

## Cu and Zn accumulation by calcium alginate immobilized marine microalgal cells of *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae)

### Acumulación de Cu y Zn por células microalgales marinas de *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae) inmovilizadas en alginato de calcio

Ignacio Moreno-Garrido<sup>1\*</sup>  
G.A. Codd<sup>2</sup>  
G.M. Gadd<sup>2</sup>  
L.M. Lubián<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC)  
Pol. Río San Pedro s/n  
Apartado oficial 11510  
Puerto Real, Cádiz, Spain

\* E-mail: [ignacio.moreno@icman.csic.es](mailto:ignacio.moreno@icman.csic.es)

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences  
University of Dundee DD1 4HN  
Dundee, Scotland, United Kingdom

Recibido en enero de 2001; aceptado en septiembre de 2001

#### Abstract

Different experiments about the accumulation capacity for copper and zinc were carried out on the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana* Lubián (Eustigmatophyceae). A 24-hour study of the evolution of accumulated metal in the beads revealed two possible accumulation phases. Accumulation differences between free and immobilized microalgal cells were investigated finding no differences for copper, and little differences for zinc. Free cells accumulated practically 100% Cu or Zn in the media under experimental conditions. Experiments in order to compare the accumulation capacity of living vs. dead cells were designed too, obtaining the largest accumulation levels for both metals in the beads containing immobilized living microalgae. In experiments carried out in continuous-flow reactors, beads with entrapped cells showed to be more efficient removing Cu and Zn than beads without cells. In all the experiments, the calcium alginate beads showed strong affinity for Cu. Similar results were obtained when accumulation by packed beads in columns was tested, but efficacy was higher if this design was used (beads with cells retain 80% of Cu introduced in the column).

*Keywords:* *Nannochloropsis*, heavy metal accumulation, alginate.

#### Resumen

Se han realizado distintos experimentos sobre la capacidad de acumulación de cobre y zinc por parte de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana* Lubián (Eustigmatophyceae). Un estudio de la evolución del metal acumulado durante 24 horas reveló la existencia de dos posibles fases de acumulación. Se investigaron las diferentes capacidades de acumulación de células microalgales libres e inmovilizadas, no encontrándose diferencias para el cobre y pequeñas diferencias para el zinc. Las células libres acumularon prácticamente el 100% del Cu o Zn presentes en el medio, en las condiciones experimentales. Se desarrollaron experimentos encaminados a determinar la capacidad de acumulación de estos metales por parte de algas inmovilizadas vivas frente a la de algas inmovilizadas muertas, encontrándose los niveles acumulativos más altos para ambos metales en las gotas de alginato que contenían algas vivas. En experimentos realizados en reactores de flujo continuo, las gotas de alginato con células inmovilizadas en su interior demostraron ser más eficientes en cuanto a la retirada de Cu y Zn del medio que las gotas sin algas. En todos los experimentos realizados se observa una fuerte afinidad del Cu por el alginato de calcio. Se obtuvieron resultados similares cuando se ensayó la acumulación de metales en gotas de alginato dispuestas en columnas llenas, aunque la eficacia fue mayor cuando se usó este último diseño (las gotas de alginato con células retuvieron el 80% del Cu introducido en la columna).

*Palabras clave:* *Nannochloropsis*, acumulación de metales pesados, alginato.

## Introduction

Many heavy metals are essential for living beings but, at high concentrations, they could be hazardous for organisms in different levels of the trophic chain (Gadd and Griffiths, 1978; McHale and McHale, 1994; Warnau *et al.*, 1995). The presence of heavy metals is demonstrated to be able of modifying the species composition in mesocosmos experiments (Eppley and Weiler, 1979).

Great metal accumulation levels have been found in natural micro and macroalgal populations placed in metal-polluted environments (Absil and van Scheppingen, 1996; Karez *et al.*, 1994; Wahbeh, 1985). This indicates the capacity of these organisms to accumulate them (Ross, 1986; Ross, 1987; Sakaguchi *et al.*, 1979; Tobar *et al.*, 1993). This phenomenon has been proposed to be exploited in metal depuration processes. Waste materials (Proulx and de la Noue, 1988) and macronutrients (Craggs *et al.*, 1995) are also susceptible to be accumulated. Macroalgal biofilms (Liehr *et al.*, 1994), raw carrageenan and agar producing macroalgae (Burdin and Bird, 1994), as well as modified algal biomass (Jang *et al.*, 1995; Leusch *et al.*, 1995; Volesky and Prasetyo, 1994; Volesky and Holan, 1995) have been used successfully for recovering metals.

In this research, the first attempt to study the metal accumulation capacity of a marine microalgae belonging to the class Eustigmatophyceae (Hibberd, 1981) was carried out. *Nannochloropsis gaditana* Lubián has demonstrated to be resistant to high metal doses (Moreno-Garrido, 1997). Other cytological characteristics indicate that *N. gaditana* is an adequate material to carry out metal accumulation experiments: small size (that ensures high surface/volume ratio) and cell wall composition and hardness (that can avoid desintegration of the cells even submitted to extreme conditions). Development of immobilization techniques greatly facilitates the handling of microorganisms, avoiding dilution losses in reactors and providing a fast and economic means to remove them from the growth media. Additionally, protection of these microorganisms to stress is given (Codd, 1987; Robinson *et al.*, 1986).

Some immobilization techniques, such as polyurethane foam, have been demonstrated to be highly toxic to phytoplankton (Garbisu *et al.*, 1991; Thepenier *et al.*, 1985). In this work, a simplification of the protocol described by Hertzberg and Jensen (1989) for immobilizing microorganisms from salt waters was used.

## Materials and methods

### Organisms

The marine microalgal species used was *Nannochloropsis gaditana* Lubián, (Eustigmatophyceae) (Lubián, 1982). Inocula were obtained from the Marine Microalgal Culture Collection of the Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía

## Introducción

Muchos metales pesados son esenciales para los seres vivos, pero a altas concentraciones pueden ser peligrosos para organismos situados en diferentes niveles de la cadena trófica (Gadd y Griffiths, 1978; McHale y McHale, 1994; Warnau *et al.*, 1995). Se ha demostrado que la presencia de metales pesados es capaz de modificar la composición específica de una población en experimentos llevados a cabo en mesocosmos (Eppley y Weiler, 1979). Se han encontrado grandes niveles de acumulación de metales en poblaciones naturales de micro y macroalgas situadas en ambientes contaminados por metales (Absil y van Scheppingen, 1996; Karez *et al.*, 1994; Wahbeh, 1985). Esto indica la capacidad de estos organismos para acumular dichas sustancias (Ross, 1986; Ross, 1987; Sakaguchi *et al.*, 1979; Tobar *et al.*, 1993). Se ha propuesto utilizar tal capacidad con objeto de diseñar estrategias de depuración. De igual modo pueden ser acumulados materiales de desecho (Proulx y de la Noue, 1988) y macronutrientes (Craggs *et al.*, 1995). Con el objeto de retirar metales del medio, se han usado con éxito biopelículas de macroalgas (Liehr *et al.*, 1994), carragenato y macroalgas productoras de agar (Burdin y Bird, 1994), así como biomasa modificada de algas (Jang *et al.*, 1995; Leusch *et al.*, 1995; Volesky y Prasetyo, 1994; Volesky y Holan, 1995).

