

# PHOTOSYNTHETIC CHARACTERISTICS AND GROWTH OF ALGINATE-IMMOBILIZED *Scenedesmus obliquus*

## CARACTERÍSTICAS FOTOSINTÉTICAS Y CRECIMIENTO DE *Scenedesmus obliquus* INMOVILIZADA EN ALGINATO

Alejandro Ruiz-Marín<sup>1\*</sup>, Leopoldo G. Mendoza-Espinosa<sup>2</sup>, M. del P. Sánchez-Saavedra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Ciudad del Carmen. 24180. Calle 56 #4. Avenida Concordia. Ciudad del Carmen, Campeche, México. (aruiz@pampano.unacar.mx). <sup>2</sup>Oceanographic Research Institute, Universidad Autónoma de Baja California. 22800. Km. 107 Tijuana-Ensenada Road, Baja California, México. (lmendoza@uabc.mx). <sup>3</sup>Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Carretera Ensenada a Tijuana 3918, Zona Playitas, Ensenada, Baja California, México. (psanchez@cicese.mx).

### ABSTRACT

The microalgae *Scenedesmus obliquus* was immobilized in Ca-alginate beads at two stocking cell densities ( $6.7 \times 10^5$  and  $1.5 \times 10^6$  cell bead<sup>-1</sup>). The photosynthetic rate ( $P$ ), the initial slope of the photosynthesis ( $\alpha$ ), and the threshold for irradiance-saturated photosynthesis ( $E_k$ ) were determined; later, the growth and protein content for *S. obliquus* immobilized in beads-alginate under two light intensities (135 and 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) was evaluated using stocking cell densities that had previously presented the largest photosynthetic rate. Results showed that photosynthetic rates ( $P$ ) and  $\alpha$  of cells immobilized in beads at low stocking density (0.14  $\mu\text{mol O}_2 \text{h}^{-1} 10^{-6}$  cells and 0.00056) were greater than in beads with high stocking density (0.02  $\mu\text{mol O}_2 \text{h}^{-1} 10^{-6}$  cells and  $5 \times 10^{-5}$ ). Therefore, the beads at low stocking density were selected to be cultured under two light intensities (135 and 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Both irradiances showed no significant differences on growth rates (0.157 d<sup>-1</sup> and 0.172 d<sup>-1</sup>) and protein content (15-16 % of dry-weight biomass), which represents only around 5.14-4.73 mg L<sup>-1</sup> as N-protein of the total nitrogen removed from medium. This suggests that the light intensity within the limitation area described in the waves P-I did not affect the growth and content of protein when low cells stocking density beads are used. Therefore, it was concluded that the light intensities selected in the present study not had significant effects in the growth and protein content in beads with low cells stocking.

### RESUMEN

La microalga *Scenedesmus obliquus* fue inmovilizada en esferas de Ca-alginato en dos densidades celulares del cultivo ( $6.7 \times 10^5$  y  $1.5 \times 10^6$  células esferas<sup>-1</sup>). Se determinó la tasa fotosintética ( $P$ ), así como la pendiente inicial de la fotosíntesis ( $\alpha$ ), y el nivel de saturación de irradiación-fotosíntesis ( $E_k$ ); después, el crecimiento y contenido de proteína para *S. obliquus*, inmovilizada en esferas de alginato bajo dos intensidades de luz (135 y 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fue evaluado usando densidades celulares del cultivo que previamente presentaron una mayor tasa fotosintética. Los resultados muestran que las tasas fotosintéticas ( $P$ ) y  $\alpha$  de células inmovilizadas en esferas a una densidad celular baja (0.14  $\mu\text{mol O}_2 \text{h}^{-1} 10^{-6}$  células y 0.00056) fueron mayores que en esferas con alta densidad celular (0.02  $\mu\text{mol O}_2 \text{h}^{-1} 10^{-6}$  células y  $5 \times 10^{-5}$ ). Por tanto, se seleccionaron las esferas con baja densidad celular para ser cultivadas en dos intensidades de luz (135 y 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Las dos irradiancias no mostraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento (0.157 d<sup>-1</sup> y 0.172 d<sup>-1</sup>) y contenido de proteína (15-16 % de la biomasa peso seco), lo que representa sólo alrededor de 5.14-4.73 mg L<sup>-1</sup> como N-proteína del total de nitrógeno removido del medio. Esto sugiere que la intensidad de la luz dentro de la zona de limitación observada en curvas P-I no afectó el crecimiento y contenido de proteína cuando se usaron esferas de baja densidad celular. Por tanto, se concluyó que las intensidades de luz seleccionadas en el presente estudio no tuvieron efectos significativos en el crecimiento y contenido de proteína en las esferas de baja densidad celular.

\*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: July, 2010. Approved: February, 2011.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 45: 303-313. 2011.

**Palabras clave:** *Scenedesmus obliquus*, fotosíntesis, contenido de proteína de células inmovilizadas.

**Key words:** *Scenedesmus obliquus*, photosynthesis, immobilized cells protein content.

## INTRODUCTION

Algal cultures have been extensively used for the tertiary treatment of wastewater (Lavoie and de la Noüe, 1985) and, under certain conditions, they may also be used for secondary treatment as an alternative to activated sludge (Tam and Wong, 2000). A topic of interest is the utilization of algal biomass, but this depends on its biochemical composition, which is affected by the nutrients concentration and culture medium composition, as well as, temperature, light intensity and wavelength. These can be manipulated during the stages of culture to improve the biomass production and biochemical composition (Sánchez-Saavedra and Voltolina, 2002). Changes in light intensity would result in variations in the pigment composition, concentrations of the components of electron transport chains, carboxylic enzyme activities, photosynthetic rates, dark respiration rates and biochemical composition (Bartual *et al.*, 2002). Each species is usually characterized by a maximum growth rate under ideal conditions of growth (Bartual *et al.*, 2002; Bouterfas *et al.*, 2002). Therefore, it is important to determine and use optimized culture conditions for the correct interpretation of the experimental results.

Light is an important variable in the design and operation of microalgae culture systems and bioreactors (Andersen, 2005). The light limitation effect in immobilized microalgae increases inside the beads as the cellular density increases with time, suggesting that microalgae located in the center of the beads have limited access to light and, as a consequence, a normal physiological activity cannot be maintained (Chevalier and de la Noüe, 1985; Tam *et al.*, 1994).

