0,3686
0,3845	0,3664	0,3908
0,3395	0,3625	0,3708
0,3501	0,4009	0,3579
0,3710	0,3800	0,3709

El análisis de los grupos de lufitas permiten establecer, con un nivel de confianza de 0,95 y un error estándar de 0,036, una media total de $3,724 \pm 0,074$ g de matriz para cada réplica.

Una vez colonizadas, se empaican en las columnas con una concentración de clorofila "a" por gramo de soporte de $97,25 \pm 2,30$, $106,65 \pm 1,60$ y $101,19 \pm 0,56 \mu\text{g.g}^{-1}$. Las concentraciones de nitrógeno amoniacal en los biorreactores se muestran en la **Fig. 46**.

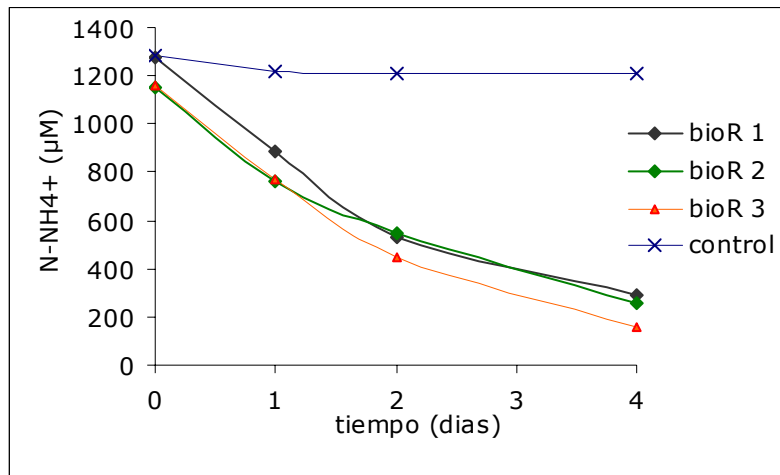


Fig. 46 : concentraciones promedio de NH₄⁺ en solución

Tabla XXV: concentraciones promedio de NH₄⁺ (µM) en los biorreactores .

días	bioR 1	bioR 2	bioR 3	bioR 4
0	1.272,12	1.148,14	1.158,24	1.281,83
1	885,27	764,60	770,44	1.214,61
2	528,57	549,89	445,74	1.209,25
4	293,72	259,48	154,27	1.205,88
%dism.	76,9	77,4	86,7	5,9

En la **Tabla XXV** se observa que la pérdida del 6% en el control es bajo para este diseño, sin embargo es una variable a considerar especialmente en el caso de ensayos con mayor superficie expuesta con interfase que favorezca el intercambio. La remoción en los biorreactores es altamente satisfactoria en un rango de 77% a 87% de la concentración inicial.

BIOELIMINACIÓN DE Cr (VI)

La biorremoción es definida como la acumulación y concentración de contaminantes presentes en una solución acuosa por el uso de material biológico, permitiendo de este modo la recuperación y/o disposición ambientalmente aceptable de los contaminantes (Vilchez y col., 1997). En particular los sistemas biológicos para la remoción de metales combinan dos tipos de mecanismos: uno dependiente del metabolismo, llamado incorporación activa y otro llamado biosorción que es independiente del metabolismo y ocurre cuando el metal se une a la superficie celular mediante intercambio iónico, donde iones mono y divalentes en la célula son desplazados por iones metálicos, ó formación de complejos entre el metal y grupos funcionales presentes en la superficie celular.

La biosorción es reversible y rápida y la cantidad de metal acumulado por unidad de biomasa es proporcional a la concentración del ión metálico en la solución. Este mecanismo es afectado por el pH y la presencia de otros iones en el medio.

En particular el cromo se encuentra más frecuentemente como Cr(VI) y Cr(III), estos dos estados de oxidación tienen diferentes propiedades químicas, biológicas y ambientales. Está documentado que el cromo hexavalente es un contaminante tóxico, reconocido carcinogénico (Barceloux, 1999; Iyer y col., 2004), que puede atravesar la barrera placentaria y causar numerosos efectos incluyendo ovotoxicidad (Banu y col., 2008).

Las industrias que contribuyen a la contaminación del agua con cromo son numerosas, fundamentalmente mineras, curtiembres, galvanoplastia, textiles, plantas productoras de pigmentos y preservativos para maderas.

Su comportamiento de oxoanión en solución acuosa lo distingue del resto de los cationes metálicos más comúnmente hallados en efluentes industriales.

La capacidad de biosorción depende del número de sitios del material absorbente, su accesibilidad, su estado químico y la afinidad entre el sitio y el metal (Viera y Volesky, 2000).

El análisis de los datos experimentales se realiza generalmente mediante alguno de los numerosos modelos empíricos Langmuir, Freundlich, Brunauer–Emmett–Teller (BET), Sips, Dubinin–Radushkevich, Temkin y Toth (Febrianto y col., 2008).

Los más populares ó los modelos clásicos de Langmuir ó Freundlich son los que generalmente se emplean para describir el equilibrio entre los iones adsorbidos y los iones en solución.

En el modelo de Langmuir se asume que hay un número finito de sitios de enlace que están homogéneamente distribuidos sobre la superficie del adsorbente, que estos sitios tienen la misma afinidad para la adsorción y que no existe interacción entre las moléculas adsorbidas.

$$q_{eq} = Q_0 \frac{b C_{eq}}{1 + b C_{eq}}$$

Donde

Q_0 es el límite de la capacidad de adsorción cuando la superficie está totalmente cubierta con el metal y se emplea para comparar la performance especialmente en los casos en que no se llega experimentalmente a la saturación.

b es una constante relacionada con la afinidad.

El modelo de Freundlich considera también una capa monomolecular que cubre el sorbente pero asume que éste tiene una superficie heterogénea sugiriendo que los sitios no son equivalentes y/o independientes.

$$q_{eq} = K_f \cdot C_{eq}^{1/n}$$

Donde

K_f es una constante relacionada con la capacidad de adsorción

n es una constante relacionada con la intensidad de la unión

La investigación de la remoción de Cr(VI) en la búsqueda de nuevos biosorbentes ha sido informada en muchos trabajos de distintos autores, tales como:

Aeromonas caviae (bacteria) $q_{\text{máx}} = 124,46 \text{ mg.L}^{-1}$ a pH 2,5 (Loukidou y col., 2004),

Spirogyra (alga filamentosa) $q_{\text{máx}} = 14,7 \text{ mg.g}^{-1}$ a pH 2, (Gupta y col., 2001)

Sargasum $q_{\text{máx}} = 40 \text{ mg.g}^{-1}$ (Kratochvil y col., 1998)

Streptomyces noursei $q_{\text{máx}} = 10,6 \text{ mg.g}^{-1}$ (Veglio y Beolchini, 1997)

Rhizopus arrhizus $q_{\text{máx}} = 8,8 \text{ mg.g}^{-1}$ (Veglio y Beolchini, 1997)

Chlorella vulgaris $q_{\text{máx}} = 24,4 \text{ mg.g}^{-1}$ (Veglio y Beolchini, 1997)

Pinus sylvestris $q_{\text{máx}} = \text{pH } 1 \text{ } 201,8 \text{ mg.g}^{-1}$

Aspergillus flavus (Deepa y col., 2005)

Levaduras aisladas de sedimentos mineros ó aguas residuales como:

Lecythophora sp., *Candida sp.* y *A. pullulans* (Villegas y col., 2008).

Macrófitas resistentes como:

Salvinia herzogii, *Pistia stratiotes*, *Hydromistia stolonifera* y *Eichornia crassipes* (Suñe, 2007).

y diferentes absorbentes de muy bajo costo como lana, aserrín, prensado de aceitunas, cáscaras de almendras, hojas de cactus y carbón vegetal empleados por Dakiky y col. (2002).

En particular empleando *Dunaliella* Dönmez y Aksu (2002) informan los experimentos de biosorción de dos cepas aisladas de la laguna hipersalina Tuz (Turquía).

Experiencias preliminares para la cepa que se emplea en este trabajo indican que el pH al que se produce la mejor remoción de cromo es de 2 (Ávila, 2005).

El pH influye tanto en los sitios de enlace del metal en la superficie celular como en la especiación del cromo en agua. El punto isoeléctrico para biomasa algal se encuentra según sugieren Crist y col. (1981) en $\text{pH} = 3$, por lo que por encima de éste las células tendrían una carga neta negativa. En estos valores de pH, las especies a ser adsorbidas son HCr_2O_7^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$ y $\text{Cr}_3\text{O}_{10}^{2-}$.

En el proceso que describen Donmez y Aksu (2002) la etapa rápida de la biosorción retiene entre el 11 y el 15% en la primera ½ hora, y en las siguientes

72 horas, se remueve entre el 45 y el 53,6% respectivamente para las dos cepas ensayadas a 0% de NaCl y 100 mg.L⁻¹ de Cromo inicial.

En la cepa de Salinas Chicas en los ensayos preliminares realizados por Ávila (2005) la etapa rápida podría considerarse que se resume a los primeros 15 minutos de contacto, con una retención del 39% mientras que en el total de 72 horas de contacto se remueve el 40% a una concentración inicial de 100 mg.L⁻¹ de Cr(VI).

En este trabajo se prueba la capacidad de sorción de *Dunaliella* en un sistema continuo donde la biomasa es soportada por tierra de diatomeas en una columna armada como se muestra en las **Figs. 47 y 48**.