En este trabajo se ha llevado a cabo el primer estudio sobre la capacidad de acumulación de una microalga marina perteneciente a la clase Eustigmatophyceae (Hibberd, 1981). *Nannochloropsis gaditana* Lubián ha demostrado ser resistente a altas dosis de metales (Moreno-Garrido, 1997). Otras características citológicas convierten a *N. gaditana* en un material adecuado para realizar ensayos de acumulación: un tamaño pequeño, que asegura un elevado cociente superficie/volumen, y una pared celular muy dura, que permite la integridad celular incluso bajo condiciones extremas. El desarrollo de técnicas de inmovilización facilita en gran manera el manejo de microorganismos, evitando las pérdidas por dilución en reactores y aportando un método rápido y barato para retirar dichos microorganismos del medio de cultivo. Además, la inmovilización protege a los microorganismos involucrados frente al estrés (Codd, 1987; Robinson *et al.*, 1986).

Algunas técnicas de inmovilización, tales como la espuma de poliuretano, son muy tóxicas para el fitoplancton (Garbisu *et al.*, 1991; Thepenier *et al.*, 1985). En este trabajo se ha utilizado una simplificación del protocolo descrito por Hertzberg y Jensen (1989) para inmovilizar microorganismos de agua salada.

## Materiales y métodos

### Organismos

Se ha utilizado la especie microalgal marina *Nannochloropsis gaditana* Lubián (Eustigmatophyceae)

(CSIC) (CCMM-ICMAN, BIOCISE). *N. gaditana* shows a subspherical shape, with a mean volume near  $8 \mu\text{m}^3$ .

#### Culture media

For routine cellular culture, as well as in the experiments, artificial seawater was used. This culture medium was made with the following recipe: NaCl,  $23.96 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $10.346 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $6.5 \text{ g L}^{-1}$ ; NaBr,  $1.209 \text{ g L}^{-1}$ ; KCl,  $0.596 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0.397 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{Cl}_2\text{Sr} \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0.027 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ ,  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ; and NaF,  $4.2 \text{ mg L}^{-1}$ . After salts were dissolved, the pH of the medium was adjusted to 7.5, by adding drops of NaOH and HCl (both 0.1 M). The medium was filtered through  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  nylon filters and autoclaved. After autoclaving, pH arises to  $8.1 \pm 0.1$ . For routine cultures, Guillard's f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962) was used. Microalgal cultures grew in glass flasks, under continuous white light, at  $20^\circ\text{C}$ .

#### Counting of cells and metal measurement

Cells were counted in Neubauer chambers, under bright field microscope. When counting of immobilized cells was needed, 0.5 mL of culture (with beads) was taken, and 0.5 mL of phosphate buffer and 0.5 mL of Lugol-iodin were added. After a soft sonication treatment during one minute, beads were dissolved, and cells were counted.

$\text{CuSO}_4$  and  $\text{ZnCl}_2$  were used in the heavy metal stock solutions. Metals were measured by atomic absorption spectrophotometry (flame technique). When needed, digestion of the samples was carried out with nitric acid 6 M, at  $100^\circ\text{C}$ , during one hour, in teflon tubes. Before measurement, samples were centrifuged in Eppendorf vials in a table centrifugator (13000 rpm) in order to clarify the solution.

#### Immobilization technique

Sodium alginate (high viscosity) was obtained from Sigma Chemicals. Bead production was developed following Hertzberg and Jensen protocols (1989), but sodium alginate was filtered through sterile clothes before mixing with cells and dropping to calcium solution.

The bead maker was obtained from Dr. Skjåk-Braek, from the Biotechnology Institute of the Trondheim University (Norway). This device is described in Garnham *et al.* (1992a). The airflow from the bead maker was adjusted to produce beads with a diameter between 1 and 2 mm for all the experiments except for the packed columns, in which beads must be between 3 and 4 mm diameter. Beads were maintained for two weeks under orbital shaking. Ratios of "volume of beads:volume of medium" of 1:3 for the batch cultures and 1:7 for the continuous flow reactors were selected. For batch cultures, incubation was carried out in non-hermetic plastic bearers, in orbital shakers at 120 rpm.

(Lubián, 1982). Los inóculos se obtuvieron de la Colección de Microlagas Marinas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC) (CCMM-ICMAN, BIOCISE). *N. gaditana* tiene forma subsférica, y un volumen de alrededor de  $8 \mu\text{m}^3$ .

#### Medio de cultivo

Para los cultivos celulares de rutina, así como en los experimentos, se usó agua de mar artificial. Este medio se preparó con la siguiente fórmula: NaCl,  $23.96 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $10.346 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $6.5 \text{ g L}^{-1}$ ; NaBr,  $1.209 \text{ g L}^{-1}$ ; KCl,  $0.596 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0.397 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{Cl}_2\text{Sr} \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0.027 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ ,  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ; y NaF,  $4.2 \text{ mg L}^{-1}$ . Al disolver estas sales, se ajustaba el pH del medio a 7.5 añadiendo gotas de NaOH y HCl (ambos 0.1 M), se filtraba éste a través de filtros de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y se esterilizaba mediante autoclave. Tras el proceso de esterilización, el pH se elevaba hasta  $8.1 \pm 0.1$ . Para los cultivos de rutina se usó el medio f/2 de Guillard (Guillard y Rither, 1962). Las microalgas se cultivaron en matraces de vidrio, bajo luz continua, a  $20^\circ\text{C}$ .

#### Recuento celular y medición de metales

Las células se contaron mediante el uso de cámaras Neubauer, bajo microscopio óptico de campo claro. Cuando se precisó el recuento de células inmovilizadas, se tomaron 0.5 mL de cultivo (con gotas), y se añadieron 0.5 mL de tampón fosfato y 0.5 mL de Lugol-ianidina. Tras un tratamiento de sonicación suave durante un minuto, las gotas se disuelven y las células pueden contarse normalmente. En las soluciones madre metálicas se usaron  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{ZnCl}_2$ . La medición de estos metales se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA, técnica de llama). Cuando se requirió la digestión de las muestras antes de su medición por EAA, ésta se llevó a cabo con ácido nítrico 6 M a  $100^\circ\text{C}$ , durante una hora, en tubos de teflón. Las muestras fueron centrifugadas en viales Eppendorf en una centrifuga de mesa (13000 rpm) antes de ser medidas, con objeto de clarificar la solución.

#### Técnica de inmovilización

El alginato de sodio (alta viscosidad) se obtuvo de Sigma Chemicals. Las gotas se fabricaron siguiendo los protocolos de Hertzberg y Jensen (1989), aunque el alginato de sodio se filtró a través de gases estériles antes de ser mezclado con las células y vertido gota a gota sobre la solución de calcio.

