

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vilchez
Martín”



**Aplicaciones biotecnológicas y mediambientales de la
microalga *Chlorella sorokiniana***

**Biotechnological and environmental
applications of the microalga *Chlorella
sorokiniana***

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Antonio León Vaz

Fecha de lectura: 29 de abril de 2021

Bajo la dirección de los doctores:

Javier Vigara Fernández

Rosa María León Bañares

Huelva, 2021



UNIVERSIDAD DE HUELVA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA “PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”



Universidad
de Huelva

TESIS DOCTORAL

“APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS Y MEDIOAMBIENTALES DE LA MICROALGA *CHLORELLA* *SOROKINIANA*”

“BIOTECHNOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL APPLICATIONS OF THE MICROALGA *CHLORELLA* *SOROKINIANA*”

PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIA Y TECNOLOGÍA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:

Antonio León Vaz

Trabajo presentado bajo la dirección de:

Dr. Javier Vigara Fernández

Dra. Rosa María León Bañares

Huelva, 2021

“Si hay algo en nosotros verdaderamente divino es la voluntad. Por ella afirmamos la personalidad, templamos el carácter, desafiamos la adversidad, construimos el cerebro y nos superamos diariamente”

Santiago Ramón y Cajal

“Invertir en conocimientos produce siempre los mejores beneficios”

Benjamin Franklin

Agradecimientos

Cuando empiezas a escribir la tesis ves muy lejos la parte de los agradecimientos (que siempre se suele dejar para el último lugar), pero cuando llegas a este “final” te das cuenta de que esta es la parte de la tesis que es más difícil de escribir, ya que en todo este tiempo pasan por tu vida muchas personas que te marcan y con quien vives grandes momentos, y siempre temes dejarte algo por el camino. No obstante, y aunque no soy bueno en este tipo de cosas, trataré de hacerlo de la mejor manera que pueda.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Universidad de Huelva por haberme permitido desarrollar esta Tesis Doctoral, así como por financiar parte de ella a través de fondos europeos y estatales, mediante proyectos de investigación (INTERREG VA-POCTEP- 2014-2020; 0055_ALGARED_PLUS_5_E y AGL2016-74866-C32R-AEI/FEDER) y contratos a cargo del sistema nacional de garantía juvenil (UHU JPI-018). Quisiera agradecer también a CEIMAR por permitirme realizar la estancia que ha dado lugar a que esta tesis opte a la mención de doctorando internacional.

A parte de las diferentes instituciones, quiero empezar agradeciendo a mis directores de tesis, en primer lugar, por acogerme en su grupo de investigación para poder realizar este trabajo que hemos culminado. Sin vosotros guiándome desde el principio no hubiera sido posible llegar hasta donde estamos ahora, ni me hubiera convertido en la persona que soy ahora. Gracias Javi y Rosa por vuestra paciencia, por vuestros ánimos en los momentos difíciles, por ser más que directores amigos, y por enseñarme la mayoría de las cosas que ahora mismo sé del mundo de la ciencia. Tengo la suerte de poder decir que vosotros sois mis padres científicos. Gracias Rosa, por contagiarme tu pasión y tu dedicación por la ciencia y por estar ahí en los momentos más duros dispuesta a apoyarme en todo, aconsejándome y facilitándome el trabajo. Gracias Javi, por estar siempre ahí ayudándome a llevar un camino llano mientras cruzabas montañas, enseñándome a luchar por todo en esta vida.

Aunque no hayan sido mis directores de tesis, también me gustaría agradecer este trabajo otros profesores que me han ayudado en la realización de esta tesis. A Carlos Vílchez e Inés Garbayo, por haber estado ahí siempre que os hemos pedido algo, y siempre dispuestos a ayudarme y aconsejarme en todo. También, en este apartado, merece una mención especial la profesora Inma Giráldez. Gracias Inma por haberme acogido en tu grupo durante los 18 meses que estuve contratado por Garantía Juvenil, tiempo en el cual aprendí muchas cosas de la Química Analítica; así como darte las gracias por estar siempre atenta a intentar solucionarme los problemas y poner todo tu saber y tu laboratorio a mi disposición para la realización de este trabajo.

I would like to thank also Prof. Sara Raposo for letting me belong to his research group in the Universidade do Algarve during three months. Thanks also to Ana and Valdemira for makin my stay easier and accepting me as part of their group.

Siendo esta mi Tesis Doctoral, siempre me gusta decir que la investigación es un trabajo de grupo; por eso mismo también me gustaría agradecer a todas esas personas con las que he compartido mil batallas, tanto en el laboratorio como fuera de él, a lo largo de este tiempo. Muchas gracias a todas mis compañeras (creo que he sido el único hombre en todo este tiempo), que más que eso podría decir amigas, con las que he compartido momentos difíciles y momentos geniales, en el laboratorio, de cafés, de almuerzos, de cenas, de congresos, de copas,

Agradecimientos

de viajes... Muchas gracias a Marta, Encarni, Mari, Rocío, Laura, Ana, Patri, Montse (Canarias) y Monse (Ifapa) por todo este tiempo y estas vivencias, las cuales serían imposibles de resumir y que esperamos puedan ser muchas más en el futuro.

También quería incluir a compañeros con los que, aunque no hemos trabajado tan cerca, han estado presentes a lo largo de este periodo de tesis. Gracias a la parte de Ciderta, a María Cuaresma, Juanlu, Eli, Zaida y María Vázquez; gracias también a Alberto que, aun siendo de ingeniería, hemos estado trabajando duro en docencia en tiempos del Covid; gracias a Juan, que ha sido un gran compañero en la sala de becarios al final de este trayecto; y gracias a Toni por estar para cualquier duda de informática.

En este apartado quisiera incluir también a las personas de fuera de la Universidad de Huelva con las que he colaborado en estas investigaciones, ya que la ciencia, para que sea de mejor calidad, necesita de un trabajo multidisciplinar que agrupe varios puntos de vista; y estas personas han ayudado a mejorar la calidad de la ciencia con la que he trabajado. Gracias a los investigadores del IBVF Luis Romero y Cecilia Gotor por vuestro apoyo en la parte de proteómica; gracias también a los investigadores del ICMAN Ignacio Moreno (Nacho) y a sus chicas Cristina y Ana y al grupo del profesor Joao Varela por suministrarme las especies de microalgas que aislaron y por toda la ayuda cada vez que les he pedido algo; y gracias a los investigadores del IFAPA Pedro Cañavate y Catalina Fernández por vuestro enfoque al trabajo del perfil de aminoácidos, el cual nos ha permitido obtener resultados muy novedosos que serán presentados en este trabajo.

Fuera del ámbito académico quisiera empezar agradeciendo a mi familia por todo su apoyo, en especial a mis padres, por todo su apoyo incondicional desde que empecé esta aventura hace algunos años; porque siempre han estado ahí en lo bueno y en lo malo dándome ánimos para seguir luchando por un presente y futuro mejor. También quisiera hacer una mención especial a mi hermana Lourdes, por aguantarme el tiempo que estuvimos en el piso y por apoyarme siempre en todo; así como al resto de mi familia, que se ha estado interesando siempre por mi trabajo y animándome a seguir.

Finalmente quisiera agradecer a todas esas personas que han estado en mi vida durante este tiempo, apoyándome y estando siempre ahí para lo que ha hecho falta, aunque no nos viéramos o habláramos tanto como nos gustaría. Mil gracias a todos.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS	1
1.1. Las microalgas	3
1.1.1. Características generales	3
1.2. Principales factores de crecimiento	4
1.2.1. Luz	4
1.2.2. pH y temperatura	6
1.2.3. Macronutrientes	6
1.2.4. Micronutrientes y elementos traza	8
1.3. Estrés oxidativo	8
1.4. Microalgas y sus aplicaciones biotecnológicas y medioambientales	9
1.4.1. Residuos industriales	10
1.4.2. Metales pesados	12
1.4.3. Acuicultura	15
1.5. Las microalgas dentro de la economía circular	17
1.6. <i>Chlorella sorokiniana</i>	19
1.6.1. Descripción	19
1.6.2. Aplicaciones biotecnológicas y medioambientales de <i>Chlorella sorokiniana</i>	20
1.7. Ingeniería genética de microalgas como elemento potenciador en sus aplicaciones biotecnológicas	21
1.8. Objetivos de la Tesis	23
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1. Microorganismos empleados	27
2.1.1. Bacterias	27
2.1.2. Microalgas	27
2.2. Medios y condiciones de cultivo	28

2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	28
2.2.2. <i>Chlorella sorokiniana</i>	29
2.3. Cultivo en <i>fed-batch</i> y determinación de los parámetros cinéticos	30
2.4. Preparación de los extractos crudos celulares	31
2.4.1. Sonicación	31
2.4.2. Agitación con perlas de vidrio	32
2.5. Cálculo de la concentración de metales pesados y factor de bioconcentración	32
2.6. Determinación de actividades enzimáticas	33
2.6.1. Ascorbato peroxidasa	33
2.6.2. Catalasa	34
2.6.3. Glutamina sintetasa	34
2.6.4. Glutamato deshidrogenasa aminante	34
2.6.5. O-acetilserina (tiol)-liasa	35
2.6.6. NAD-Isocitrato deshidrogenasa	35
2.7. Análisis de la expresión mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR)	35
2.7.1. Diseño de oligonucleótidos	35
2.7.2. Extracción de ARN y retrotranscripción	36
2.7.3. Análisis qPCR	36
2.8. Análisis proteómico mediante espectrometría de masas	37
2.8.1. Pretratamiento de las muestras	37
2.8.2. Análisis LC-MS/MS	38
2.8.3. Creación de la librería	38
2.9. Manipulación genética	39
2.9.1. Plásmidos y construcciones utilizadas	39
2.9.2. Electroporación	40
2.9.3. Análisis molecular de los transformantes	40

2.9.4. Análisis de los transformantes mediante inmunodetección	41
2.10. Criopreservación	41
2.11. Determinación de aminoácidos	42
2.11.1. Obtención de aminoácidos	42
2.11.2. Análisis de aminoácidos por GC-MS	42
2.12. Microscopía	43
2.13. Determinaciones analíticas	43
2.13.1. Peso seco	43
2.13.2. Acetato	43
2.13.3. Amonio	43
2.13.4. Lípidos neutros	44
2.14. Análisis estadístico	44

CAPÍTULO 3: UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGRO-INDUSTRIALES PARA EL CRECIMIENTO MIXOTRÓFICO Y LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS EN LA MICROALGA *CHLORELLA SOROKINIANA*

Abstract	47
Resumen	47
3.1. Introducción	48
3.2. Influencia de la luz en el crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivada en diferentes condiciones tróficas	49
3.3. Utilización de diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo	52
3.4. Optimización de las concentraciones iniciales de acetato (lías oxidadas) y amonio para <i>Chlorella sorokiniana</i>	53
3.5. Influencia de la concentración de acetato (lías oxidadas) en la productividad de lípidos	55
3.6. Desarrollo del cultivo <i>fed-batch</i> como estrategia para mejorar la productividad de biomasa y lípidos utilizando lías como fuente de carbono	56

CAPÍTULO 4: TOLERANCIA Y RESPUESTA DE <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> AL ESTRÉS PRODUCIDO POR METALES PESADOS Y CAPACIDAD BIOACUMULADORA DE ESTE ORGANISMO	59
Abstract	61
Resumen	61
4.1. Introducción	63
4.2. Tolerancia, acumulación y respuesta al estrés producido por distintos metales pesados en la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	64
4.2.1. Efecto de los metales pesados en el crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i>	64
4.2.2. Efecto de los metales pesados en el consumo de nitrógeno de <i>Chlorella sorokiniana</i>	66
4.2.3. Capacidad de acumulación de metales pesados de <i>Chlorella sorokiniana</i>	67
4.2.4. Efecto de los metales pesados en la expresión génica y la actividad enzimática	69
4.3. Estudio proteómico del efecto del cadmio en la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	73
4.3.1. Efecto de la exposición al cadmio en el crecimiento y la morfología celular de <i>Chlorella sorokiniana</i>	73
4.3.2. Alteraciones en el proteoma de <i>Chlorella sorokiniana</i> como consecuencia de la exposición al cadmio	74
4.3.3. Efecto del cadmio en la fotosíntesis y la fotorrespiración	76
4.3.4. Respuestas en la fosforilación oxidativa debido al cadmio	78
4.3.5. Estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo antioxidante producidos por cadmio	78
4.3.6. Efecto del cadmio en la asimilación y el metabolismo del carbono	81
4.3.7. Alteraciones en la asimilación y el metabolismo del nitrógeno y el azufre	83
4.3.8. Cambios causados por el cadmio en la síntesis de aminoácidos	84

4.3.9. Efectos del cadmio en las proteínas ribosomales	84
4.3.10. Otras alteraciones inducidas por cadmio	84
CAPÍTULO 5: ELECTROTRANSFORMACIÓN DE LA MICROALGA CHLORELLA SOROKINIANA UTILIZANDO DIFERENTES PROMOTORES HETERÓLOGOS	87
Abstract	89
Resumen	89
5.1. Introducción	90
5.2. Optimización del método de electroporación para la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	91
5.3. Transformación de <i>Chlorella sorokiniana</i> con el gen <i>APHVIII</i> bajo el control de tres diferentes promotores heterólogos	92
5.4. Análisis de la integración de los transgenes y su expresión	94
5.5. Criopreservación de los transformantes obtenidos	95
CAPÍTULO 6: VARIABILIDAD DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS ESTRUCTURALES Y LIBRES EN DISTINTOS GRUPOS DE FITOPLACNTON. COMPARATIVA CON CHLORELLA SOROKINIANA	97
Abstract	99
Resumen	99
6.1. Introducción	100
6.2. Descripción del contenido de aminoácidos en las microalgas estudiadas	100
6.3. Determinación del perfil aminacídico asociado a la variabilidad taxonómica de las microalgas estudiadas	109
6.4. Contenido de aminoácidos esenciales de los diferentes grupos de microalgas e influencia en el valor nutricional	111
CONCLUSIONES	115

CONCLUSIONS	121
BIBLIOGRAFÍA	127
<i>CURRICULUM VITAE</i>	147

Índice de Figuras

- Figura 1.1** Esquema de la fotosíntesis (Figura 1.1A) y la fotorrespiración (Figura 1.1B) en microalgas.
- Figura 1.2** Metabolismo de asimilación del N y S.
- Figura 1.3** Sistemas enzimáticos antioxidantes.
- Figura 1.4** Proceso estándar de cultivo de microalgas en aguas residuales industriales.
- Figura 1.5** Transferencia de metales pesados a través de la cadena trófica.
- Figura 1.6** Mecanismos de bioadsorción y bioacumulación de metales pesados en su forma de catión (HM+) en microalgas.
- Figura 1.7** Esquema de la producción acuícola basada en la presencia de microalgas en el medio.
- Figura 1.8** Clasificación de aminoácidos según sus necesidades nutricionales.
- Figura 1.9** Modelo de economía circular.
- Figura 1.10** Foto al microscopio de la microalga *Chlorella sorokiniana*.
- Figura 2.1** Instalación del reactor en el que se llevó a cabo el cultivo en *fed-batch*.
- Figura 2.2** Sistema de Espectrometría de Plasma con Detector de Masas (ICP-MS).
- Figura 2.3** Construcciones utilizadas para la transformación de *Chlorella sorokiniana*.
- Figura 3.1** Influencia de la densidad celular en el apantallamiento producido en cultivos de *C. sorokiniana*.
- Figura 3.2** Influencia del diámetro del recipiente en el tiempo de generación de *C. sorokiniana*.
- Figura 3.3** Curva de crecimiento de la microalga *C. sorokiniana* cultivada con diferentes fuentes de carbono.
- Figura 3.4** Curva de crecimiento (A) y consumo de acetato (B) de *C. sorokiniana* cultivada en condiciones mixotróficas con concentraciones crecientes de acetato.
- Figura 3.5** Curva de crecimiento (A) y consumo de amonio (B) de *C. sorokiniana* cultivada en condiciones mixotróficas con concentraciones crecientes de amonio.
- Figura 3.6** Concentración de lípidos neutros (A) y porcentaje de lípidos en el peso seco (B) en *C. sorokiniana* cultivada en ausencia de nitrógeno con concentraciones crecientes de acetato.
- Figura 3.7** Evolución del peso seco, consumo de acetato y amonio (A) y contenido de lípidos neutros (% DW); (B) de *C. sorokiniana* cultivada en un reactor 2L-STR.