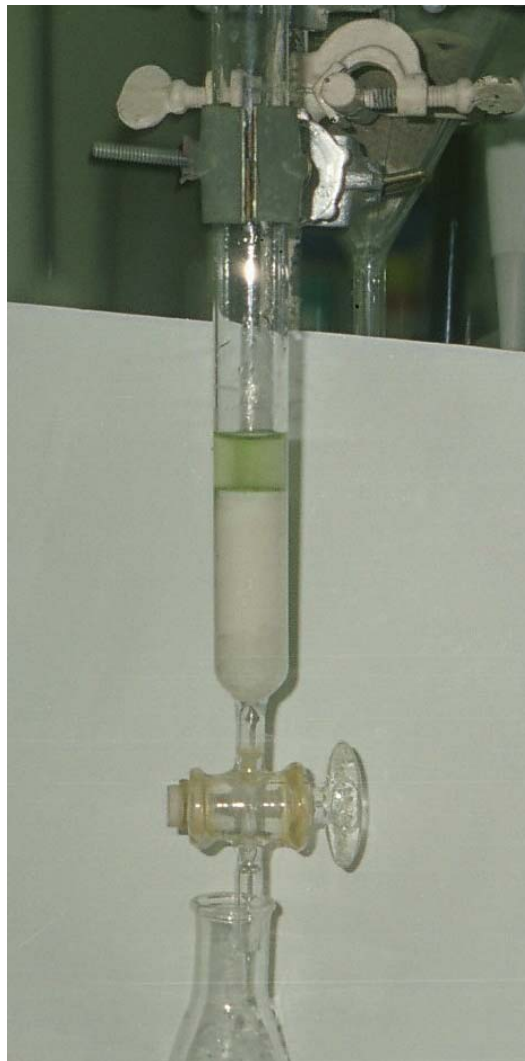


Fig. 47 : columna de tierra de diatomeas ocluida en la parte inferior con tapón de algodón que soporta la biomasa de *Dunaliella*.

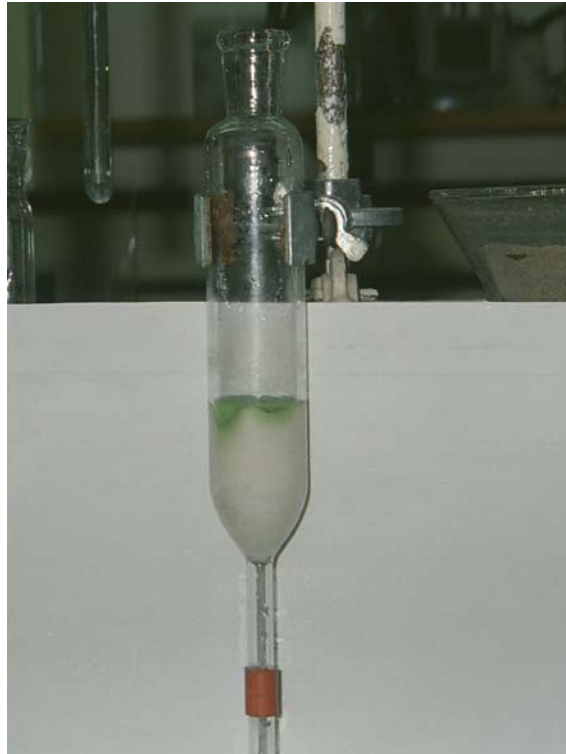


Fig. 48 : biomasa soportada en tierra de diatomeas

A la biomasa que permanece en los primeros milímetros de la columna de tierra de diatomeas se la trata pasando varias fracciones de agua destilada para eluir el NaCl presente en el medio, considerando que la adsorción decrece muy considerablemente con el aumento de la fuerza iónica de la solución y se ha demostrado una disminución importante en el porcentaje de remoción cuando el medio contiene 20% de NaCl, respecto de la misma solución acuosa a 0% de NaCl. La biomasa es protonada mediante el paso de una solución de agua destilada a $\text{pH} = 2$, obtenido mediante el agregado de H_2SO_4 .

La solución que contiene Cr(VI) se pasa por la columna en forma continua tomando muestras a intervalos regulares y determinando el cromo remanente.

En los ensayos se empleó una solución estándar de 50 mg.L^{-1} y se obtuvo una remoción promedio ($n = 4$) del 66% de cromo. En condiciones de flujo continuo la biomasa se satura a 32 mg.g^{-1} como se observa en la **Fig. 49**.

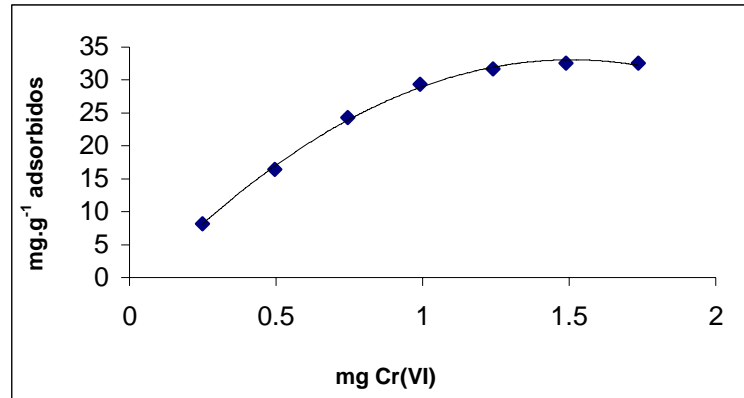


Fig. 49 : curva experimental de adsorción.
Se indican los valores promedio ($n=4$)

Los resultados obtenidos muestran que *Dunaliella salina* podría constituir un buen medio adsorbente para la biosorción de Cr (VI) en solución acuosa en condiciones de $\text{pH} = 2$, y su comportamiento es similar al de otras cepas citadas en la literatura y recomendadas para su potencial empleo como biosorbente para la disminución de Cr(VI) de aguas residuales.

MEDIOS DE CULTIVO ALTERNATIVOS

Los medios de cultivo proporcionan los requerimientos básicos de la especie a cultivar. Éstos se dividen en general en:

definidos o artificiales cuando su composición química es exactamente conocida porque es preparado en el laboratorio con drogas de calidad P.A. empleando material calibrado.

y

no definidos cuando se emplea agua natural extraída de alguna fuente compatible con la especie, la cual puede ser enriquecida o no mediante el agregado de algún componente en particular.

Estos últimos no deben ser empleados en experimentos donde se estudien aspectos fisiológicos de las algas, (González y col., 1995), sin embargo constituyen un tema muy importante a considerar cuando la especie que ya ha sido estudiada es ensayada para cultivos masivos y la obtención del producto permite el empleo de una fuerte alternativa.

Algunos ya han sido citados, como efluentes cloacales o industriales cuya composición permite un aprovechamiento del mismo que aporta beneficios adicionales incorporando un valor agregado al agua de desecho.

En el caso de *Dunaliella* uno de los medios alternativos es el agua de mar enriquecida con N y P. Es de esperar que su respuesta sea satisfactoria siendo que su origen es marino y que por lo tanto es un medio que contiene todos los nutrientes necesarios para su crecimiento, mientras que el enriquecimiento responde a la necesidad de aumentar la velocidad de duplicación en los cultivos.

En nuestra región hay grandes extensiones de tierras improductivas desde el punto de vista de la agricultura tradicional, con suelos hipersalinos y muy cercanos al mar, que podrían ser aptos para el cultivo de *Dunaliella*.

Numerosos ensayos realizados en medio de agua de mar enriquecida indican que su velocidad de crecimiento no difiere significativamente de la que se obtiene en medios específicos tales como el ASP-H.

En la **Fig. 50** se observan los resultados promedios comparativos entre ambos medios de cultivo.

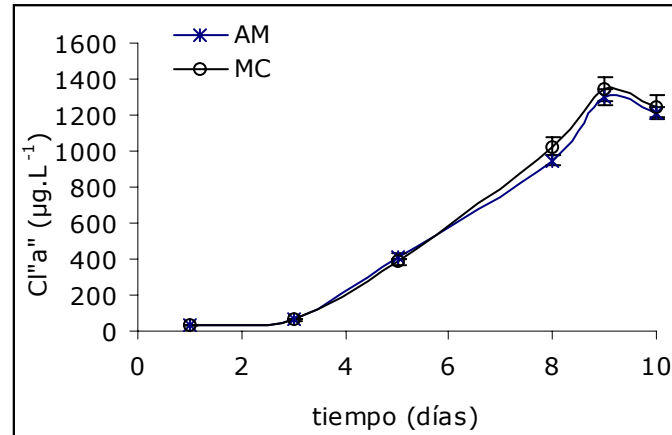


Fig. 50 : valores promedio \pm DS (n=4) de cultivos en AM=agua de mar y MC=medio ASP-H

No tan esperable es la respuesta de la cepa a medios naturales compuestos por aguas de otros orígenes. En este trabajo se ensaya el crecimiento de esta cepa en un medio de cultivo preparado con agua de la zona del sector quintas de la localidad de Médanos. Se tomaron muestras de agua extraídas con molino en el punto que se muestra en las **Figs. 51a y b**.



Fig. 51: localización del sector quintas de Médanos.

Se sabe que la calidad del agua de la región no es apta para cultivos no tolerantes a altas salinidades y que la calidad del suelo se ha visto empobrecida por el sistema de riego por surcos en cultivos de ajos y cebollas.



Fig. 51b : localización de la toma de muestra de pozo de una quinta de Médanos.

El pH de la muestra es de 7,8 unidades y la conductividad de 7250 μS está dada por un contenido de sales totales, obtenida como residuo total sobre una muestra filtrada, de 5,061 g.L^{-1} , e incluye en su composición:

$$\text{SO}_4^{2-} = 893 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{Mg}^{2+} = 55,7 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{Ca}^{2+} = 63,8 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{Na}^+ = 278 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{K}^+ = 5,76 \text{ mg.L}^{-1}$$

Este agua fue enriquecida con NO_3^- y PO_4^{3-} e inoculada sin ningún otro tratamiento. El crecimiento en este medio puede observarse en la **Fig. 52** el cual resulta altamente satisfactorio, con una velocidad específica de $0,16 \text{ div. día}^{-1}$, siendo de 5 días el tiempo requerido por una generación.

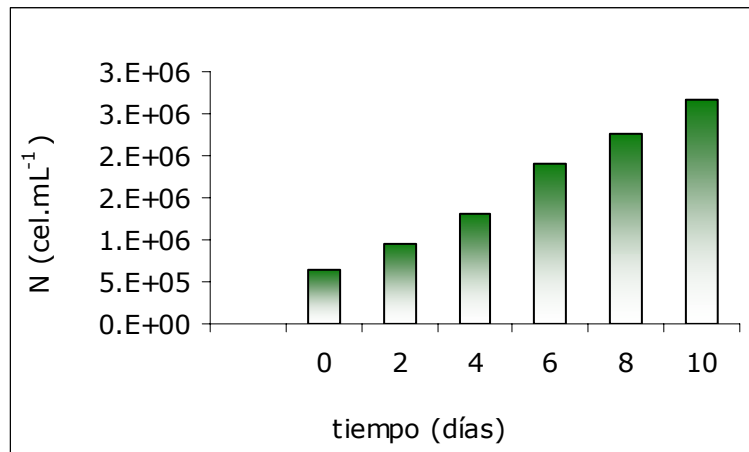


Fig. 52 : crecimiento de la cepa con agua de pozo del sector quinta de Médanos.