El aparato formador de gotas se obtuvo del Dr. Skjåk-Braek, del Biotechnology Institute de la Universidad de Trondheim (Noruega). Este aparato se describe en Garnham *et al.* (1992a). El flujo de aire desde el aparato se ajustó para producir gotas de un diámetro de entre 1 y 2 mm. Las gotas se mantuvieron rígidas tras dos semanas de agitación orbital. En los experimentos de cultivo tipo "batch" se usaron razones de

### Accumulation during 24 hours

For this experiment, sodium alginate beads with or without entrapped cells were exposed to 10  $\mu\text{M}$  Cu or Zn (0.64 or 0.65  $\text{mg L}^{-1}$ , respectively) during 24 hours, and samples were taken at 1, 2, 3, 4 and 24 hours. In the case of beads with entrapped cells, the cellular density in the plastic beaker (40 mL) was  $12 \times 10^6$  cells  $\text{L}^{-1}$ .

### Free vs. immobilized cells

Metal doses were 10  $\mu\text{M}$  for each metal (Cu, 0.64  $\text{mg L}^{-1}$ ; Zn, 0.65  $\text{mg L}^{-1}$ ). Four series of beakers were disposed for each metal: one of them with beads and without immobilized cells, another one with free cells ( $155 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ), other series with calcium alginate beads with immobilized cells ( $157 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ); and a control series (metal without beads or cells). Samples were taken at 24 hours, from the supernatant.

### Dead vs. living cells

Four series of beakers were prepared for each metal at an initial concentration of 25  $\mu\text{M}$ , (Cu, 1.59  $\text{mg L}^{-1}$ ; Zn 1.63  $\text{mg L}^{-1}$ ); Blank beakers (with metal, but without beads or cells); calcium alginate beads with immobilized living cells ( $50 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ); calcium alginate beads with cells ( $50 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) previously killed by heat, in the autoclave, before the addition to alginate; and calcium alginate beads without cells at all. The metal concentration in the supernatant was measured after 24 hours.

### Air-lift reactors

Two-litres volume air-lift reactors were used for the continuous-flow experiments. The medium inside the reactor was kept moving by soft bubbling. Reactors were continuously illuminated by cold lights (20 W). An inlet-outlet 2.88-litres flow was established each 24 hours. Metal concentration in the inlet was 1.59  $\text{mg L}^{-1}$  for Cu and 1.63  $\text{mg L}^{-1}$  for Zn (both equivalent to 25  $\mu\text{M}$ ). The initial medium in the reactors was free of metals. The increase of metal concentration, due to the continuous inlet of medium containing dissolved metal, was compared for media without beads; with beads but not cells; and with beads containing entrapped cells. For Cu, the initial cellular concentration in the whole volume of the reactor was  $17 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . In the case of Zn, cellular concentration was  $50 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Nutritive medium was not added. The sampling was carried out using an inverted 5-mL automatic pipette tip, adapted to the end of the outlet line placed inside the reactor, in order to avoid the removal of beads. Bubbles never entered the outlet due to the position of the tube.

"volumen de gotas/volumen de medio" de 1:3, mientras que para los experimentos en reactores de flujo continuo se usó una razón 1:7. Para los cultivos tipo "batch" la incubación se llevó a cabo en vasos de precipitado no herméticos, situados en agitadores orbitales a 120 cpm.

### Acumulación durante 24 horas

Para este experimento se expusieron gotas de alginato con o sin células inmovilizadas a 10  $\mu\text{M}$  de Cu o Zn (0.64 ó 0.65  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente) durante 24 horas. Se tomaron muestras después de 1, 2, 3, 4 y 24 horas. En el caso de las gotas con células inmovilizadas, la densidad celular en los vasos de precipitado (para 40 mL de volumen) fue de  $12 \times 10^6$  células  $\text{L}^{-1}$ .

### Células libres vs. células inmovilizadas

Se expusieron a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  de cada metal (0.64  $\text{mg L}^{-1}$  para el Cu, 0.65  $\text{mg L}^{-1}$  para el Zn). Para cada metal se dispusieron cuatro series de vasos de precipitado: una de ellas con gotas sin células en el interior; otra con células libres ( $155 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ); otra con gotas de alginato de calcio con células en su interior (resultando una densidad celular total en los vasos de  $157 \times 10^6 \pm 1.7 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ); y una serie control (metal sin gotas ni células). Se tomaron muestras del sobrenadante tras 24 horas de incubación.

### Células vivas vs. células muertas

Se dispusieron cuatro series de vasos de precipitado para cada metal, con una concentración inicial de 25  $\mu\text{M}$  (1.59  $\text{mg L}^{-1}$  Cu o 1.63  $\text{mg L}^{-1}$  Zn): controles (con metal sin gotas); vasos con gotas de alginato de calcio con células inmovilizadas vivas ( $50 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ); gotas de alginato de calcio con células previamente muertas por choque térmico en el autoclave antes de la adición de las células al alginato sódico ( $50 \times 10^6 \pm 2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ); y gotas de alginato de calcio sin células en el interior. Se midió la concentración de metal en el sobrenadante tras 24 horas de incubación.

### Reactores *air-lift*

Para los experimentos de flujo continuo se usaron reactores *air-lift* de dos litros de capacidad. El medio en el interior de los reactores se mantuvo en movimiento mediante burbujeo suave. Los reactores se mantuvieron continuamente iluminados por luz fría (20 W). Se estableció un flujo de entrada-salida de 2.88 L cada 24 horas. La concentración de metal en el medio entrante fue de 25  $\mu\text{M}$  para cada metal (1.59  $\text{mg L}^{-1}$  para el Cu y 1.63  $\text{mg L}^{-1}$  para el Zn). El medio inicial dentro de los reactores se encontraba libre de metal. El incremento en la concentración de metal en el medio, debido al caudal de entrada

## Packed columns

15-mL glass columns (Afora) were filled to a volume of 10 mL with beads. Seawater was added up to a final volume of 11 mL, for ensuring the complete hydration of the beads. Supernatant was sampled each 30 minutes during 8 hours. The established flow was 0.25 mL min<sup>-1</sup>. The cellular density for the 11 mL in the column was 180 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>. Metal concentrations in the inlets were similar to those used in the 2-litres air-lift reactors. Mean dry weight of beads in any column was 0.3 g.

## Results

### Immobilization technique

*N. gaditana* is adequately immobilized in calcium alginate beads. The survival of the cells is demonstrated by the presence, after some days, of divided entrapped cells (fig. 1).

### Accumulation during 24 hours

Metal accumulation levels in beads exposed to metals during 24 hours are shown in figure 2. High accumulation levels of Cu were found in both types of beads, but Cu accumulation in beads with entrapped cells was higher (near 50 mg Kg<sup>-1</sup>) than Cu accumulation in beads without cells (around 25 mg Kg<sup>-1</sup>). Zn accumulation was found too, but it was quite smaller than in the case of Cu. In this case, great accumulation levels were only found in beads with active cells inside (around 30 mg Kg<sup>-1</sup>). In all cases a first, fast accumulation seems to occur (metal levels are high after one hour), but a second, slower accumulation phase should occur too, as metal levels at 24 hours are higher.

### Free vs. immobilized cells

Results of the experiment designed to compare accumulation capacity of free or immobilized cells are shown in table 1. Free or immobilized cells of *N. gaditana*, in the experimental conditions remove all Cu in the medium. Free cells accumulate all Zn in the media too. Beads with cells accumulate near 80% of total Zn in the media. Beads without cells accumulate near 80% of Cu, but did not accumulate significant amounts of Zn.