- Figura 4.1** Curva de crecimiento de *C. sorokiniana* cultivada con diferentes concentraciones de Cu⁺² (A), Cd⁺² (B), As III (C) y As V (D).
- Figura 4.2** Porcentaje de la tasa de crecimiento específica respecto al control de *C. sorokiniana* cultivada con Cu⁺², Cd⁺² y As III (A); y As V (B).
- Figura 4.3** Actividad enzimática relativa de enzimas antioxidantes y precursoras de glutamato y cisteína, de *C. sorokiniana* sometida a estrés metálico tras 42 h de cultivo.
- Figura 4.4** Estudio de inhibición de la actividad APX de *C. sorokiniana* provocada por la presencia de Cu⁺² y Cd⁺² en la mezcla de ensayo.
- Figura 4.5** Expresión génica relativa de enzimas antioxidantes y precursoras de glutamato y cisteína de *C. sorokiniana* sometida a estrés metálico tras 42 h de cultivo.
- Figura 4.6** Efectos fisiológicos del Cd en *C. sorokiniana*.
- Figura 4.7** Diagrama de Venn con las proteínas identificadas de *C. sorokiniana* en el control y en cultivo tratado con 250 µM de Cd (A), y clasificación funcional según GO de las proteínas que sólo se encontraron o fueron significativamente más abundantes en los cultivos tratados con Cd clasificadas en procesos biológicos (B) y función molecular (C).
- Figura 4.8** Red de interacción proteína-proteína de las que fueron significativamente más abundantes o sólo fueron localizadas en los cultivos tratados con Cd.
- Figura 4.9** Efecto del Cd en las rutas de fotosíntesis y fotorrespiración de *C. sorokiniana*.
- Figura 4.10** Efecto del Cd en la fosforilación oxidativa de *C. sorokiniana*.
- Figura 4.11** Alteraciones en el metabolismo del almidón, glucólisis, gluconeogénesis y ciclo de Krebs en *C. sorokiniana* tras su exposición a Cd.
- Figura 4.12** Cambios del proteoma en la ruta de asimilación del N y el S cuando *C. sorokiniana* es cultivada con Cd.
- Figura 5.1** Colonias de *C. sorokiniana* que mostraron resistencia a la paromomicina después de la electroporación con el gen *APHVIII*.
- Figura 5.2** Detección del gen *APHVIII* en las colonias de *C. sorokiniana* crecidas en paromomicina tras la electroporación.
- Figura 5.3** Análisis mediante *western blot* de los transformantes de *C. sorokiniana* electroporados con el gen *APHVIII*.
- Figura 6.1** Análisis de componentes principales (PCA) y distribución según las componentes que explican mayormente la variabilidad, denominadas PC1 y PC2, del perfil de aminoácidos estructurales de las 57 especies de microalgas estudiadas en este trabajo.
- Figura 6.2** Análisis de componentes principales (PCA) y distribución según las componentes que explican mayormente la variabilidad, denominadas PC1 y PC2, del perfil de aminoácidos libres de las 57 especies de microalgas estudiadas en este trabajo (A) y las diferentes ampliaciones de la imagen en los clústeres con mayor número de muestras (B y C).

- Figura 6.3** Valor nutricional de los diferentes *phyla* referido a los parámetros de proteínas en peso seco, EAA estructurales y EAA libres, según los datos de las Tablas 6.1 y 6.2.
- Figura 6.4** Valor nutricional de las microalgas seleccionadas referido a los parámetros de proteína en peso seco, EAA estructurales y EAA libres, según los datos de las Tablas 6.1 y 6.2.

Índice de Tablas

- Tabla 1.1** Clasificación de la microalga *Chlorella sorokiniana*.
- Tabla 2.1** Clasificación taxonómica y procedencia del listado de especies utilizadas en el Capítulo 6.
- Tabla 2.2** Composición aniónica de las lías oxidadas utilizadas como fuente de carbono para el cultivo mixotrófico de *Chlorella sorokiniana*.
- Tabla 2.3** Oligonucleótidos utilizados para los experimentos de qPCR
- Tabla 2.4** Oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR de los transformantes de *C. sorokiniana*
- Tabla 3.1** Biomasa máxima producida y tasa de crecimiento específica de la microalga *C. sorokiniana* cultivada en diferentes condiciones tróficas
- Tabla 3.2** Tasa de crecimiento específica de *C. sorokiniana* cultivada con diferentes fuentes de carbono.
- Tabla 3.3** Tasa de crecimiento específica y biomasa máxima producida en el cultivo *fed-batch* del biorreactor STR.
- Tabla 3.4** Parámetros cinéticos del crecimiento de *C. sorokiniana* en el reactor 2L-STR utilizando el método *fed-batch*.
- Tabla 4.1** Velocidad de consumo de amonio de *C. sorokiniana* durante las primeras 24 horas de cultivo.
- Tabla 4.2** Peso seco acumulado y factor de bioconcentración (BCF) de *C. sorokiniana* con diferentes metales pesados a las 72 h de cultivo.
- Tabla 4.3** Lista de las proteínas mencionadas en el texto que presentan diferencias significativas entre los cultivos control y los tratados con Cd, clasificadas mediante rutas metabólicas
- Tabla 5.1** Eficiencia de la transformación de *C. sorokiniana* bajo diferentes condiciones de electroporación.
- Tabla 5.2** Eficiencia de la transformación de *C. sorokiniana* con diferentes promotores.

- Tabla 5.3** Porcentaje de células viables y tiempo de recuperación de *C. sorokiniana* criopreservada, a -80°C, con diferentes concentraciones de DMSO y EG, entre 1 y 365 días.
- Tabla 6.1** Perfil de aminoácidos estructurales determinado por GC-MS, en % del total; y % de proteínas en peso seco obtenido a partir de los valores cuantitativos del GC-MS de las microalgas estudiadas. Los valores de SD son menores del 5% en todos los casos.
- Tabla 6.2** Perfil de aminoácidos libres determinado por GC-MS, en % del total en peso seco obtenido a partir de los valores cuantitativos del GC-MS de las microalgas estudiadas. Los valores de SD son menores del 5% en todos los casos.

Abreviaturas

ACS	Acetil CoA sintasa
ADP	Adenosín bifosfato
AMT	<i>Ammonium transporter</i>
AP	Fosfatasa alcalina
APHVIII	<i>Aminoglycoside 3'-phosphotransferase</i>
APS	Adenosina fosfosulfato
APX	Ascorbato peroxidasa
Asx	Aspartato/Asparragina
ATP	Adenosín trifosfato
BCF	Factor de bioconcentración
CAT	Catalasa
CaMV 35S	Promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor
C-	Control negativo
C+	Control positivo
DDA	<i>Data dependent acquisition</i>
DIA	<i>Data independent acquisition</i>
DIC	Método diferencial de contraste de interferencia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTE	Ditioeritrol
DTT	Ditiotreitrol
DW	Peso seco
EAA	Aminoácidos esenciales
EG	Etilenglicol
EI	Ionización de electrones
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDR	Proporción de falsos positivos
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a detector de masas

Abreviaturas

GDH	Glutamato deshidrogenasa
Glx	Glutamato/Glutamina
GMO	Organismos genéticamente modificados
GO	<i>Gene Orthology</i>
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutación
GUS	Gen de la β -glucoronidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSPs	<i>Heat shock proteins</i>
IBVF	Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
ICMAN	Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía
ICP-MS	Espectrometría de masasa con plasma acoplado inductivamente o <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
NAD-IDH	NAD-Isocitrato deshidrogenasa
IFAPA	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
ISA	<i>Ionic Strength Adjusted</i>
KEGG	<i>Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LB	Luria-Bertani
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a detector de masas
MeHg	Metil-mercurio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido(fosfato)
NiR	Nitrito reductasa
NOS	Promotor de la nopalina sintasa
NR	Nitrato reductasa
NTR	<i>Nitrate transporter</i>
OASTL	O-acetilserina (tiol)-liasa
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PAR	Radiación solar fotosintéticamente activa
P _{biom}	Productividad de biomasa
PC1	Componente principal 1

PCA	Análisis de componentes principales
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCs	Fitoquelatinas
PDS	Fitoeno desaturasa
phc	Peso húmedo
Pi	Fosfato inorgánico
PiT	Transportadores de fosfato inorgánico
P _{Lipid}	Productividad de lípidos
PQ	Plastoquinona
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Polifluoruro de vinildieno
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	PCR a tiempo real/cuantitativa
RUBISCO	Ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa
SOD	Superóxido dismutasa
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i>
STRING	<i>Protein-Protein Interactions Networks Functional Enrichment Analysis</i>
SWATH-MS	<i>Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra</i>
TAP	<i>Tris-Acetate-Phosphate</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TCA	Tricarboxylic Acids Cycle
t _d	Tiempo de generación
TOF MS	Detector de masas de tiempo de vuelo
UF	Unidades de fluorescencia
UV	Ultravioleta
Y _{L/X}	Contenido de lípidos
Y _{L/S}	Rendimiento de lípidos
ZDS	ξ-caroteno desaturasa
ZEP	Zeaxantina epoxidasa
μ	Tasa de crecimiento específica

Resumen

El término microalga engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos unicelulares que realizan fotosíntesis oxigénica y que han demostrado una gran capacidad para fijar CO₂ y producir O₂, con una eficiencia entre 10 y 50 veces mayor que las plantas superiores. En los últimos años, han despertado un gran interés como potenciales fijadores de CO₂ y productores de biocombustibles con baja huella de carbono, así como, por el aprovechamiento de su biomasa para la obtención de compuestos de alto valor añadido, que pueden ser utilizados en la industria cosmética, farmacéutica, en nutrición humana o alimentación animal. Más aún, algunas especies de microalgas pueden utilizar residuos agroindustriales como nutrientes y tolerar altas concentraciones de contaminantes, como los metales pesados, lo que las convierte en sistemas muy prometedores para procesos de bioremediación. Todos estos aspectos se revisan con detalle en un capítulo introductorio (**Capítulo 1**). Esta memoria de Tesis doctoral incluye además un capítulo con la descripción pormenorizada de toda la metodología utilizada (**Capítulo 2**) y cuatro capítulos que describen los resultados de las investigaciones realizadas utilizando la microalga clorofita perteneciente a la clase de las *Trebouxiophyceae*, *Chlorella sorokiniana*, una especie robusta y capaz de crecer con una alta tasa de crecimiento, incluso en condiciones adversas. Las investigaciones realizadas se centran en las potenciales aplicaciones biotecnológicas y medioambientales de la microalga, entre las que se incluyen su cultivo utilizando residuos industriales (**Capítulo 3**) o en presencia de metales pesados (**Capítulo 4**). Además, se ha optimizado la metodología para la modificación genética de la microalga mediante electroporación (**Capítulo 5**) y se ha realizado una comparativa de su perfil de aminoácidos y su valor nutricional frente al de otras 57 especies de microalgas (**Capítulo 6**).

En las investigaciones descritas en el **Capítulo 3** se muestra como la microalga *Chlorella sorokiniana* puede cultivarse en condiciones mixotróficas utilizando varios residuos industriales. En este capítulo también se demuestra la viabilidad de un cultivo con residuos de lías oxidadas de la industria vinícola, que resultaron ser la mejor fuente de carbono entre todas las testadas. El estudio se ha realizado en un reactor de 2 L en modo discontinuo, con concentraciones optimizadas de nutrientes, donde se obtiene una alta productividad de biomasa (11,0 g L⁻¹) y lípidos neutros (38% DW).

En el **Capítulo 4** se estudia el efecto de metales pesados, como el cobre y el cadmio, y metaloides, como el arsénico en sus estados de oxidación III y V, sobre el crecimiento, la asimilación de nitrógeno y la capacidad de acumulación intracelular en *Chlorella sorokiniana*, siendo el cadmio el elemento acumulado en mayor cantidad. También se ha estudiado el efecto de los metales pesados sobre los niveles de expresión génica y de actividad enzimática de varias enzimas antioxidantes, tales como la ascorbato peroxidasa y la catalasa; y de enzimas de la ruta de asimilación del nitrógeno y el azufre, observándose que en general la mayor parte de estas enzimas se inducen en presencia del metal. Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio proteómico cuantitativo que compara la expresión de diferentes proteínas de *Chlorella sorokiniana* en presencia y ausencia de cadmio. Este estudio muestra que diversas rutas metabólicas, como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la glucólisis, el ciclo de Krebs o la biosíntesis de proteínas ribosomales se encuentran inhibidas en presencia de cadmio. Sin embargo, otras como la fotorrespiración, las enzimas antioxidantes, la gluconeogénesis, la asimilación de nitrógeno y azufre o la biosíntesis de ciertos aminoácidos, se encuentran inducidas en las mismas condiciones.

En el **Capítulo 5** se describe la optimización de la transformación nuclear de *Chlorella sorokiniana* mediante electroporación, utilizando diferentes promotores heterólogos como el promotor *CaMV 35S* del virus del mosaico de la coliflor, el promotor *NOS* de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* y el promotor híbrido *HSP70S/RBCS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*, que dirigen la expresión del gen selectivo *APHVIII* de resistencia al antibiótico paromomicina. Para ello se han optimizado los parámetros de la electroporación, a 2,5 kV de intensidad de campo eléctrico y 3 el número de pulsos. De entre los tres promotores utilizados, el que mayor eficiencia obtuvo en número de transformantes y mejor expresión en *Chlorella sorokiniana*, tanto a nivel génico como de proteínas, fue el promotor *CaMV 35S*. Además, se ha desarrollado un método de criopreservación a -80 °C, utilizando etilenglicol al 5% v/v como criopreservante, capaz de mantener la viabilidad celular de los transformantes obtenidos durante periodos de 365 días.