La versatilidad del cultivo de esta especie halotolerante es tan sorprendente que se constituye en un recurso que puede ser empleado con el fin de obtener productos de positivo impacto social, económico, científico tecnológico, y ambiental. Podría ser, a través de la biotecnología, un aporte importante para la región considerando que daría un valor agregado a las aguas salobres y las extensiones de tierra deprimida en su valor económico, produciendo una microalga fácilmente digerible por no tener pared celular, con 50-60% de proteínas y 30-40% de carbohidratos en su composición en condiciones de crecimiento de no estrés, varios esteroisómeros de β -caroteno y vitaminas como tiamina, piridoxina, riboflavina, biotina y tocoferol.

Conclusiones

CONCLUSIONES

La especie *Dunaliella* es la fuente algal más rica en β -caroteno y glicerol y una de las microalgas que actualmente es cultivada masivamente como fuente natural de β -caroteno; este uso comercial está desarrollado y el mercado mundial es abastecido por empresas especializadas. Algunos expertos consideran que no es necesaria la búsqueda de nuevas cepas carotenogénicas, sin embargo muchos investigadores desarrollan proyectos con objetivos que incluyen aislar y caracterizar nuevas cepas de *Dunaliella salina* especialmente en aquellos países que teniendo condiciones territoriales aptas *a priori* no han desarrollado aún el cultivo masivo para este fin.

- Se aisló una cepa de *Dunaliella salina* que se cultivó en condiciones axénicas, y se mantuvo sin mayores esfuerzos de esa forma, durante varios años.
- Se estableció una relación entre las medidas de turbidez a 750nm *in vivo* y el número de células por unidad de volumen, siendo éste un método que tiene la ventaja de ser no destructivo, lo que permite tomar tantas réplicas como se considere necesario, y obtener la información de la densidad de biomasa en cultivos entre 1M y 5 M de NaCl, que es el rango para el cual el modelo fue validado.
- Se determinó que la cepa es carotenogénica, aunque la sobreacumulación no se da por simple aumento de la salinidad. La producción por célula (pg.cél^{-1}) entre cepas de distintos ambientes varían enormemente, de la misma forma que la producción en mg.L^{-1} , según los reportes en la literatura. La *Dunaliella* de Salinas Chicas, sobreacumula carotenoides en condiciones de inducción que incluye agotamiento de nutrientes y estrés lumínico ó envejecimiento del cultivo.

- En el sistema natural, la salina no llega a tomar el color característico por no alcanzarse densidades celulares que lo produzcan. Esto puede deberse a la corta fase de salina en saturación ó a la presión de pastoreo ejercida por *Artemia sp.* muy abundante en este ambiente.

La producción de glicerol como subproducto es indicado desde hace décadas como una alternativa sustentable aunque hasta el momento no se ha implementado de forma industrial. La aparente sobreoferta que produciría la obtención de biodiesel a partir de biomasa, está fuertemente cuestionada y puede ser revertida en corto plazo.

- Se realizaron ensayos de inducción de acumulación de glicerol en el citoplasma evaluándose su potencial biotecnológico dado que no se han registrado datos de producción para esta cepa. La mayor producción fue de 155,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 160,8 $\mu\text{M}/\text{mg Cl}^{\text{a}}$ y se obtiene a 3M creciendo en condiciones de no estrés con un promedio de 39 pg/cel.
- El glicerol del medio externo es de solamente un 11,2% del total a 3M, permitiendo la obtención del mismo mediante la recolección de la biomasa, proceso que resulta más sencillo que recuperarlo del medio de cultivo.
- 3M de NaCl es una salinidad suficientemente alta para disminuir las probabilidades de contaminación del cultivo y permite la producción al aire libre.
- los resultados de producción son altamente satisfactorios en un corto tiempo lo cual minimiza las probabilidades de pérdida de glicerol producido por envejecimiento y muerte celular.

La mayoría de las actuales plantas de producción de *Dunaliella* están localizadas cerca de fuentes disponibles de agua salada, en áreas templadas y donde el terreno no tiene uso agrícola. El concepto es el mismo que sirviera de base para la agricultura: aprovechar la capacidad fotosintética con el objeto de producir biomasa. Amplias zonas de nuestra región reúnen estas características y podrían emplearse para su cultivo ó para valorizar las aguas residuales con el beneficio de evitar la potencial eutroficación del estuario, siendo que se ha demostrado la capacidad de remoción de fósforo y de nitrógeno proveniente tanto de NO_3^- como de NH_4^+ , constituyendo una muy buena opción para el tratamiento de efluentes cloacales.

Hasta el momento, la ciudad dispone de sus aguas cloacales vertiendo el efluente con un pretratamiento que disminuye los sólidos, sin embargo, varias alternativas deberían ir evaluándose debido a que la población de la ciudad sigue creciendo, la cobertura de los servicios es acorde a su desarrollo y las aguas residuales de la actual planta impactan sobre el estuario, debido a que no reciben tratamiento para disminuir las concentraciones de nutrientes. Ha sido demostrado que los métodos tradicionales de tratamiento de cloacales tienen mayor costo que empleando microalgas, especialmente cuando se dispone de terreno no aprovechable y agua de mar cerca.

- El cultivo de la cepa en el efluente cloacal para la remoción de Nitrógeno y Fósforo fue muy satisfactorio con porcentajes elevados de remoción en cortos períodos de tiempo. En las condiciones experimentales, se obtienen porcentajes de hasta el 90 % de remoción en una semana de operación de los cultivos.
- A elevadas concentraciones de amonio, y especialmente a valores altos de temperatura y de pH, la presencia del mismo puede provocar la acidificación abrupta del medio y conducir a la muerte del cultivo. Un importante aporte de este trabajo es que puede realizarse efectiva y económicamente una regulación eficiente y que no compromete la generación de biomasa, mediante la adición de CaCO_3 como regulador,

y aún puede pensarse en piedra caliza triturada, lo cuál no interfiere en el desarrollo normal de los cultivos, ni en los mecanismos usuales de remoción de biomasa.

Las capacidades especiales de *Dunaliella* en cuanto a tolerancia a amplios rangos de salinidad, temperatura y pH resultan atractivas para su aprovechamiento porque le proporciona una ventaja selectiva que permite el control de la contaminación del cultivo y evita el crecimiento de predadores.

- En el caso de *Dunaliella* de Salinas Chicas uno de los medios alternativos ensayados en este trabajo fue agua de mar enriquecida con N y P. La respuesta fue satisfactoria siendo que este medio contiene todos los micronutrientes necesarios para su crecimiento.
- Otro medio alternativo que se propone es el empleo de aguas no recomendadas para riego en cultivos no tolerantes como las aguas subterráneas de una vasta región que incluye el sector quintas de la ciudad de Médanos y la zona norte del partido de Villarino.

Una de las claves para mantener el bajo costo productivo en el cultivo masivo de microalgas es la separación de la biomasa del medio, en tal sentido, se ha demostrado en esta tesis que es posible el crecimiento de *Dunaliella* empleándose como medio de inmovilización una matriz vegetal no convencional.

- Se ha demostrado que pequeños discos de *Luffa cylindrica* pueden ser empleados para mantener la biomasa de *Dunaliella* creciendo dentro de su entorno, con una muy baja dispersión de células libres en los biorreactores en operación. El aumento de clorofila en las lufitas indica que su tejido fibroso y abierto permite la exposición a la luz de las microalgas en crecimiento.

Si el crecimiento se realiza sin limitación del movimiento, las células libres deben ser separadas del medio de cultivo. Espontáneamente, y como resultado de la fotosíntesis, la biomasa puede coagular y sedimentar por el aumento de pH del medio ya que provoca la formación de $Mg(OH)_2$ y coprecipita las células.

- La floculación alcalina mediada por $Mg(OH)_2$ da lugar a una forma de recolección sencilla y muy eficiente, siendo de bajo costo y fácil manipulación. La biomasa floculada fue recuperada y resuspendida en medio de cultivo fresco a pH restituido, observándose la recuperación del crecimiento en pocos días, lo cual significa que al menos parte del cultivo de *Dunaliella* se mantiene viable a pesar del estrés alcalino al que han sido sometido.

El empleo de sistemas biológicos para la remoción de metales puede darse por biosorción, que es un mecanismo independiente del metabolismo y ocurre cuando el metal se une a la superficie celular. Este mecanismo es reversible y rápido, siendo la cantidad de metal acumulado por unidad de biomasa proporcional a la concentración del ión metálico en la solución, y es afectado por el pH y la presencia de otros iones en el medio.

- La biomasa de la cepa autóctona fue ensayada como biosorbente para retener Cr(VI) con resultados satisfactorios, estableciéndose las condiciones óptimas a las que el proceso tiene lugar. Esto permite avanzar sobre este tema de interés debido a la toxicidad del cromo hexavalente, cuya concentración es regulada en todos los países.
- En este trabajo se prueba la capacidad de sorción de *Dunaliella* en un sistema continuo donde la biomasa es soportada por tierra de diatomeas, y los resultados obtenidos muestran que podría constituir un buen medio adsorbente para la biorremoción de Cr (VI) en solución acuosa en condiciones de $pH=2$, y su comportamiento es similar al de

otras cepas citadas en la literatura y recomendadas para su potencial empleo en la disminución de Cr(VI) de aguas residuales.

En el desarrollo de este trabajo de tesis se ha comprobado que la cepa de *Dunaliella salina* proveniente del ambiente hipersalino que constituye la depresión de Salinas Chicas, es un organismo "robusto" que permite su manipulación tanto para ensayos sobre su fisiología, como para la evaluación de sus posibilidades de aplicación a problemas de importancia regional.