### Dead vs. living cells

Compared metal accumulation levels for Cu and Zn by immobilized living and dead cells of the species *N. gaditana* are shown in figure 3. Great percentages of both metals were removed by living entrapped cells, but beads with entrapped dead cells or without cells at all did not remove significant amounts of Zn. Dead entrapped cells accumulated significantly more Cu than beads without cells at all, but even this series accumulated significant amounts of metal with respect to controls (near 70 %).

contaminado con metales, se comparó para los medios sin gotas, con gotas sin células y con gotas con células. Para el Cu, la densidad total de células en el reactor fue de 17 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>. En el caso del Zn, la densidad celular en el reactor fue de 50 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>. No se añadió, en estos experimentos, complemento nutritivo alguno. La toma de muestras se llevó a cabo mediante una punta de pipeta de 5 mL invertida, adaptada al final de una línea de salida dispuesta en el interior del reactor. Las burbujas o las gotas de alginato nunca entran en los dispositivos mencionados, dada su posición dentro del reactor.

### Columnas llenas

Se rellenaron columnas de vidrio de 15 mL (Afora) hasta alcanzar un volumen de 10 mL con gotas. Se añadió agua de mar hasta 11 mL para asegurar la completa hidratación de las gotas. Se tomaron muestras del sobrenadante cada 30 minutos durante ocho horas. El flujo establecido fue de 0.25 mL min<sup>-1</sup>. La densidad celular para los 11 mL de la columna fue de 180 × 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>. La concentración de metal en el caudal de entrada fue similar al utilizado en los reactores tipo *air-lift* de 2 litros. La media de peso seco para las gotas de cada columna fue de 0.3 g.

## Resultados

### Técnica de inmovilización

*N. gaditana* se inmoviliza adecuadamente en gotas de alginato de calcio. La supervivencia de las células se demuestra por la presencia, tras algunos días, de células divididas entre las inmovilizadas (fig. 1).

### Acumulación durante 24 horas

Los niveles de metal acumulado en gotas expuestas a los metales descritos durante 24 horas se muestran en la figura 2. Se encontraron altos niveles de Cu en ambos tipos de gotas, pero la acumulación de Cu en gotas con células inmovilizadas fue superior (alrededor de 50 mg Kg<sup>-1</sup>) a la acumulación de Cu en gotas sin células (alrededor de 25 mg Kg<sup>-1</sup>). Asimismo se comprobó acumulación de Zn, pero fue mucho menor que en el caso del Cu. En este caso, sólo se encontraron altos niveles de acumulación en gotas con células activas en el interior (alrededor de 30 mg Kg<sup>-1</sup>). En todos los casos, parece ocurrir una fase inicial rápida de acumulación (después de una hora de acumulación los niveles de metal ya son altos), aunque parece ocurrir una segunda fase de acumulación más lenta, ya que la concentración de metales sigue creciendo durante las siguientes 24 horas.

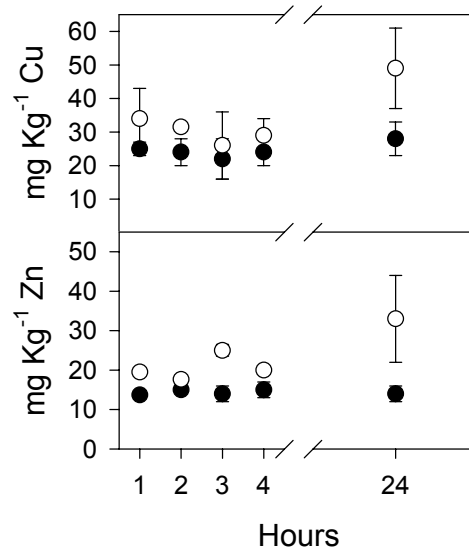
### Células libres vs. células inmovilizadas

En la tabla 1 se muestran los resultados del experimento diseñado con objeto de comparar la capacidad de acumulación



**Figure 1.** SEM photograph of two entrapped cells of *N. gaditana* after cellular division. Bar scale means 1  $\mu\text{m}$ .

**Figura 1.** Fotografía electrónica de barrido de dos células atrapadas de *N. gaditana* tras la división celular. La barra de escala mide 1  $\mu\text{m}$ .



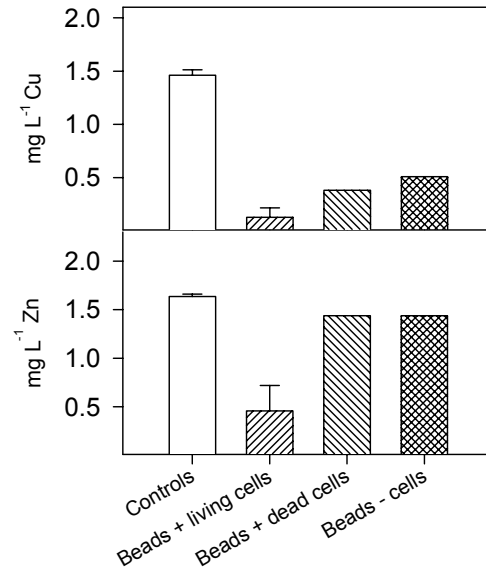
**Figure 2.** Cu (up) and Zn (down) concentration levels (as  $\text{mg Kg}^{-1}$  dry weight) in calcium alginate beads with (light circles) or without (dark circles) entrapped cells, during 24 hours. Standard deviations between replicates are expressed ( $n = 4$ ).

**Figura 2.** Concentraciones de Cu (arriba) y Zn (abajo) ( $\text{mg Kg}^{-1}$ , peso seco) en gotas de alginato de calcio con (círculos blancos) o sin (círculos oscuros) células inmovilizadas, durante 24 horas. Se muestran las desviaciones típicas entre muestras ( $n = 4$ ).

**Table 1.** Cu and Zn concentrations in solution after a 24-hours exposition to free microalgae, alginate beads without immobilised cells and alginate beads with immobilised *N. gaditana* cells. Standard deviations are expressed ( $n = 3$ ).

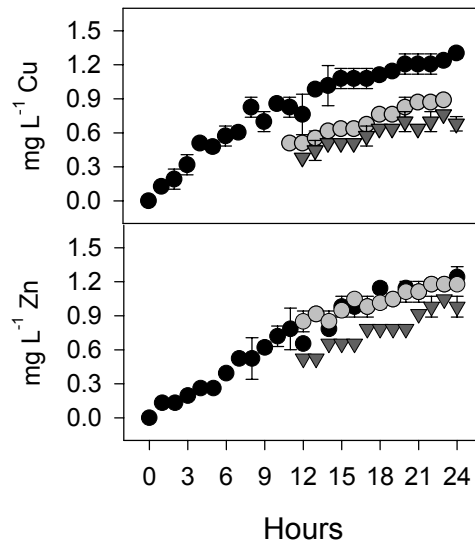
**Tabla 1.** Concentraciones de Cu y Zn en solución tras 24 horas de exposición a microalgas libres, gotas de alginato sin microalgas inmovilizadas y gotas de alginato con células de *N. gaditana* inmovilizadas. Se muestran las desviaciones típicas entre las muestras.

|                    | Cu $\text{mg L}^{-1}$ (solution) | Zn $\text{mg L}^{-1}$ (solution) |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Control            | $0.58 \pm 0.06$                  | $0.54 \pm 0.05$                  |
| Free microalgae    | No detect.                       | No detect.                       |
| Beads – microalgae | $0.13 \pm 0.04$                  | $0.53 \pm 0.13$                  |
| Beads + microalgae | No detect.                       | $0.13 \pm 0.03$                  |



**Figure 3.** Cu and Zn concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ) in solution after a 24-hours exposition without beads, with beads immobilising living cells; with beads immobilising dead cells and with beads without cells. Standard deviations between replicates are expressed ( $n = 3$ ).