In immobilized cells cultures, light intensities commonly reported are within the range of  $95\text{--}174\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , where approximately 90-95 % of nitrogen can be removed from artificial and urban wastewater (Kaya *et al.*, 1996; Tam and Wong, 2000; Jiménez-Pérez *et al.*, 2004). However, the optimum light intensity in immobilized cultures has not been reported, as growth and content of proteins within the matrix can exist, due to light availability. Light

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos de algas se han usado ampliamente para el tratamiento terciario de aguas residuales (Lavoie y de la Noüe, 1985) y, bajo ciertas condiciones, también pueden usarse como tratamiento secundario y alternativo al de los lodos activados (Tam y Wong, 2000). Un tema de interés es la utilización de la biomasa algal, pero esto depende de su composición bioquímica, que es afectada por la concentración de nutrientes y la composición del medio de cultivo, así como por la temperatura, la intensidad de la luz y la longitud de onda. Estos pueden ser manipulados durante las etapas de cultivo para mejorar la producción de biomasa y la composición bioquímica (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002). Los cambios en la intensidad de la luz pueden significar variaciones en la composición del pigmento, en las concentraciones de los componentes de las cadenas de transporte de electrones, actividades de la enzima carboxilica, tasas fotosintéticas, tasas de respiración nocturna y composición bioquímica (Bartual *et al.*, 2002). Cada especie se caracteriza generalmente por una máxima tasa de crecimiento en condiciones ideales de crecimiento (Bartual *et al.*, 2002; Bouterfas *et al.*, 2002). Por tanto, es importante determinar y usar condiciones optimizadas de cultivo para una correcta interpretación de los resultados experimentales.

La luz es una variable importante en el diseño y funcionamiento de los sistemas de cultivo de microalgas y biorreactores (Andersen, 2005). El efecto de la limitación de la luz en las microalgas inmovilizadas aumenta dentro de las esferas al aumentar la densidad celular con el tiempo, lo cual sugiere que las microalgas situadas en el centro de las esferas tienen un acceso limitado a la luz y, como consecuencia, no es posible mantener una actividad fisiológica normal (Chevalier y de la Noüe, 1985; Tam *et al.*, 1994).

En los cultivos de células inmovilizadas, las intensidades de la luz comúnmente reportadas están dentro del rango de  $95\text{--}174\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , donde aproximadamente el 90-95 % del nitrógeno puede ser removido de las aguas residuales artificiales y urbanas (Kaya *et al.*, 1996; Tam y Wong, 2000; Jiménez-Pérez *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha reportado una intensidad óptima de la luz en los cultivos inmovilizados, ya que el crecimiento y el contenido de proteínas dentro de la matriz puede

limitation by the self-shading effect is one of the main causes affecting algae growth and their protein content in immobilized systems (Pane *et al.*, 1998). Therefore, in immobilized systems it is important to determine the appropriate amount of light in order to reach maximum levels of biomass, nutrients removal and protein content.

It is possible to reach high contents of chlorophyll and high photosynthetic rates for immobilized cells in alginate for species such as *Chlorella* sp. (Robinson *et al.*, 1986), *Botryococcus braunii* (Bailliez *et al.*, 1986) and *Chlamydomonas reinhardtii* (Vilchez and Vega, 1994). Jeanfils and Collar (1983) evaluated the oxygen evolution for the microalgae *Scenedesmus obliquus* alginate immobilized to one light intensity ( $60 \text{ W m}^{-2}$ ), and reported a similar photosynthetic rate for free and immobilized cells (200 and  $210 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-9}$  cells), concluding that the chlorophyll-protein complexes were not affected by the immobilization.

However, there are few studies about the photosynthetic characteristics of *S. obliquus* and the relation between light intensity and growth, nitrogen removal and proteins content. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the rate ( $P$ ) and photosynthetic efficiency ( $\alpha$ ) in two types of cultures: 1) high and low stocking cell density in alginate beads; 2) the biomass production and protein content of *S. obliquus* immobilized in alginate in cultures under two light intensities within the range of light limitation.

## MATERIALS AND METHODS

### Routine of culture

Stock suspension of *S. obliquus* was obtained from the culture collection of the Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México. The cells were routinely cultured in artificial wastewater under non-axenic conditions in the Water Quality Laboratory of the Institute of Oceanographic Research (Laboratorio de Calidad del Agua del Instituto de Investigaciones Oceanológicas-IIO). The composition of the artificial wastewater ( $A_w$ ) was  $7 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ,  $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ , and  $115 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  in purified water.

Artificial wastewater concentrations simulating the mean values of the secondary effluent from the Universidad Autónoma de Baja California (UABC) campus in Ensenada wastewater

ocurrir debido a la disponibilidad de luz. La limitación de luz por el efecto de auto-sombreado es una de las principales causas que afectan el crecimiento de las algas y su contenido de proteína en los sistemas inmovilizados (Panel *et al.*, 1998). Por tanto, en los sistemas inmovilizados es importante determinar la cantidad adecuada de luz para alcanzar los máximos niveles de biomasa, eliminación de nutrientes y contenido de proteína.

Es posible alcanzar contenidos altos de clorofila y tasas fotosintéticas altas en las células inmovilizadas en alginato para especies como *Chlorella* sp. (Robinson *et al.*, 1986), *Botryococcus braunii* (Bailliez *et al.*, 1986) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Vilchez y Vega, 1994). Jeanfils y Collar (1983) evaluaron la evolución del oxígeno para la microalga *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en alginato a una intensidad de la luz ( $60 \text{ W m}^{-2}$ ), y reportaron una tasa fotosintética similar para células libres e inmovilizadas ( $200$  y  $210 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-9}$  células), concluyendo que los complejos de proteínas de clorofila no fueron afectados por la inmovilización.