Por otra parte, el en **Capítulo 6** se compara el perfil aminoácido de 57 microalgas pertenecientes a 8 *phyla* y 38 *genera*, entre las que se incluye *Chlorella sorokiniana*. En el estudio se incluyen tanto los aminoácidos estructurales como los aminoácidos libres. Se han determinado 17 aminoácidos mediante GC-MS, siendo mayoritarios, de manera general, glutamato/glutamina, aspartato/asparagina, alanina, leucina y lisina. Por otro lado, el *phylum* *miozoa* y las microalgas *Ochromonas sp.* y *Chroomonas salina* presentaron mayor contenido en aminoácidos esenciales y, por tanto, mayor valor nutricional. Además, se ha conseguido establecer una relación entre el perfil de aminoácidos libres y el grupo taxonómico al que pertenecen la mayoría de las especies.

Abstract

The term microalga is comprised of a heterogeneous group of unicellular microorganisms that perform oxygenic photosynthesis with high capacity to fix CO₂ and produce O₂, their efficiency being between 10 and 50 times greater than higher plants. In recent years, microalgae have awakened interest as potential CO₂ fixer organisms and producers of biofuel with a low carbon footprint. Furthermore, the uses of microalgal biomass is increasing in order to obtain high value compounds for cosmetics, pharmaceutical and human or animal nutritional industries. Moreover, some microalgae can use industrial wastewaters as nutrients or tolerate high concentrations of contaminants, such as heavy metals, subsequently creating the potential to be bioremediation systems. These applications are discussed in detail within the introductory chapter (**Chapter 1**). This thesis also incorporates a chapter where methodology is described (**Chapter 2**), and a further four chapters which describes the results obtained using the chlorophyte microalga *Chlorella sorokiniana*, whose class is *Trebouxiophyceae*. This microalga not only has a high growth rate, but also is a robust species able to grow under adverse conditions. The studies deepen in the biotechnological and environmental applications of this microalga, including its cultivation with industrial wastewaters (**Chapter 3**) and heavy metals (**Chapter 4**). Additionally, the optimization of a genetic modification method through electroporation (**Chapter 5**), and a comparative between *Chlorella sorokiniana* and other 57 microalgae relating to amino acids profile and nutritional value (**Chapter 6**) has been performed.

The research described in **Chapter 3** shows that the microalga *Chlorella sorokiniana* can grow in mixotrophic cultures using different industrial wastes. In this chapter, a fed-batch 2 L bioreactor using wine waste lees, and the optimal concentration of nutrients previously selected, was developed, and used to get a high productivity in biomass (11.0 g L⁻¹) and neutral lipids (38% DW) terms.

In **Chapter 4** the effect that heavy metals, such as copper and cadmium, or metalloids, such as arsenic (III and V), produced in *Chlorella sorokiniana* was evaluated. The parameters studied were growth, nitrogen assimilation and intracellular accumulation that *Chlorella sorokiniana* has relating to these heavy metals and metalloids, being the microalga a high cadmium accumulator. Moreover, the effect that these heavy metals produce in gene expression and enzymatic activity levels in different antioxidant enzymes, such as ascorbate peroxidase and catalase, or enzymes involved nitrogen and sulphur assimilation, have been tested, showing a general upregulation for most of these enzymes. Finally, a quantitative proteomic approach that compares the expression of *Chlorella sorokiniana* proteins with or without cadmium in the culture media was performed. The results enable us to conclude that different metabolic pathways, such as photosynthesis, oxidative phosphorylation, glycolysis, TCA cycle or ribosomal proteins biosynthesis are downregulated with cadmium in the culture medium. However, other pathways, such as photorespiration, antioxidant enzymes, gluconeogenesis, nitrogen and sulphur assimilation or biosynthesis of some amino acids are upregulated under the same conditions.

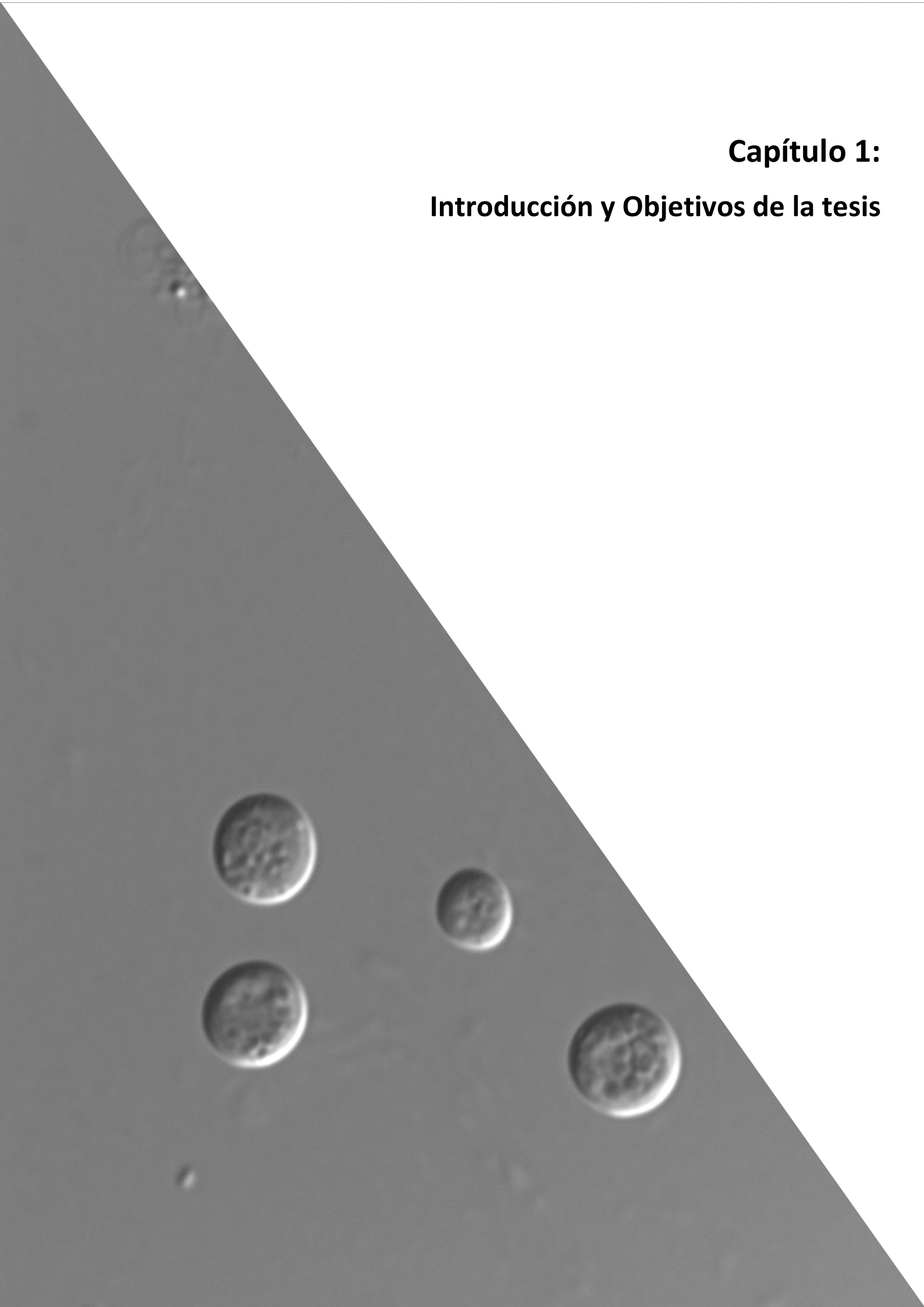
In **Chapter 5** the optimization of an electroporation method for nuclear transformation in the microalga *Chlorella sorokiniana* is described. For this method, different heterologous promoters, such as the *CaMV 35S* promoter of cauliflower mosaic virus, the nopaline synthase promoter, *NOS*, from *Agrobacterium tumefaciens*, and the hybrid promoter *HSP70S/RBCS2* from *Chlamydomonas reinhardtii* were tested. These promoters direct the expression of the resistance paromomycin gene *APHVIII*. The most suitable electroporation parameters were 2.5 kV of electric field strength and 3 electric pulses. The most efficient promoter for *Chlorella*

sorokiniana is the *CaMV 35S* promoter, showing higher number of transformants and higher gene and protein expression. Additionally, a cryopreservation method, at -80 °C, using ethylene glycol 5% v/v as cryopreservant and able to guarantee cell viability of transformants over 365 days, was developed.

Finally, in **Chapter 6**, the aminoacidic profile of 57 microalgae belonging to 8 *phyla* and 38 *genera*, including *Chlorella sorokiniana*, is compared. This study includes structural and free amino acids. 17 amino acids were determined by GC-MS, being the most common in almost all the species glutamate/glutamine, aspartate/asparagine, alanine, leucine and lysine. Moreover, *miozoa*, as *phylum*, and *Ochromonas sp.* and *Chroomonas salina*, as species, showed higher essential amino acids content and, consequently, the highest nutritional value. Furthermore, a dependence between free amino acids profile and taxonomic groups was established for most of the microalgae.

Capítulo 1:

Introducción y Objetivos de la tesis



1.1. Las microalgas

1.1.1. Características generales

El término microalga engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos unicelulares que realizan la fotosíntesis oxigénica, donde se incluyen, por un lado, organismos procariontes como las denominadas algas verde-azuladas o cianobacterias y, por otro lado, organismos eucariotes, como son los *phyla* de microalgas *chlorophyta*, *rodophyta*, *haptophyta* o *cryptophyta*, entre otros.

Las microalgas pueden ocupar una gran diversidad de hábitats, encontrándose en la mayoría de los ecosistemas acuáticos, tanto marinos como de agua dulce, aunque algunas especies han conseguido adaptarse y sobrevivir en medios terrestres (Barcité et al. 2019). Otras especies de microalgas pueden incluso desarrollarse en condiciones extremas, como pueden ser altas o bajas temperaturas, alta salinidad, o altas concentraciones de contaminantes abióticos (García-Balboa et al. 2013; Hopes y Mock, 2015).

Las microalgas, al igual que las plantas, poseen la capacidad de transformar energía solar en energía química a través de la fotosíntesis, siendo unos de los principales fijadores de CO₂, tanto atmosférico como disuelto en el agua. De hecho, se estima que realizan una captación de CO₂ superior a la de todas las selvas tropicales combinadas (Fajardo et al. 2019). Esta característica convierte a las microalgas en un elemento clave en la lucha contra el cambio climático y el efecto invernadero producido por la acumulación de CO₂ atmosférico, puesto que son capaces de fijarlo y producir O₂ con una eficiencia entre 10 y 50 veces mayor que las plantas superiores (Khan et al. 2009). Por todo esto, en los últimos años el desarrollo de factorías de microalgas capaces de captar grandes cantidades de CO₂ ha experimentado un gran avance.

También ha crecido el interés por el aprovechamiento de la biomasa de microalgas para la obtención de compuestos de alto valor añadido, así como para el tratamiento de aguas residuales. Se ha demostrado que las microalgas son capaces de eliminar metales pesados, antibióticos o pesticidas, entre otros compuestos tóxicos para el medio ambiente (Nagaranjan et al. 2020). Además, algunos residuos agroindustriales o contaminantes pueden ser utilizados como nutrientes.

Todo esto hace que se estén desarrollando mecanismos de biorremediación utilizando microalgas, ya que su alta tasa de crecimiento y su gran capacidad para acumular estos compuestos tóxicos para el medio ambiente, las hacen muy prometedoras a medio y largo plazo. Además, la integración de los procesos de tratamiento de residuos con los procesos de producción de compuestos de interés aplicado permite disminuir los costes de producción, favoreciendo una industria basada en la economía circular (Molazadeh et al. 2019; Singh y Dhar, 2019).

Las microalgas son capaces de producir una amplia gama de compuestos de alto valor añadido que pueden ser utilizados en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria (tanto humana como de animales), así como productos básicos como biocombustibles. Algunos ejemplos de estos compuestos son los ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, carbohidratos, lípidos neutros, proteínas o vitaminas; así como metabolitos secundarios tales como terpenos, polifenoles, o sustancias antimicrobianas, antiinflamatorias y antitumorales, entre otras (Henley, 2019, Ishiguro et al. 2020). No obstante, aún es necesario aumentar nuestro conocimiento sobre las rutas metabólicas de síntesis de muchos de estos compuestos y de su regulación, y conseguir abaratar los costes de producción de microalgas, proceso que, a día de hoy, continúa siendo uno de los factores limitantes para su desarrollo a escala industrial.

1.2. Principales factores de crecimiento

Para el óptimo crecimiento de las microalgas se han de fijar diferentes parámetros operacionales, tales como intensidad de luz, concentración de nutrientes, sistema de agitación, temperatura o pH del cultivo. Cabe destacar que el valor óptimo para cada uno de estos parámetros es muy variable en función del organismo y del objetivo que se quiera conseguir con su cultivo.

1.2.1. Luz

La disponibilidad de luz es el principal factor para el crecimiento de organismos fotosintéticos y suele ser una de las principales limitaciones para su cultivo a gran escala y la obtención de bioproductos (Wang, SK et al. 2014).

La luz es imprescindible para la realización de la fotosíntesis. Mediante este proceso, las clorofilas y los pigmentos auxiliares de los complejos antena de las microalgas captan la luz solar, lo que permite realizar la fotólisis del agua generando O_2 , y electrones que pasan a la cadena de transporte electrónico cloroplástica (Figura 1.1A) para obtener poder reductor (NADPH) y energía (ATP), necesarios para la producción posterior de compuestos orgánicos (glucosa) a partir de CO_2 , mediante el ciclo de Calvin (Figura 1.1B). Por otra parte, cuando existe una baja concentración atmosférica de CO_2 , se produce un proceso denominado fotorrespiración (Figura 1.1B; Kliphuis et al. 2011). En este proceso la enzima RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa) se une a una molécula de O_2 , consumiendo energía y poder reductor, y liberando CO_2 y amonio, lo que provoca una notable disminución del rendimiento de la fotosíntesis (Heureux et al 2017).

En función de la disponibilidad de luz, los cultivos de microalgas se pueden clasificar en fotoautotróficos, heterotróficos o mixotróficos. Por un lado, los cultivos fotoautotróficos son los que reciben luz y un gaseo constante de CO_2 , minimizando la fotorrespiración e incrementando el rendimiento fotosintético. Por otro lado, los cultivos heterotróficos son los que se cultivan en oscuridad, lo que imposibilita la realización de la fotosíntesis. En este caso es necesario el suministro de una fuente de carbono orgánica al medio de cultivo. Por último, el cultivo mixotrófico, combina la aplicación de luz, con la presencia de una fuente de carbono orgánica. La elección del modo de cultivo dependerá principalmente de la especie de microalga, del producto que se desee obtener, o bien del producto que se desea consumir, cuando se trate de una fuente alternativa de carbono procedente de aguas residuales (da Silva y Fonseca, 2018; Li, H et al. 2020).