**Figura 3.** Concentraciones de Cu y Zn expresadas como  $\text{mg L}^{-1}$ , en solución, tras 24 horas de exposición sin gotas; con gotas que contienen células inmovilizadas vivas; con gotas que contienen células inmovilizadas muertas; y con gotas sin células inmovilizadas. Se muestran las desviaciones típicas entre muestras ( $n = 3$ ).



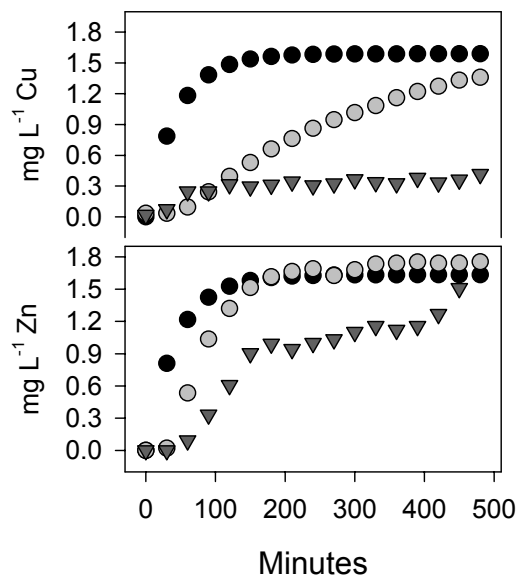
**Figure 3.** Cu and Zn concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ) in solution after a 24-hours exposition without beads, with beads immobilising living cells; with beads immobilising dead cells and with beads without cells. Standard deviations between replicates are expressed ( $n = 3$ ).

**Figura 3.** Concentraciones de Cu y Zn expresadas como  $\text{mg L}^{-1}$ , en solución, tras 24 horas de exposición sin gotas; con gotas que contienen células inmovilizadas vivas; con gotas que contienen células inmovilizadas muertas; y con gotas sin células inmovilizadas. Se muestran las desviaciones típicas entre muestras ( $n = 3$ ).

#### Air-lift reactors

Results of measuring metals in the outlet of air-lift reactors can be seen in figure 4. Samples from the supernatant were taken during 24 hours for experiments without beads (blank experiment) and during the last 12 hours for experiments with

de las células libres o inmovilizadas. Las células libres o inmovilizadas de *N. gaditana*, en las condiciones experimentales, retiran todo el Cu presente en el medio. Asimismo, las células libres acumulan todo el Zn presente en el medio. Las gotas con células inmovilizadas acumulan alrededor del 80% del total del Zn presente en el medio. Las gotas sin células



**Figure 5.** Cu and Zn concentrations in the outlet of packed columns during 8 hours, for a theoretic outlet without beads (dark circles); beads without cells (light circles) and beads with cells (inverted triangles).

**Figura 5.** Concentraciones de Cu y Zn en el caudal de salida de columnas empaquetadas durante 8 horas, para un caudal de salida teórico sin gotas (círculos oscuros); gotas sin células (círculos blancos) y gotas con células (triángulos invertidos).

beads (with and without immobilized cells). Differences can be found for Cu between reactors without beads, reactors with beads entrapping cells within and reactors with beads without cells. For Zn, only beads with immobilized cells modify the metal concentrations in the outlet.

#### Packed columns

Results from measuring the outlet from the packed columns (comparing columns without beads, with beads without cells and with beads with cells) for Cu and Zn respectively are shown in figure 5. Saturation for Cu is not reached in beads with microalgal cells after 8 hours.

### Discussion

#### Immobilization technique

Entrapment of cells in calcium alginate seems to be a very flexible technique able to be used in biotechnology. The low toxicity of beads to microorganisms allows to keep living different microalgal species within (Moreno-Garrido, 1997). Data about the loss of the structure of beads in salt water can be found, but this process only affects in long period experiments. Anyway, Smidsrød and Skjåk-Braek (1990) recommend the removal of beads and the re-calcification (by immersion in solutions enriched with Ca) in the case of requiring longer periods of stability of beads.

acumulan alrededor del 80% del Cu pero, sin embargo, no acumulan cantidades importantes de Zn.

#### Células muertas vs. células vivas

En la figura 3 se muestran los niveles de metal acumulado de Cu y Zn por células inmovilizadas vivas o muertas de la especie *N. gaditana*. Las células inmovilizadas vivas retiraron altos porcentajes de ambos metales pero, ni las gotas con células muertas inmovilizadas ni las gotas sin células retiran cantidades apreciables de Zn. Las gotas con células muertas inmovilizadas acumularon cantidades significativamente más altas de Cu que gotas sin células, pero incluso estas series acumularon cantidades significativas de Cu (cerca del 70%).

#### Reactores tipo "air-lift"

En la figura 4 se muestran los resultados de las mediciones de metal en el caudal saliente de los reactores tipo *air-lift*. Para los experimentos sin gotas (blanco), las muestras del sobrenadante se tomaron durante 24 horas y para los experimentos con gotas (con o sin algas inmovilizadas) éstas se tomaron durante las últimas 12 horas. Se pueden encontrar diferencias para el Cu entre los reactores sin gotas, con gotas con algas inmovilizadas y con gotas sin células. Para el Zn, sin embargo, sólo las gotas con células inmovilizadas en el interior modificaron significativamente los niveles de metal en el caudal de salida.

#### Columnas llenas

En la figura 5 se muestran los resultados de las mediciones de metal en el caudal de salida (comparando columnas sin