Sin embargo, hay pocos estudios sobre las características fotosintéticas de *S. obliquus* y la relación entre la intensidad de la luz y el crecimiento, la eliminación de nitrógeno y el contenido de proteínas. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la tasa ( $P$ ) y la eficiencia fotosintética ( $\alpha$ ) en dos tipos de cultivos: 1) densidad celular del cultivo baja y alta en esferas de alginato; 2) producción de biomasa y contenido de proteína de *S. obliquus* inmovilizado en alginato en cultivos bajo dos intensidades de luz dentro del rango de limitación de la luz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Rutina de cultivo

La suspensión de *S. obliquus* se obtuvo de la colección de cultivos del Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México. Las células se cultivaron de forma rutinaria en aguas residuales artificiales, en condiciones no axénicas, en el Laboratorio de Calidad del Agua del Instituto de Investigaciones Oceanológicas-IIO. La composición de las aguas residuales artificiales ( $A_w$ ) fue  $7 \text{ mg L}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ,  $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ , y  $115 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  en agua purificada.

Las concentraciones del agua residual artificial simulaban los valores promedio del efluente secundario de la planta de

treatment plant prepared to reach the following concentrations:  $\text{N-NH}_4^+$ :  $32.5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{N-NO}_3^-$ :  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{P-PO}_4^{3-}$ :  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Trace metals and vitamins were added according to the guidelines for medium f/2 (Guillard and Ryther, 1962). Cultures were kept at  $26 \pm 1^\circ \text{C}$  and illuminated continuously with white fluorescent tubes ( $135 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### Immobilization method

Prior to immobilization, the stock suspension of microalgae was centrifuged at 2500 rpm for 15 min and the cell pellets were washed twice with distilled water to remove the residual nutrients that might adhere to the cell surface. The cells were re-suspended in 50 mL distilled water to form a concentrated algal suspension of  $10 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$  and mixed with 50 mL of sodium alginate to yield mixtures of 2 % (w/v) Na-alginate-algal suspension. About 6500 beads of calcium alginate (2.5 mm diameter) with concentration of  $6.7 \times 10^5 \text{ cell bead}^{-1}$  and  $1.5 \times 10^6 \text{ cell bead}^{-1}$  were formed after 100 mL of Na-alginate-algal suspension were titrated into a 2 % (w/v)  $\text{CaCl}_2$  solution. The calcium alginate beads were prepared with the method described by Tam and Wong (2000).

### Photosynthetic rate estimation

Photosynthetic rates ( $P$ ) of immobilized cell cultures of *S. obliquus* were estimated with the oxygen evolution method using a Clark-type oxygen electrode (Yellow Spring Instruments, 5221, Ohio, USA) in a 7 mL custom-made Plexiglas chamber at  $28^\circ \text{C}$  and under 8 light intensities ranging from 30 to  $2490 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Two types of beads were prepared, one with stocking cell density of  $6.7 \times 10^5 \text{ cell bead}^{-1}$  (Low density) and the other with stocking cell density of  $1.5 \times 10^6 \text{ cell bead}^{-1}$  (High density). For both experiments, beads were incubated and harvested during the exponential growth phase of *S. obliquus* for the photosynthetic rates estimation.

Ten beads and stock suspensions of *S. obliquus* were incubated by triplicate and independently placed in the Plexiglas chamber with artificial wastewater ( $A_w$ ) after 15 min of pre-incubation in darkness. Maximum oxygenic photosynthesis ( $P_{\max}$ ), the initial slope of the photosynthesis ( $\alpha$ ), and the threshold for irradiance-saturated photosynthesis ( $E_k$ ) were determined by a non-linear direct fitting algorithm of the data to the exponential equation (Prioul and Chartier, 1977). The  $P$  vs.  $I$  curve indicated the specific irradiance that allows a maximum photosynthetic rate without reaching photo-inhibition. The changes in  $P_{\max}$  ratio in relation to the initial cellular density within beads allowed to reach the best conditions for the immobilized systems.

tratamiento de aguas residuales del campus de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, preparada para alcanzar las siguientes concentraciones:  $\text{N-NH}_4^+$ :  $32.5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{N-NO}_3^-$ :  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{P-PO}_4^{3-}$ :  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Se agregaron metales traza y vitaminas, de acuerdo con los lineamientos para el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962). Los cultivos se mantuvieron a  $26 \pm 1^\circ \text{C}$  e iluminados continuamente con tubos fluorescentes blancos ( $135 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### Método de inmovilización

Antes de la inmovilización, la suspensión de células de microalgas se centrifugó 15 min a 2500 rpm y el concentrado de células se lavó dos veces con agua destilada para eliminar los nutrientes residuales que podrían adherirse a la superficie celular. Las células se re-suspendieron en 50 mL de agua destilada para formar una suspensión concentrada de algas de  $10 \times 10^7 \text{ células mL}^{-1}$  y mezclada con 50 mL de alginato de sodio para producir mezclas de 2 % (p/v) de suspensión de Na-alginato-algal. Alrededor de 6500 esferas de alginato de calcio (2.5 mm de diámetro) se formaron, con una concentración de  $6.7 \times 10^5 \text{ esferas de células}^{-1}$  y  $1.5 \times 10^6 \text{ de esferas de células}^{-1}$ , después de titular 100 mL de la suspensión de Na-alginato-algal en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2 % (w/v). Las esferas de alginato de calcio se prepararon con el método descrito por Tam y Wong (2000).

### Estimación de la tasa fotosintética

Las tasas fotosintéticas ( $P$ ) de cultivos de células inmovilizadas de *S. obliquus* se calcularon con el método de liberación de oxígeno usando un electrodo de oxígeno tipo Clark (Yellow Spring Instruments, 5221, Ohio, EE.UU.), en una cámara de 7 mL de plexiglás a  $28^\circ \text{C}$  y con 8 rangos de intensidades de luz, de 30 a  $2490 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Se prepararon dos tipos de esferas: una con densidad celular del cultivo de  $6.7 \times 10^5 \text{ de esferas de células}^{-1}$  (Baja densidad) y la otra con una densidad celular de  $1.5 \times 10^6 \text{ esferas de células}^{-1}$  (Alta densidad). En ambos experimentos, las esferas se incubaron y recolectaron durante la fase de crecimiento exponencial de *S. obliquus* para estimar las tasas fotosintéticas.