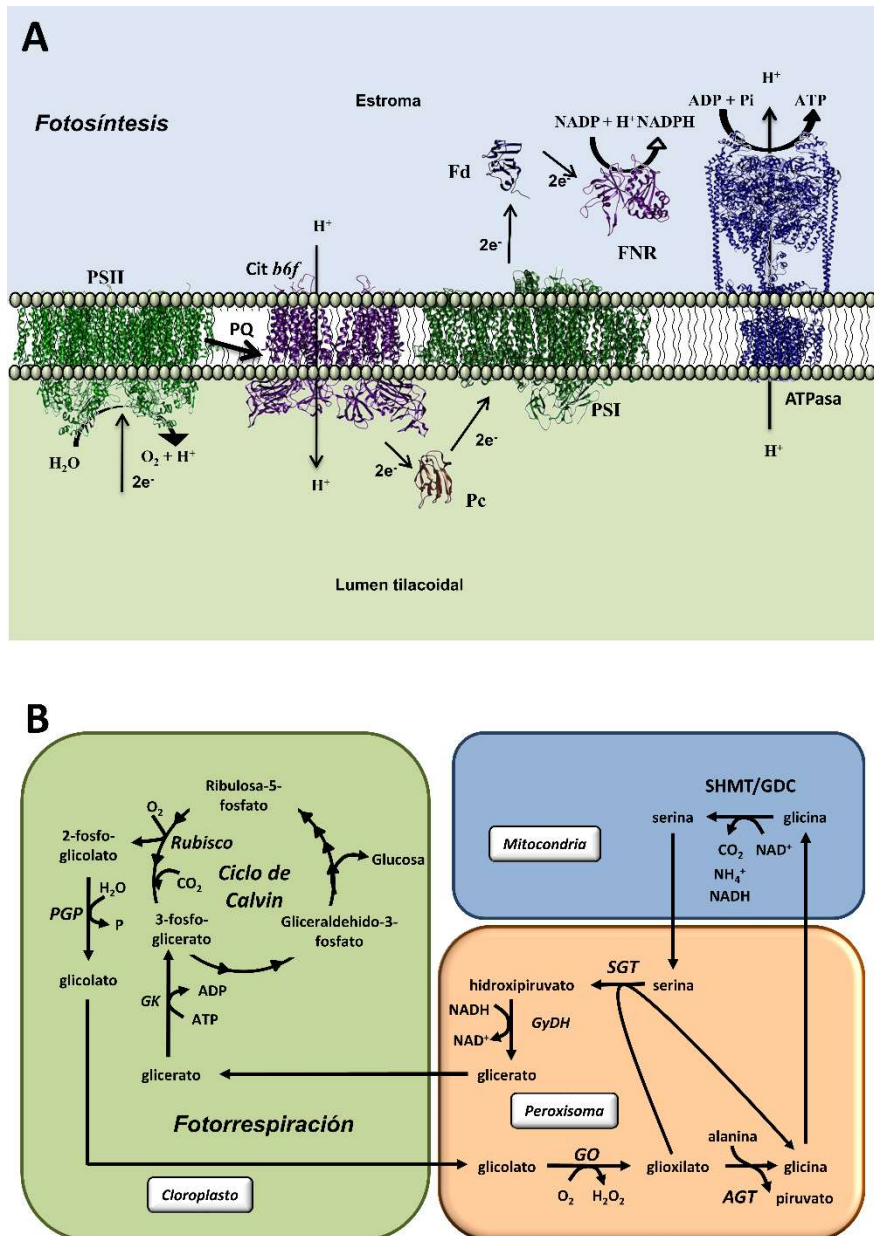


Figura 1.1. Esquema de la fotosíntesis (Figura 1.1A) y la fotorrespiración (Figura 1.1B) en microalgas. Los códigos utilizados del Protein Data Bank (PDB) en la fotosíntesis son: 1W5C para el fotosistema II (PSII), 1Q90 para el citocromo b6f (Cit b6f), 6JO5 para el fotosistema I (PSI), 2PLT para la plastocianina (Pc), 4ITK para la ferredoxina (Fd), 3VO1 para la ferredoxina-NADP reductasa (FNR) y 5Y5Z para la ATPasa. Las abreviaturas utilizadas en la fotorrespiración son: ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), fosfoglicerato fosfatasa (PGP), glicolato oxidasa (GO), alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT), serina hidroximetiltransferasa (SHMT), glicina descarboxilasa (GDC), serina-glioxilato aminotransferasa (SGT), glicerato deshidrogenasa (GyDH), and glicerato quinasa (GK).

Sin embargo, la luz es uno de los parámetros más difíciles de controlar, especialmente en los cultivos de alta densidad celular (Cuaresma et al. 2009). Mientras otros parámetros operacionales del cultivo pueden controlarse extrínsecamente, la luz solo puede ser controlada a través de su intensidad y del diseño del reactor de cultivo. En cultivos de alta concentración de células el efecto de apantallamiento de unas células respecto a otras hace que la luz que llega a pocos centímetros de la superficie del reactor sea muy baja. Ante esto la solución de aumentar la intensidad no es válida, ya que intensidades locales de luz muy altas pueden llegar a provocar

fotoinhibición (Gris et al. 2013). Esto puede ser parcialmente compensado mediante un método de agitación eficiente, aunque una agitación muy alta genera altos costes, y puede causar la inhibición del crecimiento celular (Sobczuk et al. 2005). Por todo esto, el cultivo mixotrófico puede paliar parcialmente este problema, ya que permite que el crecimiento del cultivo sea menos dependiente de la cantidad de luz irradiada.

1.2.2 Temperatura y pH

Los valores óptimos de estos dos parámetros, al igual que ocurre con la intensidad de la luz, tienen una gran variabilidad entre taxones y especies de microalgas. En general, el rango óptimo de pH está entre 7 y 9; mientras que el rango óptimo de temperatura varía entre 20 y 25°C. Sin embargo, existen microalgas capaces de tolerar ambientes más extremos. Ejemplos de esto pueden ser la microalga acidófila *Coccomyxa onubensis*, capaz de vivir a pH 2,5 (Romero-Cruz, 2017); y microalgas capaces de sobrevivir a pH de 12-13, como la cianobacteria *Leptolyngbya sp.* (Kim et al. 2015). Aunque, en general, la mayor parte de las microalgas tienen un pH óptimo en los rangos previamente mencionados, debido a que a pH próximo a la neutralidad existe una mayor disponibilidad de nutrientes, lo que posibilita un menor gasto de energía en asimilarlos y, como consecuencia, un desarrollo celular más rápido.

Por otro lado, con respecto a la temperatura, existen especies denominadas mesofílicas, cuya temperatura óptima de crecimiento está entre 35 y 50°C; o termofílicas, cuya temperatura óptima está por encima de 50°C. Este tipo de organismos posee un gran potencial biotecnológico debido a que su gran resistencia a altas temperaturas hace que posean enzimas termostables, que pueden ser utilizadas en procesos industriales sin desnaturalizarse, minimizando así los costes (Kohli et al. 2020). A parte de esta característica, la temperatura posee una alta influencia en la regulación de las rutas metabólicas, pudiendo inducir la producción de ciertos compuestos. Así ocurre en la ruta de síntesis de lípidos, donde las variaciones térmicas pueden inducir a la acumulación de ácidos grasos saturados a altas temperaturas, o a la producción de ácidos grasos insaturados a temperaturas bajas (Alishah Aratboni et al. 2019). Cabe destacar que las microalgas termofílicas, además, suelen tener bastante robustez en otros ambientes, por lo que también pueden aguantar pH extremos, alta salinidad o presencia de metales pesados o residuos, entre otras condiciones adversas para su crecimiento (Patel et al. 2019).

1.2.3 Macronutrientes

Los macronutrientes son los componentes elementales mayoritarios de los organismos, son principalmente carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. La importancia de estos bioelementos en microalgas es la siguiente:

- Carbono: se trata del elemento principal de la vida que se encuentra en todas las biomoléculas, supone casi el 50% de la biomasa total de las microalgas (Romero-Cruz, 2017), y su asimilación se produce principalmente mediante la fotosíntesis. Cuando este proceso no puede llevarse a cabo, las microalgas obtienen la energía de compuestos orgánicos de reserva almacenados en su estructura celular, principalmente carbohidratos. En los cultivos mixotróficos, la fuente de carbono presente en el medio de cultivo puede ser utilizada y metabolizada por las microalgas mediante rutas metabólicas alternativas. Estas fuentes son asimiladas y transferidas a rutas metabólicas como la glucólisis, en el caso de los azúcares y el glicerol; o convertidas en acetil CoA mediante la enzima Acetil CoA sintasa (ACS), en el caso del acetato (Rengel et al. 2018).

- **Nitrógeno:** el nitrógeno es el elemento principal para la síntesis de aminoácidos y proteínas, además de encontrarse también en los ácidos nucleicos, y supone entre el 5 y el 10% del peso seco de las microalgas (Vega, 2019). La mayoría de las microalgas pueden asimilar y metabolizar el nitrógeno en forma de nitrato, nitrito, amonio e incluso urea, siendo el amonio la fuente preferida (Vega, 2019). Se ha descrito la existencia de diferentes sistemas de transporte específicos para las especies nitrogenadas, como son las familias de transportadores del tipo NRT1, NRT2 (*nitrate transporter*) para el nitrato, o del tipo AMT1 y AMT2 (*ammonium transporter*) para el amonio (González-Ballester et al. 2004; Sanz-Luque et al. 2015). Una vez en el citosol (Figura 1.2), gracias a la acción de la enzima nitrato reductasa (NR), el nitrato se reduce a nitrito, que es transportado al interior del cloroplasto, donde se reduce a amonio mediante la acción de la enzima nitrito reductasa (NiR). A continuación, el amonio es incorporado al esqueleto del 2-oxoglutarato para, a través del ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT), producir glutamato (Vega, 2019). Alternativamente a esta ruta, y en condiciones fisiológicas específicas, el amonio puede incorporarse al 2-oxoglutarato mediante la reacción catalizada por la enzima NAD(P) glutamato deshidrogenasa (GDH). Esta enzima suele estar inducida como respuesta a diferentes tipos de estrés, y juega un papel importante en la tolerancia y asimilación del amonio cuando hay deficiencia de luz (Fontaine et al. 2012; Xian et al. 2020). Por otra parte, la eliminación de nitrógeno del medio de cultivo puede inducir la acumulación de compuestos de alto valor añadido en microalgas, tales como carotenoides o lípidos (Couso et al. 2012; Ruiz-Domínguez et al. 2015), mostrando así la importancia de este elemento desde el punto de vista biotecnológico.

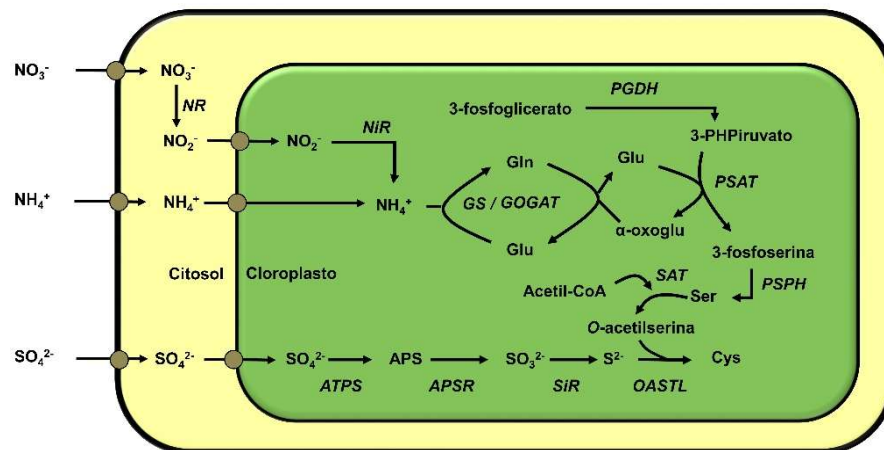


Figura 1.2. Metabolismo de asimilación del N y S. Las proteínas representadas son: nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NiR), glutamina sintetasa (GS), glutamato sintasa (GOGAT), fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH), fosfofosserina transaminasa (PSAT), y fosfofosserina fosfatasa (PSPH) en el metabolismo del N; así como ATP-sulfurilasa (ATPS), adenosina-fosfosulfato reductasa (APSR), sulfito reductasa (SiR), O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL) y serina acetiltransferasa (SAT) en el metabolismo del S.

- **Azufre:** el azufre es un elemento esencial para la síntesis de aminoácidos como la metionina o la cisteína, de ciertos cofactores celulares y en la síntesis de metabolitos primarios y secundarios, tales como glutatión o glucosinolatos. Representa el 0,5% del total de peso seco de la microalga (Vega, 2019). La asimilación de este elemento (Figura

1.2) se produce principalmente en forma de sulfato, que es incorporado mediante transportadores tipo ABC y permeasas dependientes de ATP y, tras este proceso, las microalgas suelen acumularlo en los cloroplastos (Chen y Melis, 2004). A continuación, el sulfato es activado en forma de adenosina fosfosulfato (APS) por la acción de la ATP sulfurilasa y, posteriormente, es reducido a sulfito y a sulfuro por la acción consecutiva de las enzimas APS reductasa y sulfito reductasa. Finalmente, el complejo O-acetilserina (tiol)-liasa incorpora el sulfuro a la O-acetil-L-serina para producir L-cisteína, siendo este aminoácido el precursor del resto de los compuestos azufrados de las células (Vega, 2019).

- Fósforo: el fósforo es el elemento principal para la síntesis de los ácidos nucleicos y de los nucleótidos trifosfato, además de estar presente en algunos lípidos de las membranas celulares y otros metabolitos fosfatados. El fósforo es introducido en las microalgas en forma de fosfato inorgánico (Pi), a través de transportadores de fosfato inorgánico (PiT). Tras su entrada en la célula, es metabolizado principalmente hacia la producción de ATP (Lin et al. 2016). Sin embargo, las microalgas también pueden almacenar el exceso de fósforo intracelular mediante la formación de polifosfatos, que serán utilizados en momentos de limitación de este elemento (Vega, 2019).

1.2.4 Micronutrientes y elementos traza

Además de los macronutrientes, las microalgas necesitan de otros elementos para su crecimiento. Entre ellos destacan diferentes iones metálicos, que actúan principalmente en el metabolismo enzimático (como cofactores metálicos) o como elementos reguladores en diferentes procesos metabólicos.

Algunos de los micronutrientes o elementos traza más importantes son: el magnesio, que forma parte del anillo de porfirina de las clorofilas, y actúa (al igual que el potasio) como cofactor enzimático en procesos en los que interviene ATP; y el calcio, el sodio o el potasio de cuya homeostasis dependen muchos procesos metabólicos y de transporte a través de membrana; así como metales de transición como el hierro, el cobre, el zinc, el cobalto, el manganeso o el molibdeno, que forman parte de la estructura de muchas metaloproteínas y actúan como cofactores de muchas enzimas (Pires, 2015).