### Accumulation during 24 hours

Results obtained after the 24-hour experiment with beads containing cells or not, indicate significant differences between accumulated metal levels, in both cases at the end of the test. The highest accumulated metal levels were obtained for beads containing entrapped cells. In the case of copper, the mean accumulated metal concentration in beads with entrapped cells at 24 hours was about 50 mg Kg<sup>-1</sup> (dry weight). For zinc, the maximum accumulation level (in beads with cells, at 24 hours, too) was about 35 mg Kg<sup>-1</sup> (dry weight). The metal amount in each beaker (initial concentrations in a 40-mL volume: Cu, 0.64 mg L<sup>-1</sup> and Zn, 0.65 mg L<sup>-1</sup>) were 0.0256 mg Cu and 0.026 mg Zn, respectively. The 1-mL beads samples of resulted in, approximately, 0.05 g mean dry weight (thus, there were around 0.5 g of dry beads in each beaker). From these data it is possible to deduce that the total Cu removed for all beads at 24 hours would be 0.025 mg from the initial 0.0256 mg, which means near 100%. In the case of Zn, the total metal removed for all beads at 24 hours would be 0.0175 mg from the initial 0.026 mg that means near 70%. These estimates are just speculative, since the total amount of metal in the beakers might be modified by the sampling technique (by removing beads, part of the present metal is removed too). In any case, the great affinity of calcium alginate for Cu seems evident, as demonstrated by the high accumulation levels detected in the beads without cells. Standard deviations between replicates do not let us discover a clear accumulation trend in respect to time, but a short initial accumulation phase must exist (first samples from beads with cells, after one hour, showed accumulated metal values near 35 mg Kg<sup>-1</sup> Cu and 20 mg Kg<sup>-1</sup> Zn (dry weight); for beads without cells, these values were near 25 mg Kg<sup>-1</sup> Cu and 14 mg Kg<sup>-1</sup> Zn), followed by a longer phase, only significant for beads containing cells, to reach the final values at 24 hours from the beginning of the test. These two accumulation phases have been described, referred to Cd, by Jennings and Rainbow (1979) in *Dunaliella tertiolecta*. Ross (1986) observed a similar behaviour for some metals in different microorganisms. Costa and Leite (1990) described two accumulation phases for Cd and Zn in *Chlorella homosphaera*, but they found differences between the two metals, possibly due to metabolic use of Zn by cells. Garnham *et al.* (1992b) found the same two phases in free cells of *Chlorella salina* for Co, Mn and Zn, and they demonstrated that the first phase was not dependent on the presence of light. Thus, it should be due to physical-chemical adsorption processes. The second phase, slower than the first one, should be due to metabolic absorption processes (the absorption during this phase was reduced if the temperature was lowered).

### Free vs. immobilized cells

The results in table 1 confirm the high affinity of calcium alginate for Cu. Differences between observed metal concentration in the control beakers and added metal could be

gotas, columnas con gotas sin células y columnas con gotas con microalgas inmovilizadas) para el Cu y el Zn. Tras 8 horas de exposición, aún no se alcanza la saturación de Cu en las gotas.

### Discusión

#### Técnica de inmovilización

La inclusión de células en matrices de alginato de calcio parece ser una técnica muy flexible, susceptible de ser usada en biotecnología. La baja toxicidad de las gotas para los microorganismos permite mantener con vida diferentes especies microalgales en su interior (Moreno-Garrido, 1997). Pueden encontrarse datos acerca de la pérdida de estructura de las gotas de alginato de calcio en agua salada, pero este proceso sólo afecta a las gotas en experimentos muy prolongados. De cualquier manera, Smidsrød y Skjåk-Braek (1990) recomiendan la remoción de las gotas del medio y su recalcificación (por inmersión en soluciones enriquecidas en Ca) en el caso de que se requieran periodos de estabilidad de las gotas más largos.

#### Acumulación durante 24 horas

Los resultados obtenidos para los experimentos en los que se estudiaba la evolución de la concentración de metal durante 24 horas sobre gotas de alginato de calcio, conteniendo células o no, en ambos casos muestran diferencias significativas entre los niveles de metal acumulado, al final del ensayo. Los mayores niveles de acumulación se obtuvieron para las gotas que contenían células inmovilizadas. En el caso del cobre, la concentración media de metal en las gotas con células inmovilizadas, después de 24 horas, fue de 50 mg Kg<sup>-1</sup> (peso seco). Para el zinc, el nivel máximo de acumulación (también en gotas con células inmovilizadas, tras 24 horas) fue de alrededor de 35 mg Kg<sup>-1</sup> (peso seco). La cantidad de metal en cada vaso de precipitado (para concentraciones iniciales de 0.64 mg L<sup>-1</sup> Cu y 0.65 mg L<sup>-1</sup> Zn, y un volumen experimental de 40 mL) fue de 0.0256 mg para el cobre y 0.026 mg para el zinc. Las muestras de 1 mL de gotas resultaron con un peso seco medio aproximado de 0.05 mg (esto es, que había alrededor de 0.5 g de gotas, en peso seco, en cada vaso de precipitado). A partir de estos datos se deduce que el Cu total retirado por todas las gotas con células después de 24 horas sería 0.025 mg de los 0.0256 mg de metal inicial, lo que significa cerca de un 100% del Cu añadido. En el caso del Zn, la cantidad total de metal retirado por las gotas de alginato de calcio con células sería 0.0175 mg de un total de 0.026, lo que significa un 70%. Estas estimaciones son sólo especulativas, porque las cantidades de metal en los vasos de precipitado podrían ser modificadas por la técnica de muestreo: al retirar gotas de cada uno, parte del metal presente es también retirado. En cualquier caso, parece

the result of adsorption processes to the plastic walls of the beakers. The lowest remaining (not accumulated) metal levels in the beakers were obtained for series with free cells or beads with entrapped cells. In the case of Cu, beads without cells accumulated it, but in the case of Zn, the accumulation of beads without cells is not significant. So, immobilized cells could be successfully used in order to remove metals from salt water, with advantages over free cells, related to the easier handling.

#### Dead vs. living cells

Wong and Chau (1990) described different accumulation rates of Zn by *Ankistrodesmus falcatus* dead or living cells: these rates were higher, during the first steps, for dead cells. Greene and Bedell (1990) mentioned that *Chlorella regularis* cells, dead by heat, accumulated greater amounts of uranium (VI) than living cells. On the one hand, it is known that photosynthetic processes imply a local increase of pH values near cell walls. This results in a greater cationic metal precipitation in the cellular surfaces of metabolic active cells (Liehr *et al.*, 1994). On the other hand, metal pumping mechanisms of detoxification have been described in some unicellular algae (Maeda and Sakaguchi, 1990), and this could result in greater metal accumulation levels in dead or inactive cells. So, this experiment is justified in order to elucidate if dead *N. gaditana* cells accumulate higher amounts of metal than living cells or not.

The great affinity of calcium alginate for Cu is evident again. In the case of this metal, beads with entrapped living cells removed the highest amount of Cu, followed by beads with dead cells and beads without cells at all. In the case of Zn, however, beads with dead cells and beads without cells accumulated similar levels of Zn, and beads with entrapped living cells accumulated greater levels of metal. Differences between the accumulation capacity of living entrapped cells and the capacities of the other beads in the case of Zn were greater than in the case of Cu. So, metabolic processes must be very important in the Zn accumulation processes, possibly due to the role this metal plays in important enzymes.

#### Air-lift reactors

Differences between the evolution of the concentration of copper in the reactors without beads, with beads without entrapped cells and with beads with entrapped cells are evident: Beads with entrapped cells accumulated more metal than beads without entrapped cells. Anyway, these latter accumulated measurable amounts of metal, so that there were differences between the evolution of copper concentration in the reactor without beads and that in the one with beads without cells.