Se incubaron por triplicado 10 esferas y suspensiones de células de *S. obliquus* y se colocaron independientemente en la cámara Plexiglas con aguas residuales artificiales ( $A_w$ ), después de 15 min de pre-incubación en la oscuridad. La fotosíntesis oxigénica máxima ( $P_{\max}$ ), la pendiente inicial de la fotosíntesis ( $\alpha$ ), y el nivel de saturación de irradiancia-fotosíntesis ( $E_k$ ) se determinaron por medio de un algoritmo no lineal de ajuste directo de los datos de la ecuación exponencial (Prioul y Chartier, 1977). La curva  $P$  vs.  $I$  indica la irradiancia

### Analysis of the cellular density and proteins

Reactores consisted of cylindrical transparent polyethylene terephthalate (PTFE) vessels (3 L capacity) each containing 2.5 L of  $A_w$  and approximately 6500 beads with the initial cell density previously selected from the irradiance-photosynthesis curves. Cultures of immobilized *S. obliquus* were maintained under two light intensities within the range of light-limitation zone. Each reactor was operated with a beads concentration of approximately  $2.6 \text{ beads mL}^{-1}$  of wastewater maintained at  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  and continuous illumination. All experiments were run in triplicate. The beads in each reactor were kept in suspension and mixed by means of small air diffusers through which compressed air filtered through an activated carbon filter was introduced.

Every 6 h the numbers of cells in the beads were counted with a particle analyzer model Beckman Coulter Multisizer 3, after dissolving one bead in 5 mL of 0.25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  solution (pH 7.0) in triplicate. For the determination of ash-free dry-weight biomass in beads, five beads in triplicate were dissolved in 5 mL of 0.25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  solution (pH 7.0) and filtered through a Whatman GF/C glass fiber filter (2.5 cm diameter) previously rinsed with distilled water, and incinerated at  $450^\circ \text{C}$  for 3 h to constant weight. The samples were dried in a conventional oven at  $120^\circ \text{C}$  for 2 h to constant weight, and placed at  $450^\circ \text{C}$  in a muffle furnace (Sorokin, 1973). The same procedure was used to measure the protein content of the algal biomass (Lowry *et al.*, 1951). Proteins were analyzed using a standard of bovine albumin (98 %). Protein extraction was undertaken with a NaOH 1N solution at  $100^\circ \text{C}$  and an extraction time of 90 min.

### Statistical analyses

The photosynthetic rate data in the experiments with two cellular densities in alginate beads were analyzed by analysis of variance (ANOVA). ANOVA was also used to evaluate the growth and protein content in cultures under two light intensities (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) was applied when results showed significant differences. As mentioned earlier, experiments were run in triplicate.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Activity of immobilized algae

The photosynthetic rates reached for high and low stocking density of immobilized *S. obliquus* were significantly different ( $p \leq 0.004$ ). It was observed that the photosynthetic rates for immobilized *S.*

específica que permite una tasa fotosintética máxima, sin llegar a la foto-inhibición. Los cambios en la ratio  $P_{\text{max}}$  en relación con la densidad celular inicial en las esferas permitieron alcanzar las mejores condiciones para los sistemas de inmovilización.

### Análisis de la densidad celular y las proteínas

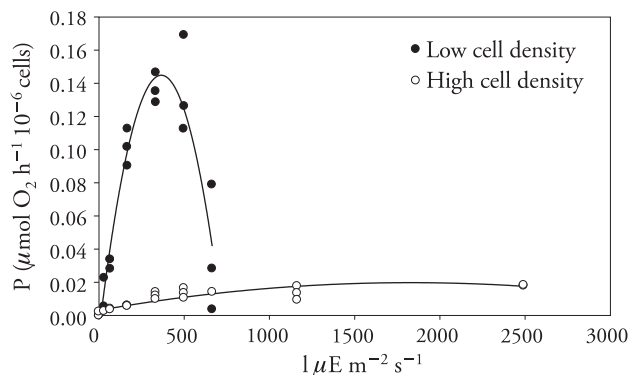
Los reactores consistieron en recipientes cilíndricos transparentes de tereftalato de polietileno (PTFE) (3 L de capacidad), cada uno con 2.5 L de  $A_w$  y aproximadamente 6500 esferas con densidad inicial de células previamente seleccionadas de las curvas de irradiancia-fotosíntesis. Los cultivos de *S. obliquus* inmovilizado se mantuvieron bajo dos intensidades de luz dentro del rango de la zona de limitación de la luz. Cada reactor fue manejado con una concentración de aproximadamente  $2.6 \text{ esferas mL}^{-1}$  de aguas residuales mantenidas a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e iluminación continua. Todos los experimentos se efectuaron por triplicado. Las esferas en cada reactor se mantuvieron en suspensiones y mezcladas por medio de pequeños difusores de aire, a través de los cuales se introdujo aire comprimido filtrado a través de un filtro de carbón activado.

Cada 6 h se determinó el número de células en las esferas con un analizador de partículas modelo Beckman Coulter Multisizer 3, después de disolver una esfera en una solución de 5 mL de 0.25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (pH 7.0) por triplicado. Para determinar la biomasa peso seco libre de cenizas en las esferas, se disolvieron cinco esferas por triplicado en 5 mL de 0.25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (pH 7.0) y se filtraron a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C (2.5 cm de diámetro), previamente enjuagadas con agua destilada e incineradas a  $450^\circ \text{C}$  por 3 h, hasta alcanzar peso constante. Las muestras se secaron 2 h en un horno convencional a  $120^\circ \text{C}$  hasta alcanzar peso constante y se colocaron a  $450^\circ \text{C}$  en una mufla (Sorokin, 1973). El mismo procedimiento se usó para medir el contenido de proteína de la biomasa algal (Lowry *et al.*, 1951). Las proteínas se analizaron usando un estándar de albúmina bovina (98 %). La extracción de proteínas se efectuó con una solución de NaOH 1N a  $100^\circ \text{C}$  y un tiempo de extracción de 90 min.

### Análisis estadísticos

Los datos de tasas fotosintéticas en los experimentos con esferas de alginato a dos densidades celulares se analizaron con el análisis de varianza (ANDEVA). También se usó ANDEVA para evaluar el crecimiento y contenido de proteínas en cultivos bajo dos intensidades de luz (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). La prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) se aplicó cuando los resultados mostraron diferencias significativas. Como ya se mencionó, los experimentos se realizaron por triplicado.