1.3. Estrés oxidativo

El déficit nutricional, así como las alteraciones abióticas en el medio, tales como cambios de temperatura, pH, o la presencia de metales pesados, pueden provocar estrés oxidativo, generando alteraciones metabólicas que puedan inhibir la capacidad de crecimiento de las microalgas. El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre especies pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, que puede ser de origen ambiental, como se ha indicado anteriormente, o bioquímico, derivado de la propia acción del metabolismo celular (Mano, 2002). Estas especies pro-oxidantes, son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), entre las que destacan el O_2^- y el H_2O_2 . Las ROS son formas parcialmente reducidas de oxígeno, y su formación es un proceso constante en organismos con un metabolismo energético basado en reacciones de oxidación-reducción (Mano, 2002). Aunque las ROS pueden también jugar un papel fisiológico en diferentes procesos, tales como

el crecimiento y el ciclo celular o la muerte celular programada, cuando se producen situaciones ambientales anormales, éstas se generan en mayor cantidad y pueden dar lugar a reacciones indeseadas, provocando diversos daños metabólicos al afectar a proteínas, ácidos grasos y ADN, o en procesos fisiológicos celulares (Apel y Hirt, 2004; Baxter et al. 2013). Frente a esto, los organismos han desarrollado sistemas antioxidantes capaces de eliminar el exceso de ROS; que pueden ser no enzimáticos, entre los que destacan moléculas como los carotenoides, el glutatión, el ácido ascórbico o la vitamina E; o enzimáticos, entre los que podemos citar enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) o la ascorbato peroxidasa (APX); (Figura 1.3). En muchos casos, ambos tipos de sistemas pueden actuar de manera conjunta con el fin de lograr una eliminación más eficiente de las ROS (Gill y Tuteja, 2010), siendo uno de los mecanismos enzimáticos antioxidantes más eficiente es el ciclo del ascorbato glutatión (Figura 1.3d).

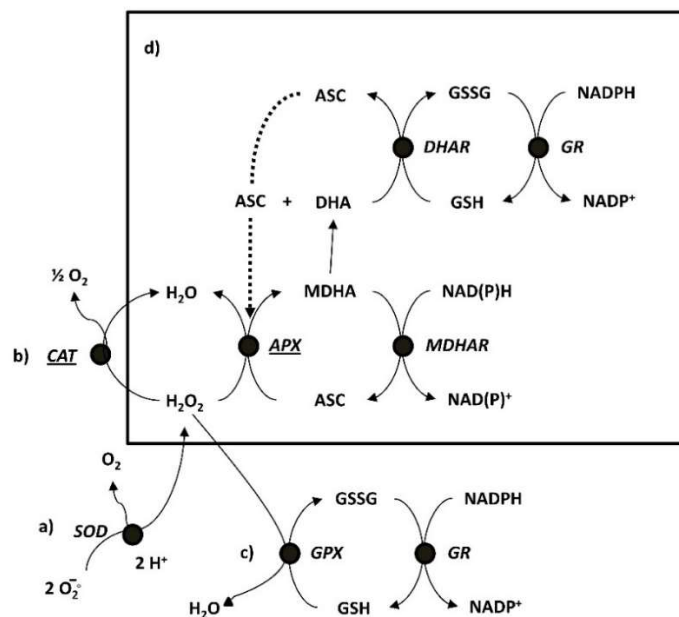


Figura 1.3. Sistemas enzimáticos antioxidantes. El anión O_2^- formado puede ser dismutado a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (a). El H_2O_2 es eliminado por la catalasa (CAT) (b); en presencia de glutatión reducido (GSH) por la glutatión peroxidasa (GPX) (c); o por el ciclo ascorbato-glutatión mediante la ascorbato peroxidasa (APX) (d). En los dos últimos casos el GSH se genera a partir del glutatión oxidado (GSSG) vía glutatión reductasa (GR). En el último caso el ascorbato (ASC) se genera vía monodehidroascorbato reductasa (MDHAR).

El glutatión (GSH) es un tripéptido tiólico, formado por glutamato, cisteína y glicina, que juega un papel fundamental en la eliminación de radicales libres y ROS (Chen et al. 2010) y, además, en los casos de estrés metálico, el GSH actúa como agente quelante, ya que es el precursor de las fitoquelatinas (PCs) (Cobbet, 2000). Las PCs son polipéptidos de estructura $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde $n=2-11$, las cuales, debido a la presencia de los grupos tiólicos de la cisteína, son capaces de quelar Cd y otros metales pesados formando complejos que son transportados hasta las vacuolas como proceso de detoxificación celular (Cobbet, 2000).

1.4. Microalgas y sus aplicaciones biotecnológicas y medioambientales

Las microalgas poseen un gran valor biotecnológico. Hoy en día más de 5000 toneladas de masa seca de microalgas son producidas y comercializadas en todo el mundo con un valor medio de

mercado que supera los 1,25 billones de euros (Wijffels y Barbosa, 2010), siendo los suplementos alimenticios y nutracéuticos, como carotenoides, vitaminas o ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) los principales productos obtenidos a partir de ellas (Alhazzaa et al. 2018). Además, se están comercializando también compuestos de alto valor añadido obtenidos a partir de microalgas para su uso en la industria cosmética o farmacéutica, y se estudia el uso de algunas cepas microalgales como un sistema alternativo para la expresión de proteínas heterólogas, incluyendo anticuerpos y otras proteínas terapéuticas (Fajardo et al. 2019). Por otra parte, las microalgas tienen gran importancia en acuicultura para la alimentación de moluscos bivalvos y rotíferos y, en los últimos años, se ha empezado a implantar su uso como suplemento en dietas para peces (Stabili et al. 2019). Otra aplicación importante de las microalgas es su utilización para depurar aguas residuales procedentes de actividades industriales, agrícolas o urbanas (Nirmalakhandan et al. 2019; Li, H et al. 2020). Dentro de todas estas aplicaciones, destacan las que están ligadas al medioambiente y al fomento de la economía circular, como las que se indican a continuación.

1.4.1. Residuos industriales

El cultivo de microalgas en diferentes aguas residuales industriales, para su depuración y aprovechamiento de la biomasa, se está convirtiendo en los últimos años en una de las principales líneas de investigación en el campo de las microalgas. Aunque este método de depuración de aguas residuales comenzó a desarrollarse a finales de los años 80 (Chevalier y de la Noue, 1985; Gantar et al. 1991), ha sido en los últimos 10 años cuando el número de investigaciones en este campo se ha incrementado considerablemente, superando las 2500 publicaciones respecto a las no más de 300 de los 10 años previos (Pacheco et al. 2020). Este proceso se basa, principalmente, en la utilización como medio de cultivo para las microalgas de aguas residuales ricas en algún nutriente esencial, o que contengan trazas de micronutrientes. Las microalgas asimilan esos nutrientes durante su crecimiento, retirándolos del medio, para que posteriormente, tras realizar la separación del agua tratada, la biomasa de microalgas pueda ser utilizada para la obtención de otros compuestos de interés (Figura 1.4).

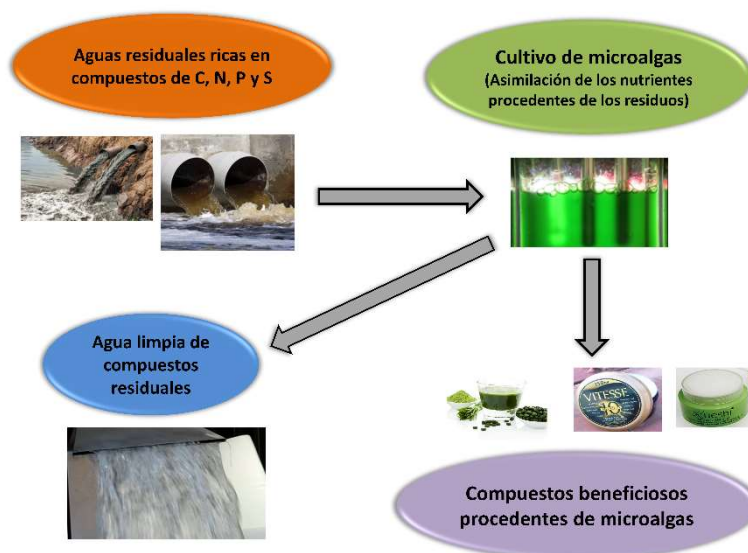


Figura 1.4. Proceso estándar de cultivo de microalgas en aguas residuales industriales.

El tratamiento de aguas residuales industriales mediante microalgas tiene una gran cantidad de ventajas. Una de las principales es el abaratamiento de los costes, tanto en la producción de

biomasa como en la depuración, ya que, por un lado, muchos de los nutrientes que requieren las microalgas para su crecimiento están presentes en este tipo de residuos, evitando el coste que llevaría suministrarlos al medio de cultivo; y, por otro lado, los costes y la energía necesarios para el método de depuración con microalgas son mucho menores que para uno tradicional (Roostaei y Zhang, 2017). Así, se ha demostrado que en España la energía requerida para un tratamiento convencional de aguas residuales es de 0,5 kWh/m³, mientras que, usando un método basado en microalgas, se necesita una energía de 0,2 kWh/m³ (Ación-Fernández et al. 2018). Finalmente, cabría destacar también que en este tipo de tratamientos se produce una alta reducción del aporte de CO₂, al combinar la fijación de este compuesto por parte de las microalgas con la ausencia de emisiones, que sí se producen en el proceso tradicional (Nagaranjan et al. 2020).

Los tipos de residuos se pueden clasificar en residuos procedentes de actividades económicas (industria, agricultura o ganadería) y residuos domésticos.

Los residuos procedentes de actividades económicas comprenden el grupo más heterogéneo, e incluyen desde pesticidas o abonos agrícolas, hasta residuos procedentes de diferentes actividades industriales tales como la industria textil, vinícola, farmacéutica o alimentaria, que afectan principalmente al ecosistema acuático (Lizzul et al. 2014; Xu et al. 2006). La composición de este tipo de residuos varía en función de su procedencia, así, mientras que los residuos agrícolas tienen mayores cantidades de nitrógeno, fósforo, cobre o azufre (presentes en abonos o pesticidas), los residuos de la industria alimentaria o vinícola poseen mayor concentración de azúcares o moléculas que pueden ser fuente de carbono asimilables por las microalgas. Shi y colaboradores (2007) cultivaron la microalga *Tetraselmis obliquus* en un medio con altas concentraciones de ácido acetilsalicílico con una tasa desaparición del compuesto superior al 90%. Otras especies muy utilizadas son algunas *Trebouxiophyceae*, como es el caso del género *Chlorella*, para retirar residuos procedentes de la producción de aceite de palma (Ding et al. 2020), o de la industria textil (Lim et al. 2010); o el género *Scenedesmus* para retirar nonilfenol procedente de la producción de detergentes (He et al. 2016), o carbamazepina de residuos de la industria farmacéutica (Xiong et al. 2016). La utilización de las *Trebouxiophyceae* y, especialmente, el género *Chlorella* de forma mayoritaria en el tratamiento de aguas residuales industriales, ha sido justificada debido a su pequeño tamaño y su gran ratio superficie/volumen, lo que le otorga una mayor facilidad para asimilar los nutrientes, así como para la producción de una sustancia llamada clorelina, que actúa como antibacteriana y es capaz de inhibir el crecimiento de otras microalgas presentes en el medio (Marchelo et al. 2015).

El otro tipo de residuos serían las aguas procedentes de residuos domésticos y de las plantas de tratamiento y depuración de núcleos urbanos. Este tipo de residuos es rico en macronutrientes como pueden ser carbono, nitrógeno o fósforo, ya que provienen mayoritariamente de la descomposición de restos orgánicos. Entre las microalgas cultivadas con este tipo de aguas residuales existe también una mayor preferencia sobre la clase *Trebouxiophyceae*, ya que diferentes líneas de investigación han concluido que este tipo de organismos son capaces de retirar por encima del 80% de los iones amonio, fosfato, nitrato u ortofosfato del medio (Lizzul et al. 2014; Yadav et al. 2019; Hossain et al. 2020).

Con todos estos datos se podría concluir que la utilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, es un proceso eficiente y potencialmente aplicable para aguas residuales de origen industrial, agrícola o doméstico. Sin embargo, su utilización habitual en las industrias y en las plantas de tratamiento de aguas presenta algunas limitaciones que deben ser solucionadas, como la duración del tratamiento, la validez del proceso en condiciones

ambientales adversas o la calidad del agua depurada (Acién et al. 2016). Para solventar este tipo de problemas, se están buscando microalgas aisladas de las propias aguas residuales o que sean cepas robustas capaces de tolerar condiciones ambientales muy adversas (Sydney et al. 2011). Por otra parte, se están buscando también modos de operación alternativos con menor dependencia de la disponibilidad de luz y de CO₂, como el cultivo mixotrófico. Diferentes estudios han demostrado que los cultivos mixotróficos ofrecen grandes ventajas con respecto a los cultivos fotoautotróficos o heterotróficos, tales como una menor dependencia de la luz, una mayor tasa de crecimiento y densidad celular, una mayor tolerancia a la fotoinhibición y al daño fotooxidativo de las células o una mayor productividad de lípidos debido a un mejor control de la ratio C/N (Rengel et al. 2018; Nirmalakhandan et al. 2019).

No obstante, la utilización de aguas residuales que puedan contener compuestos tóxicos imposibilita el posterior uso de la biomasa de microalgas, como componente alimentario o para su aplicación sobre seres vivos. Como consecuencia, las principales aplicaciones para las que se utiliza esta biomasa son la generación de energía mediante pirólisis (Vargas e Silva y Monteggia, 2015; Ferreira et al. 2020) y la producción de lípidos para la obtención de biocombustibles (Kumar et al. 2016; Cuevas Castillo et al. 2020). Los resultados obtenidos en este tipo de estudios indican que las microalgas y, en especial las microalgas clorofitas de la clase *Trebouxionophyceae*, pueden ser utilizadas de forma sinérgica como potenciales depuradores de residuos, y como productoras de diferentes compuestos de interés en procesos medioambientalmente sostenibles y económicamente viables.

1.4.2. Metales pesados

Además de residuos ricos en macronutrientes, las actividades agrícolas e industriales generan otra serie de residuos que son tóxicos para los organismos vivos, incluso a muy bajas concentraciones, como son los metales pesados. Los metales pesados se pueden definir como elementos con una densidad mayor de 5 g cm⁻³, entre los que se incluyen elementos trazas esenciales para las microalgas, como el cobre, el hierro, el manganeso, o el zinc; y elementos que no son necesarios para la supervivencia celular, como el cadmio, el plomo, el mercurio o el metaloide arsénico. Este tipo de elementos son liberados al medioambiente como consecuencia de diferentes actividades humanas, siendo muy dañinos para los ecosistemas acuáticos y para los organismos que lo componen, así como para la salud humana (Salama et al. 2019).

Las características que hacen que este tipo de contaminantes sean tan dañinos son su persistencia y su toxicidad a bajas concentraciones. Como no son biológicamente degradables, se quedan en el ecosistema hasta que son absorbidos por algún organismo, provocándole graves alteraciones. Tras una larga exposición a estos elementos, los organismos pueden sufrir un incremento de las concentraciones de ROS, que provocan modificaciones en el metabolismo celular, mutagénesis aleatoria del ADN o reacciones alérgicas, entre otras (Suresh Kumar et al. 2015). Debido a estos problemas, los metales pesados están considerados como uno de los elementos más tóxicos para el medio ambiente y la normativa de la EPA (*Environmental Protection Agency*) establece concentraciones muy bajas para los límites permitidos de estos elementos en agua. En su normativa de 2016, los límites de concentración máxima de As, Cd, Cr, Hg y Pb son 0,01; 0,005; 0,1; 0,002 y 0,015 mg L⁻¹, respectivamente (USEPA, 2016).