In the case of zinc, no differences between the evolution of metal concentration in the last twelve hours were found. The accumulation capacity of calcium alginate for zinc must be

evidente la gran afinidad del alginato de calcio por el Cu, tal y como lo demuestran los altos niveles de acumulación encontrados en las gotas sin células. Las desviaciones típicas entre las réplicas no permiten descubrir una tendencia acumulativa clara respecto al tiempo, pero debe existir una primera fase acumulativa (las primeras muestras de gotas con células arrojan valores de metal acumulado de alrededor de 35 mg Kg<sup>-1</sup> Cu y 20 mg Kg<sup>-1</sup> Zn (peso seco); para gotas sin células, esos valores son de cerca de 25 mg Kg<sup>-1</sup> Cu y 14 mg Kg<sup>-1</sup> Zn), seguida de una fase más larga, sólo significativa para gotas que contenían células, hasta alcanzar los valores finales, después de 24 horas de iniciado del ensayo. Estas dos fases de acumulación han sido descritas, referidas al Cd, por Jennings y Rainbow (1979) en *Dunaliella tertiolecta*. Ross (1986) observó un comportamiento similar para algunos metales en diferentes microorganismos. Costa y Leite (1990) describen dos fases de acumulación para el Cd y el Zn en *Chlorella homosphaera*, pero advierten diferencias entre ambos metales, debidas posiblemente al uso metabólico del Zn por las células. Garnham *et al.* (1992b) encontraron las mismas dos fases en células libres de *Chlorella salina* para el Co, Mn y Zn, y demostraron que la primera fase no dependía de la presencia de luz. Así, esta fase parece deberse a procesos de absorción físico-químicos. La segunda fase, más lenta que la primera, se debería a procesos de absorción metabólica (la absorción durante esta fase se reducía si la temperatura se hacía descender).

#### Células libres vs. células inmovilizadas

Los resultados mostrados en la tabla 1 confirman la gran afinidad del alginato de calcio por el cobre. Las diferencias entre la concentración de metal observada en la serie control y el metal añadido podría deberse a procesos de absorción sobre las paredes plásticas de los vasos de precipitado. Las cantidades más bajas de metal remanente (no acumulado) en los vasos de precipitado se encontraron en las series con células libres o células inmovilizadas en gotas de alginato de calcio. En el caso del Cu, las gotas sin células acumulan metal, pero en el caso del Zn, la acumulación de las gotas sin células inmovilizadas no es significativa. Así, las células inmovilizadas podrían ser usadas con éxito para retirar metales de aguas saladas, con ventajas sobre las células libres, debidas a su más fácil manejo.

#### Células muertas vs. células vivas

Wong y Chau (1990) describen distintas tasas de acumulación de Zn por células de *Ankistrodesmus falcatus* vivas o muertas: durante las primeras fases, tales tasas eran mayores para las células muertas. Greene y Bedell (1990) mencionan que células de *Chlorella regularis*, muertas por calor, acumulaban mayores cantidades de uranio (VI) que las células vivas. Por una parte, se sabe que los procesos fotosintéticos incrementan los valores locales de pH cerca de las paredes

**Table 2.** Total amount of extruded metal in each column and retention average of each column in respect to columns without beads.  
**Tabla 2.** Cantidades totales de metal extruído en cada columna, por cada metal, y porcentaje de retención de cada columna respecto a columnas sin gotas.

| Column fill   | Metal | Extruded mg | % retention |
|---------------|-------|-------------|-------------|
| None          | Cu    | 0.173       | –           |
| Beads – cells | Cu    | 0.093       | 46          |
| Beads + cells | Cu    | 0.036       | 80          |
| None          | Zn    | 0.181       | –           |
| Beads – cells | Zn    | 0.170       | 6           |
| Beads + cells | Zn    | 0.106       | 42          |

very small, as demonstrated above. But there was a clear difference in the evolution of zinc concentration in the case of reactor containing beads with cells: *N. gaditana* accumulated appreciable amounts of metal.

#### Packed columns

Results obtained in continuous-flow reactors are confirmed here. Complete records of data during 8 hours for all series let us integrate the area under the concentration curves in figure 5. The result of the integration of the fitted function multiplied by the flux of the system shows the amount of metal that escapes from the column. The saturation curves are fitted by automatic iterations (until the convergence is satisfactory), using scientific graphic software, to the following formula:

$$y = K (1 - e^{-ct})$$

where outlet concentration ( $y$ ) is a function of inlet concentration ( $K$ ), the system flux ( $c$ ) and the time elapsed from the beginning of the experiment ( $t$ ).

Total mg of metal extruded by the columns in each case are shown in table 2, as well as the percentage of metal retained by the beads, compared with the blank columns. Beads without cells accumulated 52% of the Cu introduced and 15% of the Zn introduced. Beads with cells accumulated 81% of the Cu introduced and 46% of introduced Zn.

Some living organisms, in field conditions, take advantage of the alginate affinity for copper. Plant-associated bacteria are commonly exposed to copper-based bactericides, which are applied to reduce the disease incidence caused by these bacteria. Kidambi *et al.* (1995) found that the presence of copper induced the synthesis of large amounts of alginate by *Pseudomonas syringae* *pv.* *syringae*. This alginate production should reduce the cells' exposure to the toxic metal, apart from the chelating role that this substance should have.

celulares. Esto resulta en una más alta tasa de precipitación de metales catiónicos sobre las superficies celulares de las células metabólicamente activas (Liehr *et al.*, 1994). Por la otra, se han descrito mecanismos de desintoxicación por bombeo en algunas algas unicelulares (Maeda y Sakaguchi, 1990), y esto podría resultar en niveles más altos de acumulación en células muertas que en células vivas. Así, este experimento se justifica con objeto de elucidar si las células muertas de *N. gaditana* acumulan mayores cantidades de metal que las vivas o no. La gran afinidad del alginato de calcio por el Cu se pone de manifiesto de nuevo. En el caso de este metal, las gotas con células inmovilizadas retiran la mayor cantidad de Cu, seguidas por las gotas que contienen células muertas y éstas por las gotas que no contienen células. En el caso del Zn, sin embargo, las gotas con células muertas y las gotas sin células inmovilizadas acumulan cantidades similares de este metal, mientras que las gotas con células vivas inmovilizadas acumulan altos niveles de Zn. Las diferencias entre unas series y otras son más grandes en el caso del Zn que en el del Cu. Así, los procesos metabólicos deben ser muy importantes en los procesos de acumulación de Zn, posiblemente por el papel que juega este metal, al formar parte de importantes enzimas.

#### Reactores tipo *air-lift*

Existen diferencias entre la evolución de la concentración del Cu en los reactores sin gotas y con gotas, con o sin células inmovilizadas. Las gotas con células inmovilizadas acumulan más metal que las gotas sin células. Estas últimas, de cualquier modo, acumulan cantidades sensibles de metal, de modo que hay diferencias entre la evolución del Cu en el reactor sin gotas y en el reactor con gotas sin células inmovilizadas. En el caso del Zn, no hay diferencias apreciables entre la evolución de la concentración del metal en las últimas 12 horas para estas dos series: la capacidad de acumulación del alginato de calcio para el Zn debe ser muy pequeña, tal y como se ha demostrado en los experimentos anteriores. No obstante, sí existen diferencias en la evolución de la concentración de Zn en el caso de gotas