El escalado de las experiencias a niveles piloto e industrial es en general el paso siguiente para evaluar perspectivas regionales de desarrollo y que debería llevarse a cabo con participación de empresas u organismos involucrados en la promoción de actividades productivas.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen A.J., Eimhjellen K.E., Liaaen-Jensen S. 1969. An extreme source of β -carotene. *Act. Chim. Scand.*, **23**: 2544 – 2545.
- Abdel Hameed M.S., Hammouda O. 2007. Review: Biotechnological potential uses of immobilized algae. *Int. J. Agric. Biol.*, **9**: 183-192.
- Acién Fernández F.G., García Camacho F., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J.M., Molina Grima E. 1997. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotech. and Bioeng.* **55**: 701-714.
- Aguilar C. P., González M., Cifuentes A., Silva M. 2004. Growth and accumulation of total carotenoids in two satrains of *Dunaliella salina* Teod. (Chlorophyceae) from the Northern and Central coast of Perú. *J. Chil. Chem. Soc.*, **49**: 69 - 74.
- Aizawa K, Miyachi S. 1984. Carbonic anhydrase located on the cell surface increases the affinity for inorganic carbon in photosynthesis of *D. tertiolecta*. *FEBS Lett.*, **173**: 41 – 44.
- Akhtar N., Iqbal J., Iqbal M. 2003. Microalgal-luffa sponge immobilized disc: a new efficient biosorbent for the removal of Ni(II) from aqueous solution. *Lett. in Appl. Microb.*, **37**: 149 – 153.
- Alcocer J., Escobar E. 1992. La producción primaria en aguas athalasohalinas. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, **43**: 101-108.
- APHA, AWWA, WPCF. (Am. Public Health Ass., Am. Waterworks Ass., Water Pollution Control Fed.). 1998. *Standard Methods for Examination of Water and Sewage and Wastewater*. (20a ed.). New York.
- Araneda, P., Jiménez, C., Gómez-Silva, B., 1992a. Microalgae from Northern Chile: III. Growth and β -carotene content of three isolates of *Dunaliella salina* from the Atacama Desert. *Rev. Biol. Mar. Valparaíso*, **27**, 157– 162.
- Araneda, P., Tapia, I., Gómez-Silva, B., Tapia, L., 1992b. Microalgae from Northern Chile: II. Cultivo en medios de bajo costo de dos cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) nativas del desierto de Atacama. *Estud. Oceanol.* **11**, 53 – 59.
- Artari A. 1914. Zur Physiologie der Chloromonaden. II Einige neue Versuche und Beobachtungen. *Jb Wiss Bot.*, **53**: 527-530.

- Ávila E., 2005. "Bio-remoción de Cr (VI) por la microalga *Dunaliella salina*". Tesina de grado Licenciatura en Química. Dpto de Química. UNS.
- Avron M., Edelstein S., Ben-Amotz A. 1987. *Feed supplement*. UK Patent Application Number 2189675A.
- Avron M., Ben-Amotz A. 1993. *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, 344pp.
- Ayala F. 2004. Producción industrial y semi-industrial de microalgas, Desarrollo y Perspectivas en America Latina. *I Congreso Latinoamericano sobre Biotecnología Algal*. Buenos Aires. Argentina.
- Azov Y. Goldman J.C. 1982. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive culture. *Appl. Env. Microbiol.*, **43**: 735-739.
- Baas-Becking L.G.M. 1931. Salt effects on swarms of *Dunaliella viridis* Teod. *J Gen Physiol.*, **14**: 765-779.
- Banu S.K., Samuel J. B., Arosh J. A., Burghardt R. C., Aruldas M. M. 2008. Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing Wistar rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **232**:180-189.
- Barbosa M.J. 2003. Microalgal photobioreactors: Scale-up and optimisation. *Ph D Thesis*, Wageningen University. Wageningen, Holanda. 247pp.
- Barceloux D.G., 1999. Chromium. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **37**, 173-194.
- Ben Amotz A. 1975. Adaptation of the unicellular alga *Dunaliella parva* to saline environment. *J. Phicol.*, **11**: 44-59.
- Ben-Amotz A. 1980. Glycerol production in the alga *Dunaliella*. *En: San Pietro A (ed.) Biochemical and photosynthetic aspects of energy production*. Academic Press, New York, 191-208.
- Ben-Amotz A. 1987. Effects of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *D. bardawil* (Volvocales, Chlorophyta). *J. Plant Physiol.*, **131**: 479 - 487.
- Ben-Amotz A., Avron M. 1973a. The role of glycerol in the osmotic regulation in the halophilic alga, *Dunaliella parva*. *Plant Physiol.*, **51**: 875-878.
- Ben-Amotz A., Avron M. 1973b. NADP specific dihydroxyacetone reductase from *Dunaliella parva*. *FEBS Lett.*, **29**: 153-155.
- Ben-Amotz A., Avron M. 1983. On those factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *D. bardawii*. *Plant. Physiol.*,

72: 593 – 597.

- Ben-Amotz A., Avron M. 1987. The biotechnology of mass culturing of *Dunaliella* for products of commercial interest. En: Cresswell RC, Rees TAV, Shah N. editors. *Algal and cyanobacterial technology*. London: Longman. p. 90-114.
- Ben-Amotz A., Avron M. 1989. The wavelength dependance of massive carotene synthesis in *Dunaliella bardawii* (Chlorophyceae). *J Phycol.*, **25**: 175 – 177.
- Ben-Amotz A., Avron M. 1982. The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol, β -carotene and high-protein feed. En: San Pietro A (ed) *Biosaline research: A look to the future*. Plenum, New York, pp 207–214.
- Ben-Amotz A, Katz A, Avron M. 1982a. Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *D. bardawii* (Cholorophyceae). *J. Phycol.*, **18**: 529 – 537.
- Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. 1988. Stereoisomers of B-carotene and phytoene in the alga *D. bardawil*. *Plant Physiol.* **86**: 1286 – 1291.
- Ben-Amotz A, Shaish A, Avron M. 1989. Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *D. bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.*, **91**: 1040 – 1043.
- Ben-Amotz A., Sussman I., Avron M. 1982. Glycerol production by *Dunaliella*. *Experientia*, **38**: 49 - 52.
- Ben-Amotz A, Edelstein S, Avron M. 1986. Use of β -carotene and phytoene in the alga *D. bardawil* as a source of retinol. *Brit. Poult. Sci.*, **27**: 613 – 619.
- Bengoa J. 2000. *Historia del Pueblo Mapuche (Siglo XIX y XX)*. LOM Ediciones. Buenos Aires. 423 pp.
- Bilanovic D., Shelef G., Sukenik A. 1988. Flocculation of microalgae with cationic polymers: effects of medium salinity. *Biomass*, **17**: 65 - 76.
- Blackwell J.R., Gilmour D.J. 1989. Determination of volume of *Dunaliella* cell by Lithium dilution measurements and derivation of internal solute concentrations. *J of Exp Bot.*, **40**: 795 - 802.
- Blanchard R. 1891. Résultats d'une excursion zoologique en Algérie. Mém. de la Soc. Zool. de France IV.
- Blanchemain A., Grizeau D. 1999. Increased production of eicosapentaenoic acid by *Sketonema costatum* cell after decantation at low temperature. *Biotechnol. Tech.*, **13**: 497 - 501.
- Bloch M.R., Sasson J., Ginzburg M. E., Goldman Z., Ginzburg B.Z., Garti N., Perath A. 1982. Oil products from algae. US Patent Number 4341038.

- Borowitzka L.J. 1981a. The microflora. Adaptations to life in extremely saline lakes. *Hydrobiologia*, **8**: 33 – 46.
- Borowitzka L.J. 1981b. Solute accumulation and regulation of cell water activity. En: Paleg, Aspinall (eds.), *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney, 97 – 130.
- Borowitzka M. A. 1988. Algal growth media and sources of cultures. En: Borowitzka M. A, Borowitzka L.J. (eds.), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, 456–465.
- Borowitzka M. A., Borowitzka L. J. 1988b. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *D. salina*. En: Stadler, Mollion, Berdus, Karamanos, Morvan, Christiane(eds.). *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, Barking, 139–150.
- Borowitzka L. J., Borowitzka M. A. 1989a. β -carotene (Provitamin A) production with algae. En: Vandamme E.J. (ed.). *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*. Elsevier Applied Science, London, 15 – 26.
- Borowitzka L. J., Borowitzka M. S. 1989b. Industrial production: methods and economics. En: Cresswell, Rees, Shah(eds.) *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Longman Scientific, London, 294 – 316.
- Borowitzka L. J., Borowitzka M. A., Moulton T. 1984. Mass culture of *Dunaliella*: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia*, **116/117**: 115 – 121.
- Borowitzka L. J., Brown A. D. 1974. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga *Dunaliella*. The role of glycerol as a compatible solute. *Arch. Microbiol.*, **96**: 37 - 52.
- Borowitzka M. A, Huisman J. M. 1993. The ecology of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae,Volvocales). Effect of environmental conditions on aplanospore formation. *Bot. Mar.*, **36**: 233 – 243.
- Borowitzka M. A., Kessley D. S., Brown A. D. 1977. The salt relations of *Dunaliella*. *Arch. Microbiol.*, **113**: 131 - 138.
- Borowitzka L. J, Moulton T. P., Borowitzka M. A. 1985. Salinity and the commercial production of beta-carotene from *D. salina*. *Nova Hedw. Beih.* **81**: 217 – 222.
- Borowitzka M. A., Post F, Borowitzka L. J. 1982. The life cycle of *D. salina*. *Australasian Soc. for Phycol. and Aquatic Bot., Annual Meeting*: 18.
- Borowitzka M. A., Siva C. J. 2007. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta,Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic

- species. *J Appl Phycol.*, **19**: 567 – 590.
- Bougis P. 1974. *Ecologie du Plancton Marin: Le phitoplancton*. Masson et Cie. Paris. 196pp.
- Brock T. D. 1979. Ecology of saline lakes. En: *Strategies of Microbial Live in Extreme Environments*. M.Shilo (ed.), Weinheim,Verlag-Chemie. Pp. 29-47.
- Brown A. D., Goyal A., Larsen H., Lilley R. M. 1987. A salt-sensitive mutant of *D. tertiolecta*. A role of carbonic anhydrase. *Arch. Microbiol.*, **147**: 309 –314.
- Burton G. W., Ingold K. U. 1984. β -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **224**: 569 – 573.
- Butcher R. W. 1959. An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part. I Introduction and Chlorophyceae. *Fishery Invest. London Ser.*, **4**: 1-74.
- Butcher R. W. 1959. An undescribed species of *Dunaliella* from the Cambridge collection of algae. *Hydrobiologia*, **12**: 249–250.
- Cannell R. J. P. 1990. Algal biotechnology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **26**: 85-105.
- Cañizares-Villanueva R. O., Ríos-Leal E., Olvera Ramirez R., Ponce Noyola T. Marquez-Rocha F. 1998. Fuentes Microbianas de Pigmentos. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **40**:87-107.
- Carvalho A. P., Meireles L. A., Malcata F.X. 2006. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* **22**:1490–506.
- Cavara F. 1906. Alcune osservazione sulla *Dunaliella salina* (Teod.) delle saline di Cagliari. *Rend della R. Acad delle Sc. Fis e Mat. di Napoli Ser. 3*.
- Chacón C., Andrade C., Cárdenas C., Araujo I., Morales E. 2004. Uso de *Chlorella sp* y *Scenedesmus sp* en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Bol. Centro Invest. Biol.*, **38**: 98 – 108.
- Chapman V., Chapman D. J. 1980. *Seaweeds and their uses*. (3ra ed.) Chapman and Hall, New York. 334 pp.
- Chardard R. 1987. L'infrastructure du plasmalemme de *Dunaliella bioculata* (algue verte) mise en evidence d'un cell coat; essay de localisation des charges négatives. *Cryptogam Algol.*, **8**: 173–189.
- Chardard R. 1990. Nouvelles observations sur la structure et la composition du cell-coat de *Dunaliella bioculata* (Algue verte). *Cryptogam. Algol.*, **11**: 137-152.
- Chaumont D., Thepenier C., Gudin G., Junjas C. 1988. Scaling up a tubular

- photoreactor for continuous culture of *Porphyridium cruentum* from laboratory to pilot plant (1981–1987). En: Stadler, Mollion, Verdus, Karamanos, Morvan, Christiaen (eds.). *Algal Biotech.* Elsevier Applied Science, London, 199–208.
- Chen B.J., Chi C.H. 1980. Process development and evaluation for algal glycerol production. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**: 1267-1287.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**: 294-306.
- Cifuentes A. S., González, M., Conejeros, M., Dellarossa, V., Parra, O., 1992. Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *J. Appl. Phycol.*, **4**, 111 - 118.
- Cifuentes A. S, González M. A, Inostroza I., Aguilera A. 2001. Reappraisal of the physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *J Phycol.*, **37**: 334 - 344.
- Cifuentes A. S., González M. A., Parra O. O. 1995. Métodos para el Cultivo de Microalgas de Ambientes Hipersalinos. En: *Manual de Métodos Ficológicos.* Alveal, Ferrario, Olivera y Sar. (eds.). Univ. Concepción. Chile: 251 - 274.
- Cifuentes A. S., Gonzalez, M., Parra, O., 1996a. The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Biol. Res.*, **29**, 227 - 236.
- Cifuentes A. S., González, M., Parra, O., Zuñiga, M., 1996b. Cultivo de cepas de *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, **69**, 105 - 112.
- Cifuentes A. S., González, M., Inostroza, I., Aguilera, A., 2001. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *J. Phycol.*, **37**, 334–344.
- Cifuentes A. S., González M. A., Vargas S., Hoeneisen M., González N. 2003. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biol. Res.*, **36**: 343-357.
- Colla S. A. 1989. El grano de sal. Donde se forma y se cosecha en las salinas de Tierras Argentinas. *Arch. de Cs. Biol. y Nat. Teóricas y Aplicadas.* Vol **VIII**. 173 pg.
- Contreras Gómez A., García Camacho F., Molina Grima E., Merchuk J. C. 1998.

- Interaction between CO₂-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress in the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. *Biotech. and Bioeng.* **60**:317-325.
- Cornbleet P. J., Gochman N. 1979. Incorrect least-squares regression in method-comparison analysis. *Clin. Chem.* **25**:432-438.
- Costa R. A. A. M., Koenig M. L., De Macedo S. J. 2004. Urban secondary sewage: an alternative medium for the culture of *Tetraselmis Chuii* (Prasinophyceae) y *D. viridis* (Chlorophyceae). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **47**: 451 - 459.
- Craggs R. J. Smith, V. J., McAuley P. J. 1995. Wastewater nutrient removal by marine microalgae cultured under ambient conditions in mini-ponds. *Water Sci. Technol.*, **31**: 151 - 160.
- Crist R. H, Oberholser K., Shank N., Nguyer M. 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* **13** : 1212-1217.
- Curtain C. C., Snook H. 1983. Method for harvesting algae. US Patent No. 511 135.
- Curtain C. C., West S. M., Schlipalius L. 1987. Manufacture of β -carotene from the salt lake alga *D. salina*: the scientific and technical background. *Aust. J. Biotechnol.* **1**: 51 - 57.
- Dakiky M., Khamis M., Manassra A., Mer'eb M. 2002. Selective adsorption of chromium (VI) in industrial wastewater using low-cost abundantly available adsorbents. *Advances in Environmental Research* **6**:533-540.
- Davis J. S. 1993. Biological management for problem solving and biological concepts for a new generation of solar saltworks. *Seventh Symposium on Salt*, **1**: 611-616.
- De-Bashan L. E., Bashan Y. 2004. Recente advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Res.*, **38**: 4222 - 4246.
- De-Bashan L. E, Moreno M., Hernández J. P., Bashan Y. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.* **36**: 2941-2948.
- Deepa K. K., Sathishkumar M., Binupriya A. R., Murugesan G. S., Swaminathan K., Yun S. E. 2005. Sorption of Cr(VI) from dilute solutions and wastewater by live and pretreated biomass of *Aspergillus flavus*. *Chemosphere* **62**:833-840.
- De la Noue J., De Pauw N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnol. Adv.* **6**: 725-7.

- De la Noue J., Proulx D. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewater with chitosan immobilized *Phormidium laminosum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 292-297.
- De la Noue J., Laliberté G., Proulx D. 1992. Algae and wastewater. *J. Appl Phycol.*, **4**: 247-254.
- Dodd J. C. 1986. Elements of pond design and construction. *En*: Richmond (ed.) *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press. Boca Raton, 265 – 283.
- Dönmez G., Aksu Z. 2002. Removal of Chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochemistry* **38**:751-762.
- Dönmez G., Koçberber N. 2005. Bioaccumulation of hexavalent chromium by enriched microbial cultures obtained from molasses and NaCl containing media. *Process Biochemistry* **40**:2493–2498.
- Drago E., Quirós R. 1996. The hydrochemistry of the inland waters of Argentina: a review. *Int. J. of Salt Lake Res.*, **4**: 315 - 325.
- Dunal M. F. 1837. Note sur les algues qui colorent en rouge certaines eaux des marais salants méditerranées. *Comptes Rendus de la Académie de Science.*, **15**: 585 - 587.
- Elmaleh S., Coma j., Grasmick A., Bourgade L. 1991. Magnesium induced algal flocculation in a fluidized bed. *Water Sci Technol.*, **23**: 1695-1702.
- Elmaleh S., Yahi H., Coma J. 1996. Suspended solids abatement by pH increase: upgrading of an oxidation pond effluent. *Water Res.* **30**: 2357–2362.
- Enhuber G., Gimmler H. 1980. The glicerol permeability of the plasma of the halotolerant green alga *Dunaliella parva* (Volvocales). *J. Phycol.*, **16**: 524-535.
- Eyden B. P. 1975. Light and Electron Microscope Study of *Dunaliella primolecta* Butcher (Volvocida). *J. of Eukaryotic Micr.*, **22**: 336-344.
- Faure H., Fayol V., Galabert C., Grolier P., Moel G. L., Steghens J., Kappel A. V., Nabet F. 1999. Carotenoids: 1. Metabolism and physiology. *Ann Biol Clin (Paris)* **57**:169–183.
- Febrianto J., Kosasiha A. N., Sunarso J., Ju Y., Indraswati N., Ismadji S. 2008. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials* (in press) www.elsevier.com/locate/jhazmat .
- Federov V. D., Maksimov V. N., Kromov V. M. 1968. Effect of light and temperature on primary production of certain unicellular green algae and diatoms. *Fiziol.*

- Rast.*, **15**: 640 – 651.
- Fisher M., Gokhman I., Pick U., Zamir A. 1996. A salt-resistant plasma membrane carbonic anhydrase is induced by salt in *Dunaliella salina*. *J. Biol. Chem.*, **271**: 17718-17723.
- Fisher M., Gokhman I., Pick U., Zamir A. 1997 . A structurally novel transferring-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. *J. Biol. Chem.*, **272**: 1565-1570.
- Fisher M., Pick U., Zamir A. 1994. A salt-induced 60 kilodalton plasma membrane protein plays a potential role in the extreme halotolerance of the alga *Dunaliella*. *Plant Physiol.*, **106**: 1359-1365.
- Gaarden T., Gran H. 1927. Investigations of the production of plankton in the Oslo Fjord. *Rapp. P.V.Reun.Cons.Int.Explor.Mer.* **42**:1-48.
- Garbisu C., Alkorta I., Llama M. J., Serra J. L. 2000. Immobilization of living microalgae and their use for inorganic nitrogen and phosphorous removal from water. *En: Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses*. Olguín, Sánchez, Hemández (eds.) Taylor and Francis London: 107-121.
- García Camacho F., Molina Grima E., Sánchez Mirón A. González Pascual V., Chisti Y. 2001. Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress. *Enzyme and Microbial Technology* **29**:602-610.
- García Camacho F., Contreras Gómez A., Mazzuca Sobezuk T., Molina Grima E. 2000. Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process Biochem.* **35**:1045-50.
- García González M., Manzano J. C., Moreno J., Guerrero M. G. 2000. *Bioteología del cultivo de Dunaliella salina en el Litoral Andaluz*. Viceconsejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. **Nº 16/00**.
- García González M., Moreno J., Manzano C., Florencio F. J., Guerrero M. 2005. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, **115**: 81-90.
- Garden J. S., Mitchell D. G., Mills W. N. 1980. Non-constant variance regression techniques for calibration-curve based analysis. *Anal. Chem.* **52**:2310-15.
- Gibor A. A. 1956. Some ecological relationships between phyto- and zooplankton. *Biol. Bull.*, **111**: 230-234.
- Gimmler H., Kuhn E. M., Carl G. 1978. Salinity-dependent resistance of *D. parva* against extreme temperatures. I. Salinity and thermoresistance. *Z. Pflanzenphysiol.*, **90**: 133 – 153.