*obliquus* at low density increased until  $0.14 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6} \text{ cells}$  with respect to the irradiance followed by a short saturation zone after  $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and the decrease of the photosynthesis rate as a result of photo-inhibition over  $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figure 1). This may be caused by the previous adaptation of *S. obliquus* to low light intensities as a result of the light attenuation caused by the matrix or to the self-shadow effect (Platt and Jassby, 1976). Although fast light saturation was found at low stocking density, the initial slope ( $\alpha$ ) was higher ( $p \leq 0.05$ ) than beads at high stocking density, suggesting that cells immobilized at low stocking density had higher physiological activity (Table 1). Jeanfils and Collar (1983) reported for *S. obliquus* alginate immobilized a low photosynthetic rate ( $210 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-9}$



**Figure 1.** Mean response of photosynthetic oxygen evolution of immobilized cells (low and high cell density) to variation in light intensity. Points = samples of 10 beads by triplicate ( $n=3$ ).

**Figura 1.** Respuesta promedio de la liberación del oxígeno fotosintético en células inmovilizadas (densidad celular alta y baja) a variaciones de intensidad de la luz. Puntos = muestras de 10 esferas por triplicado ( $n=3$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad de las algas inmovilizadas

Las tasas fotosintéticas registradas para baja y alta densidad celular de *S. obliquus* inmovilizado fueron significativamente diferentes ( $p \leq 0.004$ ). Se observó que las tasas fotosintéticas del *S. obliquus* inmovilizado a baja densidad aumentaron hasta  $0.14 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6}$  células con respecto a la irradiancia, seguidas por una zona de saturación breve después de  $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y disminución de la tasa fotosintética como resultado de la foto-inhibición a más de  $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Figura 1). Esto puede ser causado por la adaptación previa de *S. obliquus* a bajas intensidades de luz, como resultado de la atenuación de la luz causada por la matriz o por el efecto del auto-sombreado (Platt y Jassby, 1976). Aunque se encontró una saturación de luz rápida se encontró en esferas con densidad celular promedio baja, la pendiente inicial ( $\alpha$ ) fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) que en las esferas a una densidad celular alta, lo que sugiere que las células inmovilizadas con densidad celular baja tuvieron mayor actividad fisiológica (Cuadro 1). Jeanfils y Collar (1983) reportaron para el *S. obliquus* inmovilizado en alginato una tasa fotosintética baja ( $210 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-9}$  células) en comparación con el presente estudio. Esta diferencia se atribuye a que la tasa fotosintética se estimó a una sola intensidad de luz ( $60 \text{ W m}^{-2}$ ) y no para un máximo obtenido a diferentes intensidades (curva de fotosíntesis), como se reporta en el presente estudio.

Las esferas con alta densidad celular mostraron un aumento de la tasa fotosintética, con un máximo

**Table 1.** Photosynthetic rate ( $P$ ) and initial slope ( $\alpha$ ) of *S. obliquus* immobilized at low and high cell density (mean  $\pm$  standard deviation;  $n=3$ ).

**Cuadro 1.** Tasa fotosintética ( $P$ ) y pendiente inicial ( $\alpha$ ) de *S. obliquus* inmovilizado a densidad celular baja y alta (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ).

| Variables                                                                  | Immobilized cells<br>Low density            | Immobilized cells<br>High density                  |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| $P_{\max}$<br>( $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6} \text{ cells}$ ) | $0.14 \pm 0.0081^b$                         | $0.02 \pm 0.0014^a$                                |
| $\alpha$<br>$E_k$ ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )                  | $0.00056 \pm 0.0001^b$<br>$200 \pm 13.22^b$ | $5 \times 10^{-5} \pm 0.002^a$<br>$500 \pm 8.32^a$ |

Means followed by different letters differ significantly ( $p \leq 0.05$ ) ♦ Los promedios con letras diferentes difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

cells) compared to the present study. This difference is attributed to the fact that the photosynthetic rate was estimated to a light intensity ( $60 \text{ W m}^{-2}$ ) and not for a maximum obtained to different intensities (photosynthetic curve) as reported in the present study.

Beads with high cell density showed an increase of the photosynthetic rate with a maximum of  $0.02 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6}$  cells at  $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , which was followed by a longer saturation zone between  $600\text{--}2500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  without reaching photo-inhibition. This could be advantageous, because the cultures can work with a wide range of intensity of light in tropical regions. However, in immobilized cells this can represent a disadvantage, as the high cell density would cause light limitation within beads followed by lower growth and nutrients removal capacity. Chevalier and de la Noüe (1985) reported that a greater number of cells within the beads reduce the nutrient removal efficiency and algal growth due to the self-shading effect. It seems as if shading effects could be overcome by increasing light on the surface, yet high irradiance causes inhibition of photosynthesis, which is not desirable in immobilized cultures.

Results in the present study suggest that cellular activity of immobilized cells decreases as stocking density increases, as noted by the lower photosynthetic rate ( $P$ ) and  $E_k$  obtained in cultures with high cell density beads (Table 1). Similar results were reported by Tam *et al.* (1994) and Robinson *et al.* (1985) for immobilized *Chlorella vulgaris*; both authors suggest that the cellular metabolic activity of immobilized *Chlorella* cells decreased as the cellular density increases.

In the analysis of P-I curves it is important to take into account the conditions of the culture, such as high cell density cultures, which may cause considerable light attenuation. The photosynthetic variables obtained for immobilized *S. obliquus* in the present study indicated a higher physiological activity for low stocking density beads than those reached in cultures with high cell density beads. On the basis of these considerations, the growth and protein content using beads with low cellular density cultivated under two intensities of light ( $135$  and  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), presented the highest photosynthetic rates and, thus, were selected to be further tested.

de  $0.02 \mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} 10^{-6}$  células a  $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , seguido por una zona de saturación prolongada entre  $600\text{--}2500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  sin llegar a la foto-inhibición. Esto podría ser ventajoso, ya que los cultivos pueden desarrollarse bajo una amplia gama de intensidad de luz en las zonas tropicales. Sin embargo, en células inmovilizadas, esto puede representar una desventaja, ya que la alta densidad de células causaría una limitación de la luz en las esferas, seguida por un menor crecimiento y capacidad de eliminación de nutrientes. Chevalier y de la Noüe (1985) reportaron que un mayor número de células dentro de las esferas reduce la eficiencia de remoción de nutrientes y el crecimiento algal debido al efecto de auto-sombreado. Pareciera que los efectos de sombreado se podrían resolver aumentando la luz en la superficie; sin embargo, la alta irradiación inhibe la fotosíntesis, lo cual no es deseable en cultivos inmovilizados.