Por otra parte, la imposibilidad de metabolizar la mayor parte de los metales pesados hace que solo puedan ser bioacumulados y pasen a través de los distintos organismos de la cadena trófica (Figura 1.5), alcanzando a la población humana, lo que se convierte no solo en un problema medioambiental, sino también de salud pública. El peligro más grave en estos casos es que se

produzca la biomagnificación, es decir, la bioacumulación progresiva de un elemento tóxico a lo largo de los distintos niveles tróficos, llegando a alcanzar concentraciones muy altas en los organismos de los niveles superiores (Wang, 2002). Diferentes estudios muestran que el metilmercurio (MeHg), el Cd o el Pb son compuestos que se biomagnifican en las cadenas tróficas marinas, afectando principalmente a los consumidores terciarios (Ali y Khan, 2018). Por todo esto, es necesario profundizar más en estudios de bioacumulación de metales pesados en las microalgas, que forman parte del fitoplancton y se encuentran en la base de la cadena trófica acuática y marina.

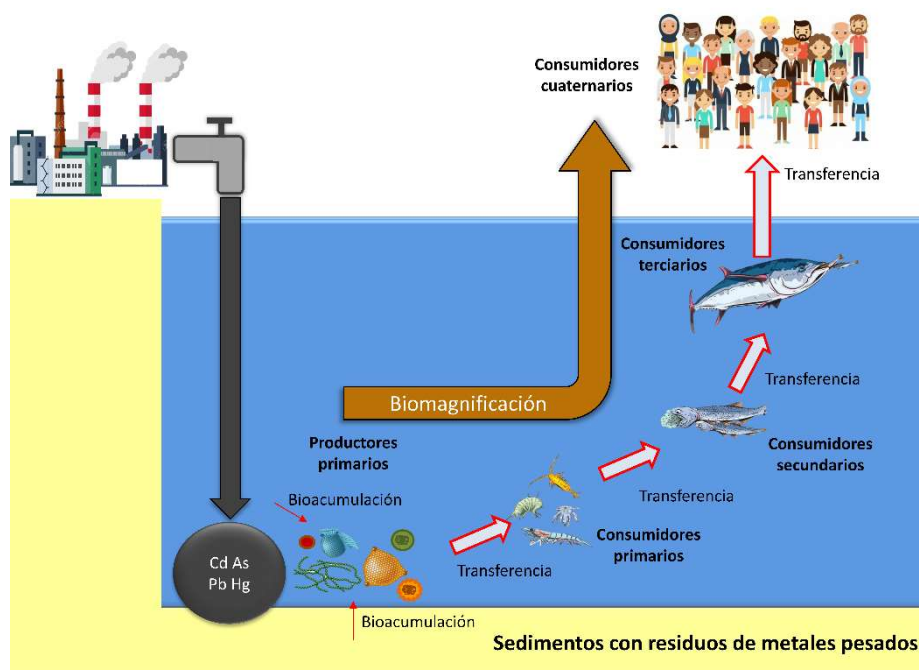


Figura 1.5. Transferencia de metales pesados a través de la cadena trófica.

Frente al aumento de la contaminación por metales pesados, se han desarrollado diferentes procesos de remediación. Tradicionalmente se han llevado a cabo procesos de precipitación química mediante hidróxidos, carbonatos o sulfidas, oxidación o reducción química, coagulación, intercambio iónico mediante resinas, adsorción, electrodeposición o electrodiálisis, entre otras. Sin embargo, estos procesos presentan grandes desventajas, como los altos costes de operación y mantenimiento o la contaminación que se produce derivada de los mismos, además, muestran una gran ineficacia a concentraciones bajas (inferiores a 100 mg L^{-1}) (Leong y Chan 2020).

Por esto, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas de remediación que cumplan los siguientes requisitos: ser eficientes a un amplio rango de pH y concentraciones del metal, no generar contaminantes de otro tipo en el proceso, no requerir grandes cantidades de energía y conseguir un alto grado de eliminación del metal del medio (Suresh Kumar et al. 2015). En este contexto, las técnicas de biorremediación aparecen como una prometedora alternativa. Los primeros estudios de biorremediación surgieron a comienzo de la década de 1990 utilizando diferentes tipos de bacterias (Blake et al. 1993; Gadd, 1993); sin embargo, el rango de organismos se ha ido ampliando y, actualmente, se han descrito procesos de biorremediación basados en bacterias, hongos, microalgas, o plantas.

De entre todos los organismos que pueden llevar a cabo procesos de biorremediación, las microalgas presentan prometedoras características. Su alta eficiencia fotosintética, su

estructura celular sencilla, su capacidad para vivir a temperaturas y pH extremos, altas concentraciones de sal o en limitación de nutrientes, además de su alta relación superficie-volumen o su alta velocidad de crecimiento, en comparación con la de plantas superiores, las colocan como uno de los organismos más adecuados para el tratamiento de zonas contaminadas por metales pesados. Además, las microalgas utilizadas en procesos de biorremediación de metales pesados han demostrado su viabilidad para ser utilizadas posteriormente para la producción de biocombustibles, debido al aumento del contenido en lípidos neutros que se ha observado en presencia de metales pesados (Abinandan et al. 2019).

Los dos procesos por los cuales las microalgas eliminan del medio metales pesados son: el proceso metabólico pasivo de la bioadsorción, y el proceso metabólico activo de la bioacumulación (Suresh Kumar et al. 2015) (Figura 1.6). La adsorción pasiva o bioadsorción es un proceso rápido donde los componentes de la pared celular de las microalgas se unen a los diferentes cationes de los metales pesados mediante interacciones iónicas, enlaces covalentes, o formación de complejos. Por otra parte, la bioacumulación es un proceso más lento que implica el transporte activo del metal hasta los diferentes orgánulos celulares, entre los que destacan principalmente las vacuolas, y que implica a moléculas del interior de la célula, como las PCs, las cuales se unen al metal y lo transportan hasta las vacuolas (Leong y Chan, 2020).

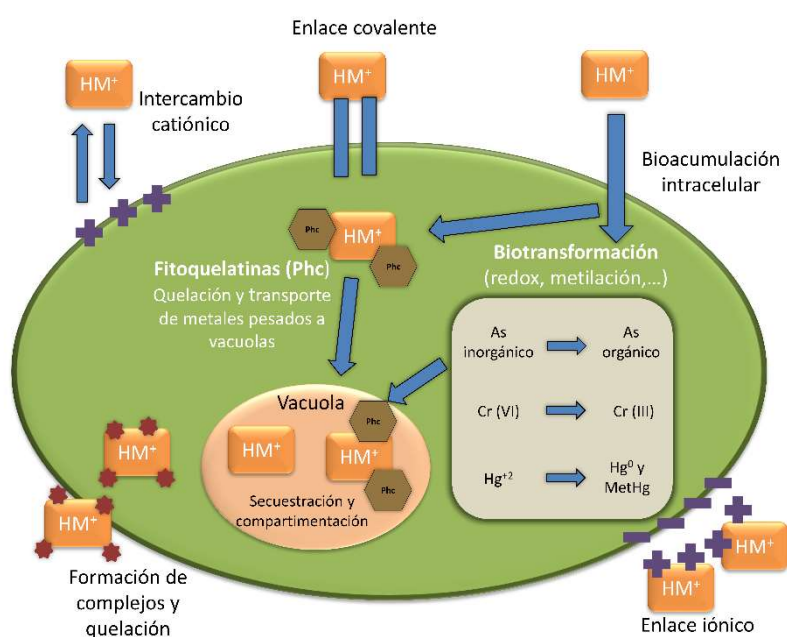


Figura 1.6. Mecanismos de bioadsorción y bioacumulación de metales pesados en su forma de catión (HM^+) en microalgas. Adaptado de Leong y Chang, 2020.

Estudios previos han demostrado que diferentes especies de *Chlorella* y *Spirulina* son capaces de eliminar grandes cantidades de Cu. Uno de los estudios más prometedores es el llevado a cabo por Doshi y colaboradores, utilizando *Spirulina spp.* (2007), que describen la acumulación de 389 mg Cu g^{-1} de biomasa. También se han llevado a cabo estudios de bioeliminación de Cd del medio de cultivo, utilizando *Chlorella minutissima* (Yang et al. 2015), obteniéndose concentraciones de cadmio intracelulares de 303 mg g^{-1} . Por otro lado, se han realizado bastantes estudios con Cr en sus diferentes estados de oxidación, aunque en estos casos el nivel de acumulación ha sido menor que con Cd o Cu (Leong y Chan, 2020). Un menor número de estudios se han llevado a cabo en el caso del As, sin embargo, parece prometedor el comportamiento de ciertas algas clorofitas, como es el caso de *Scenedesmus almeriensis*, que

es capaz de eliminar el 40% del arsénico total del medio de cultivo (Saavedra et al. 2018). A pesar de todo esto, aún es necesario profundizar en los mecanismos por los cuales algunas microalgas son capaces de tolerar mejor la presencia de metales pesados y de acumularlos en mayor proporción.

1.4.3. Acuicultura

Otra de las aplicaciones de las microalgas es su utilización en acuicultura. La acuicultura, que surgió en la década de los 70 y ha tenido un crecimiento exponencial desde entonces, ha demostrado ser una alternativa de la pesca extractiva, que proporciona productos de calidad uniforme y permite satisfacer la demanda de pescado de gran parte de la población, evitando la esquilma de los caladeros. En el año 2016, la producción total de peces en el mundo fue de 170 millones de ton, de los cuales 90,9 fueron de capturas y 80 se produjeron mediante la acuicultura, lo que quiere decir que la acuicultura proporciona actualmente casi el 50% del pescado que se consume en el mundo, frente al 15% que representaba en 1990 o al 25% que representaba en el año 2000 (Vigara y Vega, 2020). Esta demanda va en aumento debido al incremento de la población y, como consecuencia, se está produciendo un gran deterioro de los ecosistemas marinos.

Sin embargo, la acuicultura actual está lejos de ser una actividad sostenible (Martínez-Porchas y Martínez-Cordova, 2012). Algunos de los problemas medioambientales derivados de la acuicultura son: la destrucción de los ecosistemas, ya que se crean granjas acuícolas en ecosistemas marinos existentes introduciendo, en ciertas ocasiones, especies exóticas; su alto nivel de residuos, que termina por contaminar el agua; la acidificación y nitrificación de los ecosistemas debido a los residuos generados; o la alta mortalidad de los peces, lo que ocasiona el uso excesivo de antibióticos para evitar las enfermedades (Ticina et al. 2020). Otro problema proviene de las harinas de pescado o animales terrestres que se usan en acuicultura como fuente de proteínas. Por un lado, la demanda de estas harinas crece a un ritmo más alto que la oferta, por lo que es necesario buscar alternativas para su producción; por otro lado, este tipo de harinas y aceites también son caros, escasos y poco sostenibles. Frente a esto, la FAO ha dado como prioridad buscar fuentes de alimentación alternativas con alto contenidos en PUFAs (Alhazzaa et al. 2018).

Una de las soluciones propuestas para estos problemas es el uso de microalgas para la alimentación en acuicultura, ya que este tipo de microorganismos poseen innumerables ventajas, entre las que destaca la posibilidad de integrar su producción con los demás procesos de la explotación acuícola, según el modelo de la acuicultura multitrófica integrada (Figura 1.7). En este proceso, las microalgas son capaces de reutilizar la mayor parte de los residuos orgánicos que generan los peces, asimilándolos como fuente de nutrientes para su propio crecimiento. Entre estos residuos, la acumulación de amonio se ha descrito como causante principal de la elevada mortalidad de peces en acuicultura, debido a sus efectos sobre sistema nervioso (Randall y Tsui, 2002). Frente a esto, las microalgas pueden jugar un papel fundamental al asimilar altas cantidades de amonio, que utilizan como fuente de nitrógeno para la síntesis de sus aminoácidos y proteínas. Además, las microalgas son grandes fijadoras de CO₂ y productoras de O₂ lo que, por un lado, evita que haya acidificación del agua y, por otro lado, ayuda a su oxigenación (Figura 1.7). Finalmente, la biomasa de microalgas generada puede ser ingerida como complemento nutricional por los peces, cerrando el ciclo de la acuicultura multitrófica integrada (Stabilli et al. 2019).

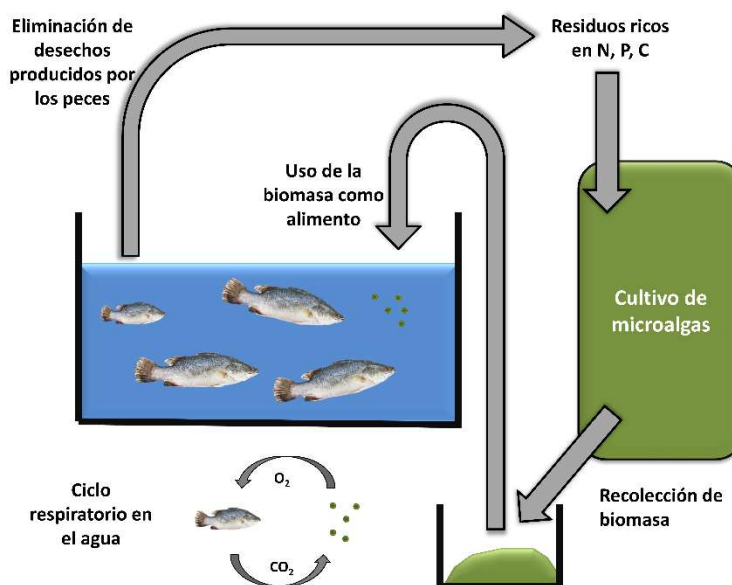


Figura 1.7. Esquema de la producción acuícola basada en la presencia de microalgas en el medio. Adaptado de Lu et al. 2019.

De entre todos los organismos fototróficos, las microalgas también han destacado como una fuente con un elevado valor proteico, siendo utilizadas desde hace décadas en alimentación, tanto humana como en piensos de animales. A pesar de esto, el número de microalgas utilizadas para estos fines es aún muy bajo, estando permitidas para el consumo humano tan solo varias especies de los géneros *Spirulina*, *Chlorella* o *Tetraselmis*. Además, el alto coste del cultivo de microalgas a gran escala, ha hecho que su producción se dirija principalmente hacia la producción de cosméticos, fármacos u otros productos de alto valor añadido (Chen et al 2016). Sin embargo, su uso en acuicultura para alimentación de peces ha empezado a potenciarse en los últimos años, ya que son fácilmente digeribles. Recientemente se ha descrito la capacidad de los peces para asimilar hasta el 80% del contenido proteico de las microalgas (Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2018). Asimismo, en acuicultura se utilizan actualmente harinas de origen animal que aportan proteínas de baja calidad (Shah, 2017), por lo que las microalgas, además, podrían mejorar este aspecto fundamental para la alimentación de los peces.

Sin embargo, se conoce muy poco sobre el contenido proteico de las microalgas y de su perfil aminoacídico. Los pocos estudios realizados con microalgas datan de los años 90 (Brown, 1991) y se centran en unas pocas especies, por lo que resulta complicado establecer si el perfil aminoacídico varía entre grupos taxonómicos, de forma similar al perfil lipídico y de carotenoides. En este punto, la literatura es bastante contradictoria ya que, mientras algunos artículos muestran que no existen diferencias significativas entre los grupos (Brown, 1991; Brown y Jeffrey, 1992), otros indican ciertas variaciones respecto a los grupos taxonómicos (Lourenço et al. 2004; Dawczynski et al. 2007). Además, hay que tener en cuenta que existen muchos factores que pueden alterar tanto el porcentaje proteico en las microalgas como su composición aminoacídica, tales como el momento del ciclo celular o la disponibilidad y el tipo de nutrientes suplementado.