- Gimmler H., Weis U., Weiss C., Kugel H., Treffny B. 1989. *D. acidophila* (Kalina) Massyuk - an alga with a positive membrane potential. *New Phytol.*, **113**: 175 - 184.
- Ginzburg M. 1987. *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.*, **14**: 93 - 183.
- Ginzburg M., Ginzburg B. Z. 1993. Effect of light intensity on adaptation of *Dunaliella* to very high salt concentrations. *J. Exp. Bot.*, **44**: 1561 - 1567.
- Golueke C. G., Oswald W. J. 1965. Harvesting and processing sewage grown planktonic algae. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **37**: 471 - 498.
- Gómez P., González M., Becerra J. 1999. Quantity and quality of β -carotene produced by two strains of *Dunaliella salina* (Teodoresco 1905) from the North of Chile. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, **44**: 463 - 468.
- Gómez P., González M. 2001. Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biol. Res.* **34**: 23 - 30.
- Gómez P. I., González M. A. 2004. Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture*, **233**: 149 - 162.
- González M. A., Parra O. O., Cifuentes A. S. 1995. Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: *Manual de Métodos Ficológicos*. Alveal, Ferrario, Olivera y Sar. (eds.). Univ. de Concepción. Chile: 275-292.
- González M. A., Gómez P., Montoya R., 1999. Comparison of PCR-RFLP analysis of the ITS region with morphological criteria of various strains of *Dunaliella*. *J. Appl. Phycol.* **10**: 573 - 580.
- González M. A., Coleman A. W., Gómez P., Montoya R., 2001. Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. *J. Phycol.* **37**: 604 - 611.
- González L. E., Canizares R. O., Baena S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biores. Techn.*, **60**: 259-262.
- González-Toril E., Llobet-Bossa E., Casamayor E. O., Amann R., Amils R. 2003. Microbial ecology of an extremely acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environm. Microbiol.* **69**:4853-4865.

- Gómez-Pinchetti, J. L., Ramazanov Z., Fontes A., García-Reina G. 1992. Photosynthetic characteristics of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Dunaliellales) in relation to β -carotene content. *J. of Appl. Phycol.* **4**:11-15.
- Grant W. D., Ross H. N. M. 1986. The ecology and taxonomy of halobacteria. *FEMS Microbiol. Letters*, **39**: 9-15.
- Grant B. R. 1968. The effect of carbon dioxide concentration and buffer system on nitrate and nitrite assimilation by *Dunaliella tertiolecta*. *J. Gen. Microbiol.*, **54**: 327 – 336.
- Grönlund E., Klang A., Falk S., Hanæus J. 2004. Sustainability of wastewater treatment with microalgae in cold climate, evaluated with energy and socio-ecological principles. *Ecological Engineering*, **22**: 155 – 174.
- Grung M., D'Souza F. M. L., Borowitzka M., Liaaen-Jensen S. 1992. Algal carotenoids 51. Secondary carotenoids 2 aplanospores as a source of (3S, 30S)-astaxanthin esters. *J. appl. Phycol.*, **4**: 165–171.
- Gudin C., Therpenier C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv. Biotechnol Processes.*, **6**: 73-110.
- Guillard R. R. L., Ryther J. H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**: 229 – 239.
- Gupta V. K., Shrivastava A. K., Neeraj Jain. 2001. Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. *Wat. Res.* Vol. 35, No. 17, pp. 4079–4085,
- Hallmann A. 2007. Algal Transgenics and Biotechnology. *En: Transgenic Plant Journal*. Global Science Books. New New York.
- Hamburger C. 1905. Zur Kenntnis der *Dunaliella salina* und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari. *Arch Protistenk.*, **6**: 111–130.
- Hatanaka Y., Inaoka K., Kobayashi O., Higashihara M., Hiyama K. 1998. Sensitivity of the surface coat of the halotolerant green alga *Dunaliella parva* (Volvocales, Chlorophyceae) to lysozyme. *Phycol Res.*, **46**: 1–147.
- Herrmann A. G., Knake D., Schneider J., Peters H. 1973. Geochemistry of modern seawater and brines from salt pans: main components and bromine distribution. *Contributions to Mineralogy and Petrology* **40**:1-24.
- Hernandez Nazario L., Quintana Cabrales M. M., Morris Quevedo H. J. 2000. *Rev. Cubana Farm.* **34**: 134-137.
- Hyams J., Chasey D. 1974. Aspects of the flagellar apparatus and associated fibrous

- microtubules in a marine alga. *Exp. Cell. Res.* **84**: 381.
- Hoshaw R. W., Malouf L. Y. 1981. Ultrastructure of the green flagellate *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae, Volvocales) with comparative notes on three other species. *Phycologia* **20**: 199.
- Iqbal M., Zafar S. I. 1993. The use of fibrous network of matured dried fruit of *Luffa aegyptiaca* as immobilizing agent. *Biotechn. Techn.*, **7**: 15–18.
- Iqbal M., Zafar S. I. 1994. Vegetable sponge as a matrix to immobilize microorganisms: a trial study for hyphal fungi, yeast and bacteria. *Lett. in Appl. Microbiol.*, **18**: 214 - 217.
- Iyer A., Mody K., Jha B. 2004. Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. *Mar. Pollut. Bull.* **49**:974–977.
- Jiang J. Q., Graham N. J. D., Harward C. 1993. Comparison of polyferric sulphate with other coagulants for the removal of algae and algae-derived organic matter. *Water Sci. Technol.*, **27**: 221-230.
- Jiménez-Pérez M. V., Sánchez-Castillo P., Romera O., Fernández-Moreno D., Pérez-Martínez C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technol.*, **34**: 392 – 398.
- Jones T. W. y Galloway R. 1979. Effects of light quality and intensity of glycerol content in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) and the relationship to cell grown osmoregulation. *J. Phicol.*, **15**: 101-107.
- Jones A. G., Ewing, C. M., Melvin, M. V. 1981. Biotechnology of solar saltfields. *Hydrobiologia* **82**: 391-406.
- Johnson M. K., Johnson E. J., MacElroy R. D., Speer H. L., Bruff B. S. 1968. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *J. Bacteriol.* **95**, 1461-1468.
- Kaçka Askin, Dönmez Gönül. 2008. Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. *Biores. Technol.*, **99**: 8348 – 8352.
- Katz A., Bental M., Degani H., Avron M. 1990. In vivo pH regulation by a Na⁺/H⁺ antiporter in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiology*, **96**: 110 – 115.
- Kessles J.Q. 1985. Hydrodynamic: focusing of motile algal cells. *Nature*, **313**: 208 – 210.
- Klain H. 1982. Industrial and commercial uses of carotenoid. *En: Britton. Goodwin(eds.). Carotenoid Chemistry and Biochemistry*. Pergamon Press,

- Oxford, 309 – 328.
- Kratochvil D., Volesky B., Demopoulos G. 1997. Optimizing Cu removal/recovery in a biosorption column. *Water Res.* **31**: 2327–2339.
- Krumbein W. E. 1985. Applied and economic aspects of Sabkha systems-genesis of salt, ore and hydrocarbon deposits and biotechnology, In: *Hypersaline Ecosystems The Gavish Sabkha*, Friedman, G.M. and Krumbein, W.E. (Eds.), Springer Verlag, Berlin, 426-436.
- Kurlansky M. 2003. Sal: historia de la única piedra comestible. Ediciones Península S.A. Madrid. 431 pp.
- Labbé A. 1925. Les cycles biologiques des *Dunaliella*. *Arch. D'Anate Microsc.* **21**: 313-399.
- Lau P. S., Tam N. F. Y., Wong Y. S. 1997. Wastewater Nutrients (N and P) Removal by Carrageenan and Alginate Immobilized *Chlorella Vulgaris*. *Envir. Technol.*, **18**: 945-951.
- Leach G., Oliveira G., Morais R. 1998. Production of a carotenoid-rich product by alginate entrapment and fluid-bed drying of *Dunaliella salina*. *J. of the Science of food and agriculture.* **76**:298-302.
- Leentvar J., Rebhun M. 1982. Effect of magnesium and calcium precipitation on coagulation–flocculation with lime. *Water Res.* **16**: 655–662.
- Lee S. J., Kim J. E., Kwon G. S., Yoon B. D., Oh H. M. 1998. Effects of harvesting method and grown stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Lett Appl. Microbiol.*, **27**: 14-18.
- Lefond J. S. 1969. Handbook of World Salt Resources. En: *Monographs in geocience*. K.K. Landes (ed). Plenum Press NY. 384pp.
- Leonardi P. I, Cáceres E. 1993. Primera cita del género *Dunaliella* para la República Argentina (Polyblepharidaceae, Clorophyta). *Bol. Soc. Argent. Bot.* **29**: 49-51.
- Leonardi P. I, Cáceres E. 1994. Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae, Clorophyta) with emphasis on the flagellar apparatus. *J. Phycol.*, **30**: 642-653.
- Leonardi P. I, Cáceres E. 1997. Light and electron microscope observations of the cycle of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae, Clorophyta). *Nova Hedwigia*, **64**: 621-633.
- Lerche W. 1937. Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch Protistenk*, **88**: 236-268.