Los resultados en el presente estudio sugieren que la actividad celular de las células inmovilizadas disminuye al aumentar la densidad celular promedio, como se observa por una menor tasa fotosintética ( $P$ ) y  $E_k$  obtenidas en los cultivos con esferas de alta densidad celular (Cuadro 1). Resultados similares fueron reportados por Tam *et al.* (1994) y Robinson *et al.* (1985) para *Chlorella vulgaris* inmovilizada; ambos autores sugieren que la actividad metabólica celular de las células inmovilizadas de *Chlorella* disminuyó al aumentar la densidad celular.

En el análisis de las curvas P-I es importante tener en cuenta las condiciones de los cultivos, tales como cultivos con alta densidad celular, lo que puede causar una atenuación considerable de luz. Las variables fotosintéticas obtenidas en este estudio para *S. obliquus* inmovilizado indican que hay una mayor actividad fisiológica en esferas con densidad celular baja que en aquellas con alta densidad celular. Con base a estas consideraciones, el crecimiento y contenido de proteínas usando esferas de baja densidad celular cultivadas bajo dos intensidades de luz ( $135$  y  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), presentaron las más altas tasas fotosintéticas y, por tanto, fueron seleccionadas para más pruebas.

## Crecimiento

El crecimiento del *S. obliquus* inmovilizado, medido en términos de densidad celular por esfera,

## Growth

The growth of immobilized *S. obliquus* measured in terms of cell density by bead increased gradually with time from  $3.5 \times 10^5$  to  $8 \times 10^5$  cells beads<sup>-1</sup> at  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in 2 d of culture. This cellular concentration was higher than that obtained at  $135 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  from  $3.5 \times 10^5$  to  $6.5 \times 10^5$  cells beads<sup>-1</sup>. This suggests that after immobilization the microalga *S. obliquus* was still able to undergo cell division and carry out photosynthesis (Figure 2).

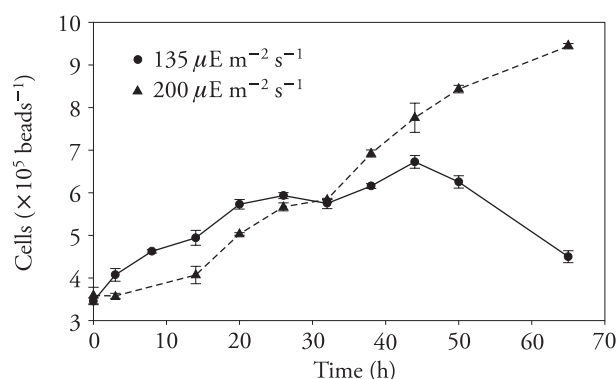
Both treatments showed immediate growth after the beads were added to the medium, unlike other studies where immobilized cells showed longer lag periods compared with free cells as reported by Chevalier and de la Noüe (1985) and Lau *et al.* (1997). The light intensity used in the present study ( $135$  and  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) did not cause significant differences on growth rates ( $p > 0.05$ ), within values of  $0.157 \text{ d}^{-1}$  and  $0.172 \text{ d}^{-1}$ . A similar trend was reported by Bartual *et al.* (2002) for cultures of *Rhodomonas saline* under intensities between  $15$  to  $320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Both growth rates were lower than those reported for *S. intermedius* of  $0.336 \text{ d}^{-1}$  (Jimenez-Perez *et al.*, 2004) and  $1.08 \text{ d}^{-1}$  (Chevalier and de la Noüe, 1985). This difference could probably be due to the different conditions of the cultures. Studies of *Chlamydomonas reinhardtii* have shown that in free cultures the growth rate and photosynthetic

aumentó gradualmente con el tiempo, de  $3.5 \times 10^5$  a  $8 \times 10^5$  células esferas<sup>-1</sup> a  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en 2 d de cultivo. Esta concentración celular fue mayor que la obtenida a  $135 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de  $3.5 \times 10^5$  a  $6.5 \times 10^5$  células esferas<sup>-1</sup>. Esto sugiere que después de la inmovilización, la microalga *S. obliquus* todavía fue capaz de experimentar división celular y llevar a cabo fotosíntesis (Figura 2).

Ambos tratamientos mostraron un crecimiento inmediato después de agregar las esferas al medio, a diferencia de otros estudios donde las células inmovilizadas mostraron periodos de aclimatación más largos comparados con las células libres, según lo reportado por Chevalier y de la Noue (1985) y Lau *et al.* (1997). La intensidad de luz usada en el presente estudio ( $135$  y  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no causó diferencias significativas en las tasas de crecimiento ( $p > 0.05$ ), con los valores de  $0.157 \text{ d}^{-1}$  a  $0.172 \text{ d}^{-1}$ . Bartual *et al.* (2002) reportó una tendencia similar para los cultivos de *Rhodomonas saline* en intensidades de  $15$  a  $320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Ambas tasas de crecimiento fueron inferiores a las reportadas para *S. intermedius* de  $0.336 \text{ d}^{-1}$  (Jiménez-Pérez *et al.*, 2004) y  $1.08 \text{ d}^{-1}$  (Chevalier y de la Noue, 1985). Esta diferencia probablemente podría deberse a las diferentes condiciones de los cultivos. Los estudios de *Chlamydomonas reinhardtii* han mostrado que en cultivos libres, la tasa de crecimiento y la actividad fotosintética dependen de la cantidad de luz recibida por el cultivo (León y Galván, 1997). Sin embargo, en el presente estudio se observó que los rangos de irradiancia coincidían con los niveles de luz usados para el cultivo de este género de microalgas (Kaya *et al.*, 1996; Tam y Wong, 2000; Jiménez-Pérez *et al.*, 2004). Una consideración válida es que si los nutrientes no son limitantes y las condiciones fisiológicas son óptimas, entonces la actividad fotosintética es controlada sólo por la intensidad de la luz. En el estudio de células inmovilizadas, la elevada actividad asociada al alto contenido de clorofila está relacionada con la limitación de la luz en las esferas. Sin embargo, es posible observar que a diferencia de los cultivos de células libres, la adecuada intensidad de luz obtenida de la zona de limitación de luz (curvas P-I) no garantiza una alta producción de biomasa y contenido de proteína. Hay otros factores, como el  $\text{CO}_2$  y la temperatura, que se deben tener en cuenta.