Uno de los principales factores de importancia respecto al perfil aminoacídico en las microalgas y su utilización en acuicultura es la presencia de aminoácidos esenciales, que son aminoácidos que no pueden sintetizar los peces por sí mismos y, por lo tanto, necesitan tomarlos a través de los alimentos (Figura 1.8).

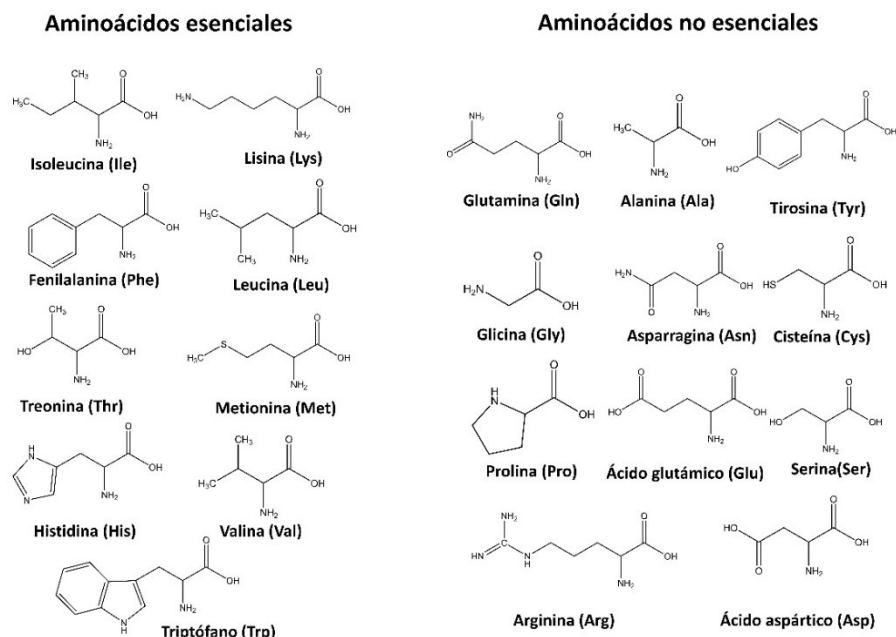


Figura 1.8. Clasificación de aminoácidos según sus necesidades nutricionales.

Otro parámetro importante y poco estudiado es el perfil de aminoácidos libres de las microalgas. Este tipo de aminoácidos, al no estar ligados a proteínas, son más fácilmente asimilables y podrían ser una excelente fuente de aminoácidos esenciales para la acuicultura. Sin embargo, en este caso existen aún menos estudios, y la mayor parte de ellos no utilizan más de cinco o seis especies diferentes de microalgas (Martin-Jézéquelet al. 1988; Derrien et al. 1998), por lo que no puede establecerse ninguna correlación entre las diferencias en el perfil de aminoácidos libres y el grupo taxonómico al que pertenecen las microalgas. Todo esto, hace que para valorar la calidad nutricional de diferentes tipos de microalgas y su uso en acuicultura, sea necesario realizar un estudio más profundo de su perfil aminoacídico, tanto a nivel estructural como de aminoácidos libres, basado en un gran número de microalgas y con una variabilidad taxonómica amplia.

1.5. Las microalgas dentro de la economía circular

La economía circular es un concepto novedoso que se basa en el desarrollo de mecanismos de producción que sean sostenibles y respetuosos con el medio ambiente. Este concepto se ha ido introduciendo de manera gradual en la sociedad y en el mundo científico, aumentando de forma exponencial el número de publicaciones que lo mencionan desde el año 2016. El modelo de economía circular surge frente al modelo actual de producción lineal, donde las materias primas son recolectadas de la naturaleza, utilizadas para producir diferentes compuestos que satisfagan las necesidades de la población y, posteriormente, desechadas como residuos. Contra este modelo, la economía circular potencia la reutilización, reparación, reciclaje y rediseño de los desechos para proporcionarles un nuevo uso (Geissdoerfer et al. 2017) (Figura 1.9).

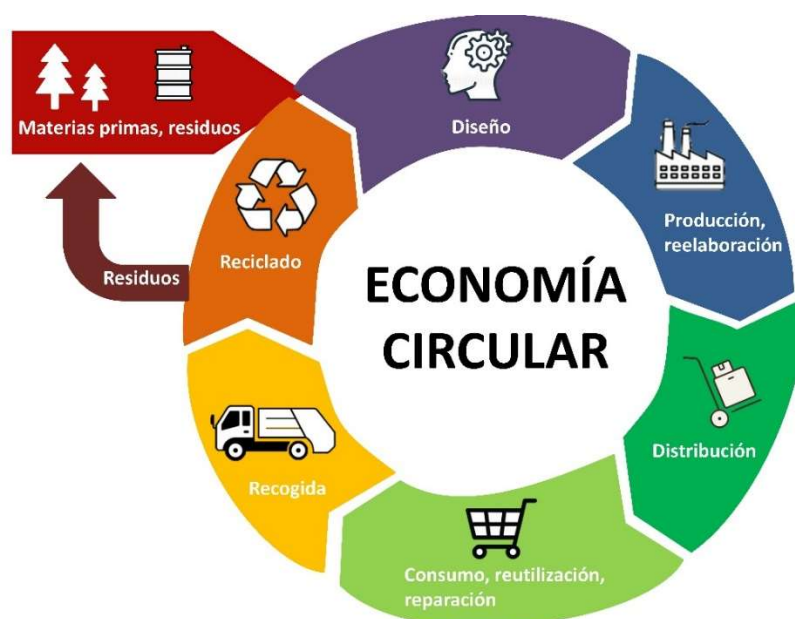


Figura 1.9. Modelo de economía circular.

El auge de este modelo económico se debe principalmente a que las previsiones futuras relatan un gran aumento de la población mundial, lo que requerirá una mayor cantidad de materias primas para poder asumir sus necesidades. La continuidad del modelo lineal peligra dado que los recursos del planeta son finitos y no podrán abastecer a la población de los productos demandados (Hanumante et al. 2019). Frente a esto, son ya muchos los sectores que están llevando a cabo el desarrollo de un modelo basado en un menor consumo de recursos naturales, cumpliendo así uno de los objetivos de la denominada Agenda 2030, propuesta por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) (Hanumante et al. 2019).

En este nuevo modelo, las microalgas pueden jugar un papel muy importante para ciertos sectores industriales, ya que pueden cultivarse en medios con diferentes tipos de residuos, como los mencionados en el apartado 1.4.1., y utilizarse posteriormente para la obtención de otro tipo de bioproductos demandados por la sociedad, reduciendo las materias primas necesarias y los residuos desechados al medio ambiente (Lai et al. 2019). Sin embargo, hasta ahora no se han realizado muchos estudios referentes al papel de las microalgas en la economía circular, por lo que se presenta como una opción atractiva a explorar. Algunos ejemplos describen el cultivo de microalgas con diferentes residuos para producir biocombustibles (Patel et al. 2020), proteínas (Lai et al. 2019) o compuestos de alto valor añadido (Nagaranjan et al. 2020).

Para conseguir una tecnología de economía sostenible utilizando microalgas Fabris y colaboradores (2020) proponen el desarrollo de unos conocimientos básicos previos para poder llevar a cabo un proceso medioambientalmente sostenible y económicamente viable. Los pasos a seguir son los siguientes:

- En primer lugar, se ha de diseñar un experimento que sea capaz de testear diferentes especies, tanto silvestres como modificadas genéticamente, con el fin de seleccionar aquellas que puedan tener las características idóneas: una alta velocidad de crecimiento, una gran robustez frente a factores ambientales adversos y una capacidad de producir compuestos que puedan ser llevados al mercado.

- El siguiente paso es tener un conocimiento avanzado del fenotipo del organismo. Para ello entran en juego el uso de las diferentes técnicas ómicas, que permiten un estudio completo del organismo en los diferentes niveles de expresión, mientras está sometido a distintas condiciones. Este paso permitirá establecer qué tipo de compuestos son generados en mayor cantidad por los organismos en las distintas condiciones.
- Posteriormente, se ha de llevar a cabo el diseño experimental a gran escala, en lo que denominan Industria 4.0. En este nivel se deben probar los diferentes diseños experimentales de biorreactores con el fin de encontrar el modelo de producción óptimo.
- Finalmente, se le deberá asignar una aplicación a la biomasa obtenida en función de los conocimientos obtenidos en las fases previas. Este paso es donde se ha de asegurar la viabilidad económica del proceso.

1.6. *Chlorella sorokiniana*

1.6.1. Descripción

Chlorella sorokiniana es una microalga clorofita que pertenece a la clase *Trebouxiophyceae* (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación de la microalga *Chlorella sorokiniana*.

Clasificación de <i>Chlorella sorokiniana</i>	
Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>
Familia	<i>Chlorellaceae</i>
Género	<i>Chlorella</i>

La característica principal del género *Chlorella* es una pared celular con alto contenido en carbohidratos, siendo la glucosamina el componente principal (Huss et al. 1999). Se trata de un grupo de microalgas robustas debido a su rígida pared celular, por lo que son muy adaptables a un gran número de hábitats, incluyendo condiciones ambientales adversas. Algunas especies de este género han sido usadas de forma generalizada en agricultura o como alimento rico en proteínas para consumo animal, encontrándose en este género también una de las pocas especies de microalgas cuya comercialización para consumo humano está permitida. Las cuatro principales especies de este género, según la clasificación filogenética dada por Huss y colaboradores (1999), son *Chlorella vulgaris*, *Chlorella lobophora*, *Chlorella kessleri* y *Chlorella sorokiniana*.

C. sorokiniana (Figura 1.10) es una microalga de agua dulce que ha sido aislada de diversos hábitats, entre los que se incluyen residuos urbanos y granjas (Cui et al. 2020); zonas con altas

concentraciones de metales pesados, como ríos que sufren efluentes de fábricas de acero o refinerías (Ruiz-Domínguez et al. 2016; Varshney et al. 2018) o suelos con alto contenido en Cd (Yoshida et al. 2006); así como en diferentes puntos del mundo tales como China (Wan et al. 2012), Sudáfrica (Ramana et al. 2014), o Túnez (Jazzar et al. 2016); por lo que se puede concluir que *C. sorokiniana* es una microalga con una gran capacidad de adaptación a diferentes ecosistemas y un importante papel biotecnológico. Por otra parte, se trata de un alga mesofílica, es decir, puede tolerar temperaturas relativamente altas en comparación con otras microalgas. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, sin embargo, se ha descrito que esta microalga puede llegar a crecer a temperaturas superiores a 45 °C (Yoshida et al. 2006).

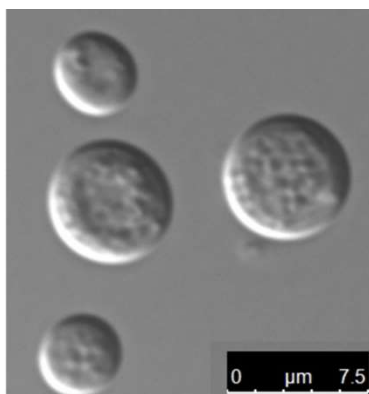


Figura 1.10. Foto al microscopio de la microalga *Chlorella sorokiniana*.100X

C. sorokiniana también es una microalga con una alta tasa de división celular, lo que hace que tenga un rápido crecimiento y un alto consumo de nutrientes. Recientes estudios han mostrado que parece crecer mejor en condiciones de cultivo mixotróficas (Marchelo et al. 2018), ya que puede obtener el carbono mediante fijación fotosintética y mediante asimilación de las fuentes orgánicas del medio. Por todo esto, la microalga *C. sorokiniana* puede ser considerada como un organismo con gran potencial biotecnológico, aunque al no ser un organismo modelo como *Chlamydomonas reinhardtii*, aún se desconoce mucho sobre ella y es necesario seguir investigando en esa dirección.

1.6.2. Aplicaciones biotecnológicas y medioambientales de *Chlorella sorokiniana*

El interés por la microalga *C. sorokiniana* ha ido incrementando de manera exponencial en los últimos años. Si miramos las bases de datos existentes, vemos que hasta el año 2010 se habían publicado una media de diez artículos al año que incluían el nombre de esta microalga. Entre 2010 y 2015, la media de artículos sube hasta unos 35-40 por año, incrementándose hasta 120 artículos por año en 2019 (*Web of Science database*), lo que nos indica que esta microalga está ganando protagonismo desde el punto de vista biotecnológico.

La aplicación biotecnológica más estudiada de *C. sorokiniana* es su utilización para el tratamiento de diferente tipo de residuos industriales y su implicación en procesos basados en la economía circular (Figura 1.9). En este contexto, la microalga ha sido cultivada con residuos industriales como el suero de leche (Riaño et al. 2016), en extractos residuales procedentes de la producción de macroalgas laminarias (Zheng et al. 2017), expuesta a gases procedentes de la combustión de hidrocarburos (Lizzul et al. 2014), así como en aguas provenientes de granjas (Cui et al. 2020) o aguas residuales procedentes de núcleos urbanos (Rani et al. 2019).

Aunque se ha demostrado que *C. sorokiniana* es una excelente microalga para ser utilizada en el tratamiento de diferentes tipos de residuos, estos procesos no son viables *per se*, por lo que

se ha intentado rentabilizar los procesos mediante la extracción simultánea de compuestos de interés. El compuesto principal que se ha extraído de esta microalga, y no solo en cultivos con residuos, son los lípidos. La producción de lípidos neutros, que cumplen los estándares requeridos para su utilización como biocombustibles (Kumar et al. 2016), ha hecho que se incremente su interés, principalmente en cultivos mixotróficos con diferentes fuentes de carbono, como glucosa, acetato o glicerol (Kumar et al. 2016, Li et al. 2014, Nanda et al. 2019).

C. sorokiniana es también una microalga con un alto contenido proteico, que puede llegar hasta un 50% del total de su peso seco (Tan et al. 2020), lo que la convierte en una alternativa muy interesante para la producción de diferentes tipos de proteínas y aminoácidos de uso alimentario. En este contexto, recientes estudios como los de Ballesteros-Torres y colaboradores (2019), y Tan y colaboradores (2020) ponen de manifiesto la importancia de las proteínas de *C. sorokiniana*. Por otra parte, otros estudios han mostrado la capacidad de esta microalga para producir otro tipo de compuestos de alto valor añadido, como almidón (Li et al. 2015) o carotenoides (Yun et al. 2019).

Finalmente, la capacidad de *C. sorokiniana* de crecer en ecosistemas con altos niveles de bacterias y sobrevivir frente a éstas, ha dado lugar a investigaciones que han puesto en valor propiedades antibacterianas de esta microalga (Li et al. 2016), así como otras que demuestran que ciertos componentes no identificados, que forman parte de su pared celular, pueden inhibir el crecimiento de células tumorales en ratones y humanos (Ishiguro et al. 2020).

Todos estos estudios ponen de manifiesto el importante potencial de la microalga *C. sorokiniana* desde el punto de vista biotecnológico, en general, y medioambiental, en particular.