- Liebetanz B. 1925. Hydrobiologische Studien an Kujawischen Brackwässern. *Bull. Int. Acad. Pol. Sci. Lett. Sér B*: 1-116.
- Liska A. J., Shevhenko A., Pick U., Katz A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol.*, **136**: 2806-2817.
- Loeblich L. A. 1969. Aplanospores of *Dunaliella salina* Chlorophyta. *J. Protozool.*, **16**: 22-23.
- Loeblich L. A. 1972. Studies on the brine flagellate *Dunaliella salina*. *PhD Thesis*. University of California. San Diego. 141pp.
- Loeblich L. A. 1982. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, **62**: 493 - 508.
- Lorenzen C. J. 1967. Determination of Chlorophyll and Phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 343-346.
- Loukidou M. X., Zouboulis A. I., Karapantsios T. D., Matis K. A. 2004. Equilibrium and kinetic modeling of chromium(VI) biosorption by *Aeromonas caviae*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **242**:93-104.
- Mclachlan J. 1960. The culture of *D. tertiolecta* Butcher - an euryhaline organism. *Can. J. Microbiol.*, **6**: 367 - 375.
- Mclachlan J., Yentsch C. S. 1959. Observations on the growth of *Dunaliella euchlora* in culture. *Biol. Bull. (Woods Hole)*, **116**: 461 - 471.
- Mallick N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*, **15**: 377 - 390.
- Mallick N., Rai I.C. 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*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**: 196 - 201.
- Mallick N., Rai I.C. 1994. Removal of inorganic ions from wastewater by immobilized microalgae. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**: 439-43.
- Marano F. 1976. Etude ultrastructurale de la division chez *Dunaliella*. *J. Microsc. Biol. Cell.*, **25**: 279-282.
- Marano F. 1992. Flagellar apparatus, cell motility and phototaxis. En: Avron, Ben-Amotz (eds) *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, pp17-44.
- Marano F., Santa-Maria A., Krishnaswamy S. 1985. The flagellar apparatus of *Dunaliella*: isolation of basal body-flagellar root complex. *Protoplasma*,

127: 82–92.

- Margulis L. Barghoorn E. S., Ashendorf D., Banerjee S., Chase D., Francis S., Giovanonni S., Stolz J. 1980. The microbial community in layered sediments at Laguna Figueroa. Baja California. México: Does it have Precambrian analogues? *Precambrian Research.*, **11**: 93-123.
- Markovits A., Gianelli M. P., Conejeros R., Erazo S., 1993. Strain selection for β -carotene production by *Dunaliella*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 534 – 537.
- Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., S. de Jong, Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J. 1997. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. 886pp.
- Massyuk N. P. 1965. Effect of Na, Mg, Cl and SO₄ ions on growth, reproduction and carotene production in *D. salina*. Teod. *Ukr. Bot. Zh.* **22**: 3 – 11.
- Massyuk N. P. 1966. Mass culture of the carotene containing alga *Dunaliella salina* Teod. *Ukr. Bot. Zh.* **23**: 12 – 19.
- Massyuk N. P. 1969. A new species of the genus *Dunaliella* Teod. *Ukr Bot Zh*, **26**: 87 – 90.
- Massyuk N. P. 1971. New species of *Dunaliella* with asymmetric cells. *Ukr Bot Zh.*, **28**: 148 - 157.
- Massyuk N. P. 1972. Phylogeny and taxonomy of the genus *Dunaliella*. *Ukr Bot Zh.*, **29**: 744 – 749.
- Massyuk N. P. 1973a. New taxa of the genus *Dunaliella* Teod. II. *Ukr Bot Zh.*, **30**: 345 - 354.
- Massyuk N. P. 1973b. New taxa of the genus *Dunaliella* Teod. I. *Ukr Bot Zh.*, **30**: 175 - 181.
- Massyuk N. P. 1973c. Morphology, Taxonomy, Ecology and Geographic Distribution of the Genus *Dunaliella* Teod. and Prospects for its Potential Utilization. *Naukova Dumka*, Kiev, 242pp.
- Massyuk N. P., Radchenko M.I. 1973. New taxa of the genus *Dunaliella* Teod. III. *Ukr Bot Zh.*, **30**: 470 – 471.
- McAlice B. J. 1971. Phytoplankton sampling with the Sedgwick-Rafter cell. *Limnol. and Oceanogr.*, **16**: 19 - 28.
- Melkonian M., Preisig H. R. 1984. An ultrastructural comparison between *Spermatopsis* and *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Pl Sys Evol.*, **164**: 31 – 46.
- Melo W. D. 2007. Orígenes morfológicos. En: *Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca*.

- 3ra. Edición, Piccolo, Hoffmeyer (eds). EdiUNS. Bahía Blanca, 233 pp.
- Mil'ko E. D. 1962. Study of the requirement of two *Dunaliella* spp in mineral and organic components of the medium. *Moscow Univ. Vset., Biol.*, **6**: 21 -23.
- Mil'ko E. D. 1963. Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. *Mikrobiologiya*, **32**: 299 - 307.
- Mironyuk V. I., Einor L. O. 1968. Oxygen exchange and pigment content in various forms of *Dunaliella salina* Teod. under conditions of increasing NaCl content. *Gidrobiol Zhournal*, **4**: 23 - 29.
- Miravalles A. B., Leonardi P. I. 1999. Optimization of culture conditions of an argentine strain of *Dunaliella salina* (Clorophyta), for the synthesis of β -carotene. En: *Agr. Prod., Post Harvest Thecniques, Biotechnology*. Giberti, Craker, Lorenz, Mathé, Giulietti (eds). *ISHS. Acta Horticulturae*, **502**: 153 -156.
- Mishra A., Mandoli A., Jha B. 2008. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**:1093-1101.
- Mogni A. C. 1991. Los cuerpos salinos, un recurso de zonas áridas. *Acaecer* **117**: 16 - 18.
- Mohn F. H. 1988. Harvesting of micro-algal biomass. En: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds.), *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge, 395 - 414.
- Molina Grima E., Ación Fernández F. G., García Camacho F., Camacho Rubio F., Chisti Y. 2000. Scale-up of tubular photobioreactors. *J. of Appl. Phycol.* **12**:355-368.
- Montoya H., Olivera A. 1993. *Dunaliella salina* from saline environments of the central coast of Peru. *Hydrobiologia*, **267**: 155 - 161.
- Morales J., de la Noue J., Picard G. 1985. Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. *Aquaculture Eng.* **4**:257-270.
- Moulton T. P., Sommer T. R., Burford M. A., Borowitzka L. J. 1987. Competition between *Dunaliella* species at high salinity. *Hydrobiologia* **151/152**: 107 - 116.
- Munoz R., Guieysse B. 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res.* **40**:2799-815.
- Murphy, J. and J. Riley, 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **27**: 31-36.

- Nakas J. P., Schaedle M., Parkinson C. M., Coonley C. E., Tanenbaum S. W. 1983. System Development for Linked-Fermentation Production of Solvents from Algal Biomass. *Appl. and Environm. Microb.* **46**:1017-1023.
- Nash T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by mean of the Hantzsch reaction. *Biochem J.* **55**:416-421.
- Neenan, B., Feinberg, D., Hill, A., McIntosh, R., Terry K. 1986. *Fuels from Microalgae: Technology Status, Potential, and Research Requirements*. SERI/SP-231-2550, Solar Energy Research Institute, Golden, Co. 149 pp.
- Nicolai E., Baas-Becking L. G. M. 1935. Einige Notizen über Salzflagellaten. *Arch Protistenk.*, **85**: 319 – 328.
- Nigam B. P., Ramanathan P. K., Venkataraman L. V. 1980. Application of chitosan as a flocculant for the culture of the green alga: *Scenedesmus acutus*. *Arch. Hydrobiol.* **88**:378-87.
- Nonomura A. M. 1987. Process for producing a naturally derived carotene-oil composition by direct extraction from algae. US Patent Number 4680314.
- Ogbonna J. C., Tomiyama S., Liu Y., Tanaka H. 1997. Efficient production of ethanol by cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *J. of Ferm. and Bioeng.*, **84**: 271 – 274.
- Ogbonna J. C., Mashima H., Tanaka H. 2001. Scale-up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology* **6**, 1-8.
- Olaizola M. 2003. Commercial development of micro algal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* **20**:459-466.
- Olguín E. J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, **22**: 81 - 91.
- Oliveira L., Bisalputra T., Antia N. J. 1980. Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New Phytol.*, **85**: 385 – 392.
- Oren A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, **1**: 1 – 14.
- Oren A. 2002. *Halophilic Microorganisms and their Environments*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Oren A., Stambler N., Dubinsky Z. 1992. On the red coloration of saltern crystallizer ponds. *Int. J. Salt Lake Res.* **1(2)**, 77-89.
- Oswald W. J. 1963. High rate ponds in waste disposal. *Dev. Ind. Microbiol.* **4**: 112 -

119.

- Oswald W. J. 1988. Large scale culture systems: engineering aspects. *En: Microalgal biotechnology*. Borowitzka M, Borowitzka L,(eds.). Cambridge University Press. Cambridge (UK) pp. 357 - 392.
- Paniagua-Michel J. 1995. Cultivos masivos de microalgas en: Manual de Métodos Ficológicos. Alveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C., y Sar E. (eds). Universidad de Concepción. Concepción Chile. 863pp.
- Pedersen K., Nilsson E., Arlinger J., Hallbeck L., O'Neill A. 2004. Distribution, diversity and activity of microorganism in the hyper-alkaline spring water of Maqarin in Jordan. *Extremophiles* **8**:151-164.
- Peterfi L. S., Manton I. 1968. Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Artari emend. (*Stephanoptera gracilis* (Artari) Wisl., with some comparative observations on *Dunaliella* sp. *Brit. Phycol. Bull.*, **3**: 423 - 440.
- Peto R., Doll R., Buckley J. D., Sporn M. B. 1981. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?. *Nature*, **290**: 201 - 208.
- Phadwal K., Singh P. K. 2003a. Isolation and characterization of an indigenous isolate of *Dunaliella* sp. for β -carotene and glycerol production from a hypersaline lake in India. *J. of Basic Microbiol.*, **43**: 423 - 429.
- Phadwal K., Singh P. K. 2003b. Effect of nutrient depletion on b-carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresour. Technol.* **90**: 55 - 58.
- Pick U., Zeelon O., Weiss M. 1991. Amine accumulation in acidic vacuoles protects the halotolerant alga *Dunaliella salina* against alkaline stress. *Plant Physiology* **97**:1226 - 1233.
- Polle J. E. W., Struwe L., Jin E. 2008. Identification and characterization of a new strain of the unicellular green alga *Dunaliella salina* (Teod.) from Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**: 821 - 827.
- Post F. J., Borowitzka L. J., Borowitzka M. A., Mackay B., Moulton T. 1983. The protozoa of a Western Australian hypersaline lagoon. *Hydrobiologia.*, **105**: 95 - 113.
- Potts W. T. 1987. Extraction of carotenoid pigments from algae. Australian Patent Number 69260/87.
- Ramazanov Z. M., Klyachko-Gurvich G. L., Ksenofontov A. L., Semenenko V. E. 1988. Effect of suboptimal temperature on content of β -carotene in the halophilic