## References

- Absil, M.C.P. and Van Scheppingen, Y. (1996). Concentrations of selected heavy metals in benthic diatoms and sediment in the Westerhelde estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 1008–1015.
- Burdin K.S. and Bird, K.T. (1994). Heavy metal accumulation by carrageenan and agar producing algae. *Botanica Marina*, 37: 467–470.
- Codd, G.A. (1987). Immobilized micro-algae and cyanobacteria. *British Phycological Society Newsletter*, 24.
- Costa, A.C.A and Leite, S.G.F. (1990). Cadmium and zinc biosorption by *Chlorella homosphaera*. *Biotechnology letters*, 12 (12): 941–944.
- Craggs, R.J., Smith, V.J. and McAuley, P.J. (1995). Wastewater nutrient removal by marine microalgae cultured under ambient conditions in mini-ponds. *Wat. Sci. Tech.*, 31(12): 151–160.
- Eppley, R.W. and Weiler, C.S. (1979). The dominance of nanoplankton as an indicator of marine pollution: a critique. *Oceanologica Acta*, 2(2): 241–245.
- Gadd, G.M. and Griffiths, A.J. (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4: 303–317.
- Garbisu, C., Gil, J.M., Bazin, M.J., Hall, D.O. and Serra, J.L. (1991). Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 3: 221–234.
- Garnham, G.W., Codd, G.A. and Gadd, G.M. (1992a). Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Clorella salina* immobilized in alginate microbeads. *Environ. Sci. Technol.*, 26 (9): 1764–1770.
- Garnham, G.W., Codd, G.A. and Gadd, G.M. (1992b). Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 37: 270–276.
- Greene, B. and Bedell, G.W. (1990). Algal gels or immobilized algae for metal recovery. In: I. Akatsuka (ed.), *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing bv, The Hage, The Netherlands, pp. 137–149.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms, I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8: 229–239.
- Hertzberg, S. and Jensen, A. (1989). Studies of alginate-immobilized marine microalgae. *Botanica marina*, 32: 267–273.
- Hibberd, D.J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (Synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82 (2): 93–119.
- Jang, L.K., Nguyen, D., and Geesey, G.G. (1995). Selectivity of alginate gel for Cu vs. Co. *Wat. Res.*, 29 (1): 307–313.
- Jennings, J.R. and Rainbow, P.S. (1979). Accumulation of cadmium by *Dunaliella tertiolecta* Butcher. *Journal of Plankton Research*, 1 (1): 67–74.
- Karez, C.S., Magalhaes, V.F., Pfeiffer, W.C. and Amado Filho, G.M. (1994). Trace metal accumulation by algae in Sepetiba Bay, Brazil. *Environmental pollution*, 83: 351–356.
- Kidambi, S.P., Sundin, G.W., Palmer, d.a. Chakrabarty, A.M. and Bender, C.L. (1995). Copper as a signal for alginate synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, (June): 2172–2179.
- de alginate con células inmovilizadas: *N. gaditana* acumula cantidades apreciables de metal.

## Columnas llenas

Aquí se confirman los resultados obtenidos de los experimentos realizados en reactores de flujo continuo. La recopilación completa de datos durante ocho horas para todas las series ensayadas nos permite integrar el área bajo la curva de las concentraciones de la figura 5. El resultado de la integración de la función ajustada, multiplicada por el flujo del sistema, nos permite conocer la cantidad de metal que escapa de la columna. La curva de saturación se ajusta, por iteraciones automáticas (hasta que la convergencia es satisfactoria) mediante un programa gráfico, a la siguiente fórmula:

$$y = K (1 - e^{-ct})$$

donde la concentración en el caudal de salida ( $y$ ) está en función de la concentración del caudal de entrada ( $K$ ), el flujo del sistema ( $c$ ) y el tiempo desde el inicio del experimento ( $t$ ).

En la tabla 2 se muestran los mg totales de metal extruído por las columnas en cada caso, así como los porcentajes de metal retenido por las gotas, comparados con los obtenidos en las columnas sin gotas (blancos). Las gotas sin células acumularon 52% del cobre introducido en las columnas y 15% del Zn. Las gotas con células acumularon el 81% del Cu introducido y el 46% del Zn.

La afinidad del alginate por el cobre es utilizada por algunos organismos en condiciones de campo. Bacterias asociadas a plantas son expuestas frecuentemente a bactericidas basados en el Cu, que se aplican con objeto de reducir la incidencia de enfermedades causadas por tales bacterias. Kidambi *et al.* (1995) observaron que la presencia de Cu inducía la síntesis de grandes cantidades de alginate por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Tal producción de alginate podría reducir la exposición de las células bacterianas al metal tóxico, además del papel quelante que podría jugar dicha substancia.

Traducido el español por los autores.

- 
- Leusch, A., Holan, Z.R. and Volesky, B. (1995). Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically-reinforced biomass of marine algae. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 62: 279–288.
- Liehr, K.S., Chen, H.J. and Lin, S.H. (1994). Metals removal by algal biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, 30 (11): 59–68.
- Lubián, L.M. (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp. Nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa*, 4: 287–293
- Maeda, D. and Sakaguchi, T. (1990). Accumulation and detoxification of toxic elements by algae. In: I. Akatsuka (ed.), *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing bv, The Hage, The Netherlands, pp. 109–136.
- McHale, A.P. and McHale, S. (1994). Microbial biosorption of metals: potential in the treatment of metal pollution. *Biotech. Adv.*, 12: 647–652.

- Moreno-Garrido, I. (1997). Toxicidad y acumulación de metales pesados en microalgas marinas usadas en acuicultura. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- Proulx, D. and de la Noue, J. (1988). Removal of macronutrients from wastewaters by immobilized microalgae. In: Moo-Young (ed.), Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells. Fundamentals and Applications. Elsevier Applied Science Publ. Ltd., Essex.
- Robinson, P.K., Mak, A.L. and Trevan, M.D. (1986). Immobilized algae: a review. *Process Biochemistry*. (August): 122–126
- Ross, I.S. (1986). Uptake of heavy metals by microorganisms. *Internat. Industr. Biotechnol.*, 6: 184–188.
- Ross, I.S. (1987). The use of microorganisms for the removal and recovery of heavy metals from aqueous effluents. *Internat. Industr. Biotechnol.*, 99: 7: 6–7.
- Sakaguchi, T., Tsuji, T., Nakajima, A. and Horikoshi, T. (1979). Accumulation of cadmium by green microalgae. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8: 207–215.
- Smidsrød, O. and Skjåk-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech*, 8: 71–78.
- Thepenier, C., Gudin, C. and Thomas, D. (1985). Immobilization of *Porphyridium cruentum* in polyurethane foams for the production of polysaccharide. *Biomass*, 7: 225–240.
- Tobar, J.L. Boubeta Novas, J., Arredondo Vega, B.O. and Fábregas, J. (1993). Incorporación de cobre en la microalga marina *Tetraselmis suecica* en función de su concentración en el medio. *Actas III Congreso Latinoamericano de Ficología*.
- Volesky, B. and Holan, Z.R. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Progress.*, 11: 235–250.
- Volesky, B. and Prasetyo, I. (1994). Cadmium removal in a biosorption column. *Biotechnology and Bioengineering*, 43: 1012–1015.
- Wahbeh, M.I. (1985). Concentrations of zinc, manganese, copper, cadmium, magnesium and iron in ten species of algae and sea water from Aqaba, Jordan. *Marine Environmental Research*, 16: 95–102.
- Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Jangoux, M. and Dubois, P. (1995). Experimental cadmium contamination of the echinoid *Paracentrotus lividus*: influence of exposure mode and distribution of the metal in the organism. *Marine Ecology Progress Series*, 166: 117–124.
- Wong, P.T.S. and Chau, Y.K. (1990). Zinc toxicity to freshwater algae. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 5: 167–177.