**Figure 2.** Growth of immobilized *S. obliquus* cells in low cell density beads for cultures under  $135$  and  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light intensity in artificial wastewater.

**Figura 2.** Crecimiento de células de *S. obliquus* inmovilizadas en esferas a baja densidad celular para cultivos bajo  $135$  y  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz en aguas residuales artificiales.

activity depend on the amount of light received by the culture (León and Galván, 1997). However, in the present study it was observed that the irradiance ranges matched the light levels used for the culture of this genus of microalgae (Kaya *et al.*, 1996; Tam and Wong, 2000; Jimenez-Perez *et al.*, 2004). A valid consideration is that if nutrients are not limiting and physiological conditions are optimal, then the photosynthetic activity is controlled only by light intensity. In the study of immobilized cells, the high activity associated to the high content of chlorophyll is related to the limitation of the light in the beads. However, it can be observed that in contrast to free-cell cultures, the appropriate light intensity obtained within the light limitation zone (P-I curves) does not guarantee a high biomass production and protein content. Other factors such as CO<sub>2</sub> and temperature should be taken into consideration.

### Protein content

The protein content (15-16 %) obtained in the cultures under two light intensities did not show significant differences ( $p > 0.125$ ). The gradual proteins increase with time indicated that the growth and production of proteins began immediately after adding the beads to the culture medium, showing that the microalgae *S. obliquus* was maintained in exponential phase (Figure 3).

Ruiz-Marín and Mendoza-Espinosa (2008) showed that some ammonium can be removed by ammonia volatilization (17.6 mg L<sup>-1</sup>) as a result of the high pH (9.0-9.5) observed in similar systems. The pH did not seem to interfere with algal growth. Taking into consideration the amount of ammonium at the end of the 42 h of cultivation (6.56 and 7.03 mg L<sup>-1</sup>) it appears that only around 5.84 and 5.37 mg L<sup>-1</sup> of the total nitrogen removed from the medium under light conditions 135 and 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  was incorporated as N-protein by the microalgae. For *S. obliquus* the amount of non-protein nitrogen (expressed as a portion of total nitrogen) is 12 % (Becker *et al.*, 1976), yet the N-protein in the present study accounted for 5.14-4.73 mg L<sup>-1</sup> which are lower than the values reported by Núñez *et al.* (2001) for free *S. obliquus* cultures.

Under the light intensities selected in the present study there were no significant effects of light

### Contenido de proteínas

El contenido de proteína (15-16 %) obtenido en los cultivos bajo dos intensidades de luz, no mostró diferencias significativas ( $p > 0.125$ ). El aumento gradual de las proteínas a través del tiempo reveló que el crecimiento y la producción de proteínas comenzaron inmediatamente después de agregar las esferas al medio de cultivo, mostrando que la microalga *S. obliquus* se mantenía en fase exponencial (Figura 3).

Ruiz-Marín y Mendoza-Espinosa (2008) mostraron que parte del amonio puede ser removido por volatilización del amoníaco (17.6 mg L<sup>-1</sup>) como resultado del alto pH (9.0-9.5) observado en sistemas similares. El pH no pareció interferir con el crecimiento de las algas. Teniendo en cuenta la cantidad de amonio al final de las 42 h de cultivo (6.56 y 7.03 mg L<sup>-1</sup>), parece que sólo alrededor de 5.84 y 5.37 mg L<sup>-1</sup> del nitrógeno total removido del medio bajo condiciones de luz 135 y 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fueron incorporados como N-proteína por la microalga. Para *S. obliquus*, la cantidad de nitrógeno no proteínico (expresado como una parte del nitrógeno total) es 12 % (Becker *et al.*, 1976), pero el N-proteínico en el presente estudio fue 5.14-4.73 mg L<sup>-1</sup>, que son valores inferiores a los reportados por Núñez *et al.* (2001) para los cultivos libres de *S. obliquus*.

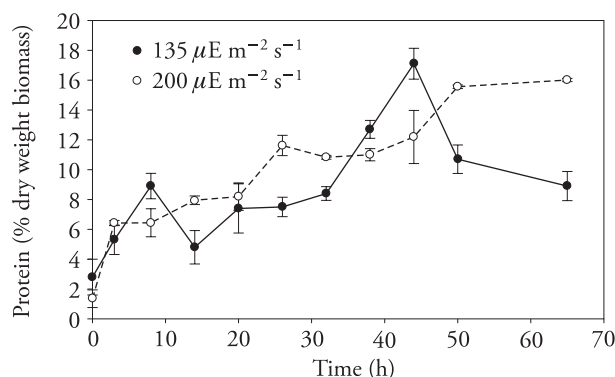


Figure 3. Protein content (% dry weight biomass) for *Scenedesmus obliquus* growing in artificial wastewater under 135 and 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of light intensity (Bars = standard deviation).

Figura 3. Contenido de proteína (% de biomasa) para *Scenedesmus obliquus* cultivada en aguas residuales artificiales, bajo 135 y 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz (Barras = desviación estándar).

intensities on the growth and protein content of *S. obliquus*. In order to increase protein content, other factors such as CO<sub>2</sub> level, temperature and pH should be tested if the aim is to use the biomass as food supplement.