- alga *D. salina*. *Fiziol. Rast.*, **35**: 864 – 869.
- Rao P. S. N., Chauhan V. D. 1984. On occurrence and growth of *Dunaliella* from India. I. Enriched seawater for mass culture of the alga. *Phykos*, **23**: 33 –37.
- Richmond A., Becker E. W. 1986. Technological aspects of mass cultivation, a general outline. En: *CRC Handbook of microalgal mass culture*. Richmond (ed). Boca Raton.
- Rose P. D., Maart B. A., Phillips T. D., Tucker S. L., Cowan A. K., Rowswell R. A. 1992. Cross-flow ultrafiltration used in algal high rate oxidation pond treatment of saline organic effluents with the recovery of products of value. *Wat. Sci. Tech.*, **25**: 319 - 327.
- Roubicek R. V., Cunningham G., White-Hosford L., Patton J. T. 1986. Growth Characteristics of *Dunaliella salina*. *Nova Hedwigia*, **83**: 70 - 74.
- Ruane M. 1974a. Extraction of caroteniferous material from algae. Australian Patent Number 487018.
- Ruane M. 1997. Extraction of caroteniferous materials from algae. Australian patent. Nº 7,239,574.
- Ruane M. 1974b. Recovery of algae from brine suspensions. Australia Patent Number 486999.
- Ruegg R. 1984. Extraction process for beta-carotene. US Patent Number 4439629.
- Sadka A., Himmelhoch S., Zamir A. 1991. A 150 kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green algae *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.*, **95**: 822 - 831.
- Saeed A., Iqbal M. 2006. Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system. *World J. of Microbiol. & Biotechnol.* **22**: 775 – 782.
- Samanamud A. 1998. Crecimiento e historia de vida de *Dunaliella salina* de las salinas de los Chimus, Ancash y de Chilca. Lima Perú. En: De Paula, Coreldiro-Marino, Santos, Plastino, Fujji, Yodota (eds), *Anais do IV Congresso Latino-Americano, II Reuniao Iberio-Americana, VII Reuniao Brasileira de Ficología*. Vol II. Caxambu, Brazil, pp 309-324.
- Sammy N. 1987. Method for harvesting algae. Australian Patent Number 70924/87.
- Sánchez Mirón A., Contreras Gómez A., García Camacho F., Molina Grima E., Chisti Y. 1999. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *J Biotechnol.* **70**:249–70.

- Sánchez Mirón A., García Camacho F., Contreras Gómez A., Molina Grima E., Chisti Y. 2000. Bubble column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE J* **46**:1872–87.
- Sánchez Mirón A., Cerón García M. C., Contreras Gómez A., García Camacho F., Molina Grima E., Chisti Y. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.* **16**:287–97.
- Sánchez Porro C., Martín S., Mellado E., Ventosa A. 2003 Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol.* **94**:295-300.
- Semenenko V. E., Abdullayev A. A. 1980. Parametric control of β -carotene biosynthesis in *D. salina* cells under conditions of intensive cultivation. *Fiziol. Rast.*, **27**: 31 – 41.
- Shelef G. 1978. Photosynthetic biomass production from sewage. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **11**:3-14.
- Shirai F., Kunii K., Sato C., Teramoto Y., Mizuki E., Murao S., Nakayama S. 1998. Cultivation of microalgae in the solution from the desalting process of soy sauce waste treatment and utilization of the algal biomass for ethanol fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**: 839 – 842.
- Siegel B. Z., Siegel S. M., Speitel T., Waber J., Stoeker R. 1984. Brine organisms and the question of habitat-specific adaptation. *Origins of Life*, **14**: 757 – 770.
- Singh E., Babcock R., Radway J. 2000. Photobioreactor Modification for *Dunaliella salina*.
- Singh S, Kate B. N, Banerjee U. C. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol.* **25**:73–95.
- Sosik H. M., Mitchell G. B. 1994. Effects of temperature on growth, light absorption, and quantum yield in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.*, **30**: 833 - 840.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. of Biosc. and Bioeng.*, **101**: 87 - 96.
- Strickland J. D. H. y Parsons T. R. 1972. A Practical Handbook of Sea Water Analysis. 2nd Ed. *Bull. Fich. Res. Bd. Canadá.* 268pp.
- Sukenik A. y Shelef G. 1984. Algal autoflocculation: verification and proposed mechanism. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**: 142 - 147.

- Suresh B, Ravishankar G. A. 2004. Phytoremediation — a novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit. Rev. Biotechnol.* **24**:97–124.
- Suñe L. N. 2007. Sorción de Cr y Cd por Macrófitas. Tesis doctoral Universidad Nacional del Litoral. 221pp.
- Taherzadeh M. J., Adler, L., Liden, G., 2002. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol—a review. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **31**, 53 – 66.
- Talbot P., de la Noüe J. 1993. Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Wat. Res.* **27**: 153 – 159.
- Tampion J., Tampion M. D. 1987. Immobilized cells. Principles and applications, pp: 257. *Cambridge University Press*. Cambridge, UK.
- Tang E. P. Y., Vincent W. F., Proulx D., Lessard P., de la Noüe J. 1997. Polar cyanobacteria versus green algae for tertiary waste-water treatment in cool climates. *J. Appl. Phycol.*, **9**: 371–381.
- Teodoresco E. C. 1905. Organisation et developpement du *Dunaliella* nouveau genre de Volvocaceae-Polyblepharidée. *Bot. Zentralbl. Beih.*, **18**: 215 - 232.
- Teodoresco E. C. 1906. Observations morphologiques et biologiques sur le genre *Dunaliella*. *Rev.Gen. Bot.*, **118**: 353 – 371.
- Terao J. 1989. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoid in solution. *Lipids*, **24**: 659 – 661.
- Thakur A., Kumar H. D. 1999. Nitrate, Ammonium and Phosphate Uptake by the immobilized Cells of *Dunaliella salina*. *Bull. Env. Cont. and Toxicol.***62**:70-78.
- Thakur A., Kumar H. D., Cowsik S. M. 2000. Effect of pH and inorganic carbon concentration on growth, glycerol production, photosynthesis and dark respiration of *Dunaliella salina*. *Cytobios* 102:69–74.
- Tohá J., Soto M. A., Cuadros X. 1990. Waste water treatment using saline cultures of microalgae. *Biotechn. Techn.*, **4**: 441 – 444.
- Travieso L., Benitez F., Weiland P., Sanchez E., Dupeyron R., Dominguez A. R. 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Biores. Technol.*, **55**: 181 – 186.
- Tredici M.R. 1999. Bioreactors, photo. En: Flickinger MC, Drew SW (eds) *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation biocatalysis and bioseparation*. Vol 1. Wiley, New York, pp 395 – 419.
- Tredici M. R., Materassi R. 1992. From open pond to alveolar panel: the Italian

- experience. *J. Appl. Phycol.*, **4**: 221 - 230.
- Trépanier C., Parent S., Comeau Y., Bouvrette J. 2002. Phosphorus budget as a water quality management tool for closed aquatic mesocosms. *Water Res.* **36**: 1007-1017.
- Tsukada O., Kawahara T. 1997. Mass culture of chlorella in Asian countries. In: Mitsui A, Miyachi S, San-pietro A, Tamija H (ed) Biological solar energy conversion. Academic Press, New York, p 363.
- Van Auken O.W., McNulty I.B. 1973. The effect of environmental factors on the growth of a halophilic species of algae. *Biol. Bull. Woods Hole.* **145**: 210 - 222.
- Veglio F., Beolchini F. 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* **44**:301 -316.
- Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:504-544.
- Verdouw H., van Eghteld C.J.A., Dekker E.M.J. 1978. Ammonia determination based in indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.*, **12**:399-402.
- Vieira R. H. S. F., Volesky B. 2000. Biosorption: a solution to pollution? *Internatl. Microbiol.* **3**:17-24.
- Vilchez C., Garbayo I, Lobato M.V., Vega J.M. 1997. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enz. Micr. Technol.*. **20**: 562-572.
- Villegas L. B., Fernández P. M., Amoroso M. J., de Figueroa L. I. 2008. Chromate removal by yeasts isolated from sediments of a tanning factory and a mine site in Argentina. *Biometals* **21**:591-600.
- Vorst P., Baard R. L., Mur L. R., Korthals H. J., Van D. 1994. Effect of growth arrest on carotene accumulation photosynthesis in *Dunaliella*. *Microbiol.* **140**:1411-1417.
- Wang X. D., Krinsky N., Benotti P. 1994. Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from 9-cis- β -carotene in human intestinal mucosa in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **313**:150-155
- Wangersky P. J., Maass L. 1988. Diurnal behaviors of cultures of *D. tertiolecta*. *J. Plankt. Res.*, **10**: 327 - 329.
- Watanabe S. 1983. New and interesting green algae from soils of some Asian and Oceanian regions. *Arch Protistenk*, **127**: 223 - 270.
- Watanabe S., Floyd G. L. 1989. Variation in the ultrastructure of the biflagellate motile cells of six unicellular genera of the Chlamydomonadales and Chlorococcales (Chlorophyta), with emphasis on the flagellar apparatus.

- Am. J. Bot.*, **76**: 307 – 317.
- Williams W. D. 1981. Inland salt Lakes: an introduction. *Hydrobiology* **91**:1-14.
- Yahi H., Elmaleh S., Coma J. 1994. Algal flocculation-sedimentation by pH increase in a continuous reactor. *Water Sci. Technol.*, **30**: 259 - 267.
- Zeballos E. 1961. Calfucurá y la dinastía de las Piedras. Ed. Hachette. Bs.As.
- Zenvirth D., Kaplan A. 1981. Uptake and efflux of inorganic carbon in *Dunaliella salina*. *Planta*, **152**: 8 - 12.
- Zhu Y. H., Jiang J. G. 2008. Continuous cultivation of *D. salina* in photobioreactor for the production of β -carotene. *Eur. Food Res. Technol.* **227**: 953 - 959.