## CONCLUSIONS

The photosynthetic parameters obtained for immobilized *S. obliquus* in the present study indicated a higher physiological activity for low cell density beads than those reported for cultures with high cell density beads. The growth and protein content using beads with low cellular density cultivated under two intensities of light, which corresponded to the zone of the highest photosynthetic rate, showed a high response to light intensity at  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

The high activity associated to the high content of chlorophyll is related to the limitation of the light in the beads. However, in contrast to free-cell cultures, the appropriate light intensity obtained within the light limitation zone (P-I curves) did not cause a high biomass production and protein content. Both irradiances showed that only around  $5.14\text{-}4.73 \text{ mg L}^{-1}$  as N-protein of the total nitrogen removed from the medium. Therefore, light intensities not have significant effects on the growth and protein content in beads with low cell density cultures.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by the Universidad Autónoma de Baja California (Autonomous University of Baja California) internal project no. 568. A scholarship by the Mexican Department of Education (SEP) granted to Alejandro Ruiz Marin is gratefully acknowledged.

## LITERATURE CITED

- Andersen, R., A. 2005. Algal Culturing Techniques. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press Amsterdam. pp: 578-600.
- Bailliez, C., C. Largeau., C. Berkaloff, and E. Casadevall. 1986. Immobilization of *Botryococcus braunii* in alginate: influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol 23: 361-366.
- Bartual, A., L. M. Lubián., J. A. Gálvez, and F. X. Niell. 2002. Effect of irradiance on growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of

Las intensidades de luz seleccionadas en este estudio no tuvieron ningún efecto significativo en el crecimiento y contenido de proteínas de *S. obliquus*. Con el fin de aumentar el contenido de proteína se deben probar otros factores como el nivel de CO<sub>2</sub>, la temperatura y el pH, si el objetivo es usar la biomasa como suplemento alimenticio.

## CONCLUSIONES

Los parámetros fotosintéticos obtenidos en el presente estudio para *S. obliquus* inmovilizado indicaron una mayor actividad fisiológica en esferas con baja densidad celular que la de cultivos con esferas de alta densidad celular. El crecimiento y contenido de proteínas usando esferas con densidad celular baja, cultivadas bajo dos intensidades de luz que corresponden a la zona de la más alta tasa de fotosíntesis, mostraron una alta respuesta con la intensidad de luz de  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

La elevada actividad asociada con el alto contenido de clorofila está relacionada con la limitación de la luz en las esferas. Sin embargo, a diferencia de los cultivos con células libres, la intensidad de luz adecuada obtenida en la zona de limitación de luz (curvas P-I) no causó una gran producción de biomasa y contenido de proteína. Las dos irradiancias mostraron que sólo alrededor de  $5.14\text{-}4.73 \text{ mg L}^{-1}$  de N-proteínico se obtuvieron a partir del nitrógeno total removido del medio. Por tanto, la intensidad de la luz no tiene efectos significativos sobre el crecimiento y contenido de proteína en las esferas de cultivos de baja densidad celular.

—Fin de la versión en Español—



- Rhodomonas salina* (Wislouch) (Cryptophyceae). Ciencias Marinas 28: 381-392.
- Becker, E. W., L. V. Venkataraman, and P. M. Khanum. 1976. Effects of different methods of processing on the protein efficiency ratio of the green alga *Scenedesmus acutus*. Nutr. Reports. Int. 14: 305-319.
- Bouterfas, R., M. Belkoura, and A. Dauta. 2002. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. Hydrobiology. 489: 207-217.
- Chevalier, P., and J. de la Noüe. 1985. Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphorus removal from wastewater. Biotechnol Lett. 7: 395-400.

- Guillard, R. L. L., and J. H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula Confervacea* (Cleve). *Gran Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Jeanfils, J., and F. Collar. 1983. Effect of immobilizing *Scenedesmus obliquus* cells in a matrix on oxygen evolution and fluorescence properties. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 254-257.
- Jiménez-Pérez, M. V., P. Sánchez-Castillo, O. Romera, D. Fernández-Moreno, and C. Pérez-Martínez. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme Microb. Technol.* 34: 392-398.
- Kaya, V. M., J. Goulet, J. de la Noüe, and G. Picard. 1996. Effect of intermittent CO<sub>2</sub> enrichment during nutrient starvation on tertiary treatment of wastewater by alginate-immobilized *Scenedesmus bicellularis*. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 550-554.
- Lau, P. S., N. F. Y. Tam, and Y. S. Wong. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environ. Technol.* 18: 945-951.
- Lavoie, A., and J. de la Noüe. 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Wat. Res.* 19: 1437-1442.
- León, R., and F. Galván. 1997. Short communication: Analysis of effective light in different photobioreactors: its influence on growth, photosynthetic activity and glycerol production by the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 237-239.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Núñez, J. V., D. Voltolina, M. Nieves, P. Piña, A. Medina, and M. Guerrero. 2001. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Biores Technol.* 78: 161-164.
- Pane, L., M. Feletti, C. Bertino, and A. Carli. 1998. Viability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads. *Aquaculture Int.* 6: 411-420.
- Platt, T., and A. D. Jassby. 1976. The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. *J. Phycol.* 12: 421-430.
- Prioul, J. L., and P. Chartier. 1977. Partitioning of transfer and carboxylation components of intracellular resistance to photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation: a critical analysis of the methods used. *Ann. Bot.* 41: 189-800.
- Robinson, P. K., A. L. Dainty, K. H. Goulding, I. Simpkins, and M. D. Trevan. 1985. Physiology of alginate immobilized *Chlorella*. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 212-216.
- Robinson, P. K., K. H. Goulding, A. L. Mak, and M. D. Trevan. 1986. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella*. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 729-733.
- Ruiz-Marín, A., and L. Mendoza-Espinosa. 2008. Ammonia removal and biomass characteristic of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater. *Fresenius Environ. Bull.* 17(9a): 1236-1241.
- Sánchez-Saavedra, M. P., and D. Voltolina. 2002. Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas.* 28(3): 273-279.
- Sorokin, C. 1973. Dry weigh, packed cell volume and optical density. *In: Stein, J. R. (ed). Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement.* New York, Cambridge University Press: 440 p.
- Tam, N. F. Y., P. S. Lau, and Y. S. Wong. 1994. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Wat. Sci. Technol.* 30: 369-374.
- Tam, N. F. Y., and Y. S. Wong. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environ. Pollut.* 107: 145-151.
- Vilchez, C., and J. M. Vega. 1994. Nitrite uptake by *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 137-141.