1.7. Ingeniería genética de microalgas como elemento potenciador en sus aplicaciones biotecnológicas

Para conseguir la viabilidad económica de los procesos biotecnológicos basados en microalgas, una de las opciones más prometedoras es la mejora genética. Mediante esta técnica pueden generarse cambios en el ADN que conduzcan a la producción de una mayor cantidad de los compuestos deseados, o que permitan a las microalgas tolerar mejor ciertas condiciones de estrés desfavorables para su crecimiento, mejorando así la viabilidad del proceso. Las principales aproximaciones de la mejora genética en microalgas son la mutagénesis aleatoria y la manipulación genética molecular. Además, en los últimos años se han empezado a aplicar a varias especies de microalgas técnicas de edición del genoma, como CRISPR-Cas, capaz de generar mutantes *knock out* dirigidos de forma simple y eficaz.

La técnica más simple utilizada es la mutagénesis aleatoria. Para ello se aplica a las microalgas un agente mutagénico como luz UV, agentes químicos o diferentes tipos de radiación. Esta técnica tiene la ventaja de ser muy fácil de realizar y poco costosa. Además, no presenta problemas del tipo legal, ya que los organismos no son considerados organismos genéticamente modificados (GMO). Sin embargo, se trata de una técnica que, al no ser dirigida, da lugar a un gran número de mutantes que requieren exhaustivos cribados para obtener uno con las características deseadas. La mutagénesis aleatoria se ha utilizado recientemente para aumentar la producción de carotenoides (Kim et al. 2020a), o para buscar microalgas mutantes que vivan mejor en aguas residuales urbanas (Zhou et al. 2019).

La manipulación genética molecular, por otra parte, consiste en la inserción de un fragmento de ADN (homólogo o heterólogo) que incluye el gen de interés en el genoma de la microalga. Este proceso se puede realizar mediante diferentes técnicas entre las que podemos destacar:

- Agitación con perlas de vidrio: se basa en la permeabilización de las células con polietilenglicol y su posterior agitación con perlas de vidrio, que hacen que el ADN del medio se introduzca en la célula. Es un método que se empezó a desarrollar en hongos y que, en microalgas, es muy utilizado en mutantes deficientes en la pared celular (Díaz-Santos et al. 2015).
- Electroporación: este método se basa en la aplicación de uno o varios pulsos eléctricos, que propician la entrada del ADN a través de la membrana celular. En este proceso es muy importante optimizar la osmolaridad del medio, el número y duración del pulso o la intensidad del pulso eléctrico, ya que la eficiencia de la transformación depende de todos estos parámetros. Este método se ha utilizado con diferentes tipos de microalgas, obteniendo transformaciones estables (Kania et al. 2019; Chen y Hu, 2019).
- Bombardeo de partículas: en el bombardeo de partículas, el ADN es depositado sobre pequeñas partículas de oro o tungsteno, que son bombardeadas hacia la célula. Esta técnica ampliamente utilizada en células vegetales, ha demostrado ser particularmente exitosa para la transformación de diatomeas (Tanaka et al. 2014; Diner et al. 2016) o clorofitas (León et al. 2007).
- *Agrobacterium tumefaciens*: la co-infección con *Agrobacterium* es probablemente el método más versátil de manipulación genética, y ha permitido la transformación de una gran variedad de especies de microalgas incluyendo *Chlamydomonas reinhardtii* (Mini et al. 2018), *Nannochloropsis gaditana* (Radakovits et al. 2012), o *Tetraselmis chuii* (Úbeda-Mínguez et al. 2017). Básicamente consiste en introducir el fragmento de ADN de interés en la bacteria *Agrobacterium*, que posteriormente se cultivará con las microalgas a las que infecta, introduciendo el ADN en el genoma microalgal.

Hay varias revisiones interesantes sobre los logros obtenidos en la manipulación genética de microalgas (León-Bañares et al. 2004; Doron et al. 2016). Algunos ejemplos incluyen la obtención de microalgas capaces de autoflocular gracias a la expresión de genes floculantes de levadura (Díaz-Santos et al. 2015), con mayor contenido de carotenoides (Couso, et al. 2012), o lípidos neutros (Rengel et al. 2018)

En los últimos años ha tenido un gran desarrollo la técnica CRISPR-Cas en microalgas. Esta técnica es capaz de editar el ADN de los diferentes organismos *in vivo*, pudiendo ser dirigida a modificar la secuencia deseada con más eficiencia y precisión que otras técnicas previamente mencionadas (Vigara y Vega, 2020). Esta técnica se ha utilizado recientemente en microalgas para aumentar la producción de lípidos u otro tipo de compuestos de alto valor añadido (Lin y Ng, 2020; Kim et al. 2020b).

1.8. Objetivos de la Tesis

La microalga *Chlorella sorokiniana* posee un gran potencial biotecnológico debido a su gran capacidad de crecimiento y robustez. Por ello, la presente tesis se ha centrado en profundizar sobre las aplicaciones biotecnológicas de esta microalga, especialmente en las medioambientales. En este contexto, los principales objetivos de esta tesis doctoral son:

1. Optimizar los parámetros de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* e investigar su viabilidad y su capacidad para acumular lípidos neutros en cultivos semicontinuos, utilizando residuos industriales como fuente de nutrientes.
2. Investigar el efecto de diferentes metales pesados y metaloides sobre la microalga *Chlorella sorokiniana*, estudiando su crecimiento, morfología y metabolismo; y capacidad bioacumuladora.
3. Establecer un método de manipulación genética mediante electroporación para la microalga *Chlorella sorokiniana* utilizando diferentes promotores heterólogos, y optimizar la criopreservación a -80 °C, por largos periodos de tiempo, de los transformantes obtenidos.
4. Estudiar el perfil de aminoácidos, tanto estructurales como libres, de distintas especies de microalgas, entre las que se incluya *Chlorella sorokiniana*; buscar una relación entre estos perfiles y la clasificación taxonómica de las microalgas; y seleccionar las de mayor valor nutricional, en base a su contenido en aminoácidos esenciales.

Capítulo 2: Materiales y Métodos



2.1. Microorganismos empleados

2.1.1. Bacterias

Escherichia coli

La estirpe bacteriana empleada fue *E. coli* DH5 α (genotipo supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lac Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gryA96 thi1 relA1), utilizada rutinariamente para el mantenimiento y propagación de los plásmidos.

Acetobacter acetii

La estirpe bacteriana empleada fue *A. acetii* MIM 2000/28 cedida por el profesor Francesco Molinari de la Universidad de Milán.

2.1.2. Microalgas

Chlorella sorokiniana

Chlorella sorokiniana es una microalga *Chlorophyta* de agua dulce, que tiene un diámetro aproximado de 1 μ m. Pertence a la clase *Trebouxiophyceae* y orden *Chlorellales*. Su genoma consta aproximadamente de 9600 genes repartidos en 13 cromosomas. La cepa utilizada en este trabajo es la *Chlorella sorokiniana* 211-32 obtenida de la colección de cultivos del IBVF (Sevilla, España).

Es una microalga robusta, con una pared celular compuesta principalmente por carbohidratos, y capaz de crecer a alta velocidad y en un amplio rango de ecosistemas. Su temperatura óptima de crecimiento es 37°C y puede tolerar altos niveles de radiación. Esta microalga fue aislada por primera vez por Shihira y Krauss (1965).

Otras microalgas

Adicionalmente, en el Capítulo 6, se han utilizado 57 microalgas, de la colección de cultivos de la Universidad de Huelva (UHU); de los grupos de investigación de Ecotoxicología, Ecofisiología y Biodiversidad de Sistemas Acuáticos del ICMAN (CSIC, Cádiz), de Marine Biotechnology de la Universidade do Algarve (UALG) y del Área de Acuicultura y Recursos Marinos del IFAPA El Toruño (Cádiz). La clasificación por especies de este grupo de microalgas y su procedencia viene descrita en la Tabla 2.1:

Tabla 2.1. Clasificación taxonómica y procedencia del listado de especies utilizadas en el Capítulo 6.

Especie	Phylum	Procedencia
<i>Amphidinium carterae</i>	Miozoa	ICMAN
<i>Amphora</i> sp.	Bacillariophyta	ICMAN
<i>Anabaena flos-aquae</i>	Cyanobacteria	ICMAN
<i>Chaetoceros gracilis</i>	Bacillariophyta	ICMAN
<i>Chlamydomonas</i> sp. Marruecos	Chlorophyta	ICMAN
<i>Cryptomonas</i> sp.	Cryptophyta	ICMAN
<i>Cryptopreidiniopsis</i> sp. NOAA	Miozoa	ICMAN
<i>Cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG120</i>	Cyanobacteria	ICMAN
<i>Cylindrotheca closterium</i>	Bacillariophyta	ICMAN
<i>Dicrateria</i> sp.	Haptophyta	ICMAN
<i>Dunaliella</i> sp.	Chlorophyta	ICMAN
<i>Exanthemachrysis gayraliae</i>	Haptophyta	ICMAN
<i>Gyrodinium dorsum</i>	Miozoa	ICMAN

<i>Hemiselmis Cyclopea</i>	Cryptophyta	ICMAN
<i>Heterocapsa cf Pygmaea</i>	Miozoa	ICMAN
<i>Nannochloropsis gaditana CCMP 256</i>	Ochrophyta	ICMAN
<i>Nannochloropsis gaditana CAL</i>	Ochrophyta	ICMAN
<i>Nannochloropsis gaditana IFB</i>	Ochrophyta	ICMAN
Especie	Phylum	Procedencia
<i>Nitzschia aequorea</i>	Bacillariophyta	ICMAN
<i>Nitzschia sp.</i>	Bacillariophyta	ICMAN
<i>Ochromonas sp.</i>	Ochrophyta	ICMAN
<i>Oscillatoria sp.</i>	Cyanobacteria	ICMAN
<i>Pavlova lutheri</i>	Haptophyta	ICMAN
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Bacillariophyta	ICMAN
<i>Picochlorum oklahomense Xmm 5W5</i>	Chlorophyta	ICMAN
<i>Picochlorum oklahomense</i>	Chlorophyta	ICMAN
<i>Pleurochrysis cf. roscoffensis</i>	Haptophyta	ICMAN
<i>Porphyridium cruentum</i>	Rhodophyta	ICMAN
<i>Rebecca salina</i>	Haptophyta	ICMAN
<i>Rhodomonas salina</i>	Cryptophyta	ICMAN
<i>Synechococcus sp. Brown</i>	Cyanobacteria	ICMAN
<i>Synechococcus sp. sy1 green</i>	Cyanobacteria	ICMAN
<i>Synechococcus sp. (red)</i>	Cyanobacteria	ICMAN
<i>Synechocystis sp.</i>	Cyanobacteria	ICMAN
<i>Tetraselmis sp.</i>	Chlorophyta	ICMAN
<i>Tetraselmis sp. CCMP881</i>	Chlorophyta	ICMAN
<i>Thalassiosira sp.</i>	Bacillariophyta	ICMAN
<i>Trebouxiophyceae sp. Shy53</i>	Chlorophyta	ICMAN
<i>Chlamydomonas reinhardtii (21gr)</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Dunaliella bardawil</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Isochrysis galbana (Huelva)</i>	Haptophyta	UHU
<i>Osteopsis cf. Ovata</i>	Miozoa	UHU
<i>Picochlorum sp. (UHU)</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Tetraselmis suecica</i>	Chlorophyta	UHU
<i>Chlorococcum sp.</i>	Chlorophyta	UALG
<i>Picochlorum maculatum</i>	Chlorophyta	UALG
<i>Tetraselmis rubens</i>	Chlorophyta	UALG
<i>Tetraselmis striata</i>	Chlorophyta	UALG
<i>Unicellular Ulvophyceae sp.</i>	Chlorophyta	UALG
<i>Chroomonas salina</i>	Cryptophyta	IFAPA
<i>Diacronema vlkianum</i>	Haptophyta	IFAPA
<i>Isochrysis galbana (Cádiz)</i>	Haptophyta	IFAPA
<i>Pleurosigma sp.</i>	Bacillariophyta	IFAPA

Tabla 2.1 Continuación

2.2. Medios y condiciones de cultivo

2.2.1. *Escherichia coli*

La bacteria *E. coli* se cultivó en medio LB (Sambrook y Russell, 2001), que contiene: 10 g L⁻¹ de bactotripton, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura, y 5 g L⁻¹ de NaCl. Se ajustó el pH a 7, y se esterilizó

en autoclave. Cuando se indica se adicionó el antibiótico ampicilina a una concentración final de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Para el crecimiento en placas se añadió agar al 1% (p/v). El crecimiento en cultivos líquidos se realizó en agitadores orbitales termostatizados a 37°C y con agitación (150-200 rpm) durante 14-16 h. El crecimiento en placas se realizó en estufas termostatizadas a 37°C durante el mismo tiempo.

2.2.2. *Chlorella sorokiniana*

La microalga *C. sorokiniana* fue cultivada en una cámara de cultivo climatizada a una temperatura de 25°C con una iluminación continua con tubos fluorescentes de luz blanca a una intensidad aproximada de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los cultivos (Philips 30W/33), a menos que se indique otra intensidad luminosa. Todas las intensidades de luz se midieron con un fotorradiómetro Delta OHM quantum equipado con una sonda PAR para medir luz blanca.

Cultivos fotoautotróficos

En el caso de cultivos fotoautotróficos, se utilizó el medio de cultivo descrito por Sueoka (1960) que contenía por litro: 0,72 g de H_2KPO_4 , 1,44 g de $\text{HK}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (61 mg ml^{-1}), 1 ml de CaCl_2 (20 mg ml^{-1}), 0,5 g de NH_4Cl y 5 ml de Trazas Hutner. La composición de las Trazas Hutner por litro es la siguiente: 10 g de EDTA, 2,28 g de H_3BO_3 , 4,40 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,02 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,32 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,32 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0,22 g de $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Además, los cultivos fotoautotróficos también recibieron una corriente de aire enriquecido con un 5% v/v de CO_2 , que sirvió como fuente de carbono.

Cultivos mixotróficos

El modo habitual de cultivo de la microalga *C. sorokiniana* en este trabajo ha sido el mixotrófico, utilizando para ello el medio de cultivo TAP (Tris-Acetate-Phosphate) descrito para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Harris, 2009), con concentraciones de acetato y amonio optimizadas para la microalga *C. sorokiniana*. Este medio de cultivo contenía por litro: 0,006 g de H_2KPO_4 , 0,115 g de $\text{HK}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de CaCl_2 , 1,5 g de NH_4Cl , 2,49 g de Tris base, 5,94 ml de ácido acético glacial y 5 ml de Trazas Hutner, ajustando posteriormente su pH a 6,7-7. Los cultivos mixotróficos también fueron sometidos a una agitación constante de 150 rpm para optimizar las condiciones de crecimiento.

Adicionalmente, se llevaron a cabo cultivos mixotróficos utilizando lias procedentes de desechos de vino en sustitución del ácido acético. Para que estas lias pudieran ser utilizadas tuvieron que recibir un pre-tratamiento donde se oxidó el etanol presente a acético. Para ello, las lias obtenidas de las barricas de vino fueron cultivadas con la bacteria *Acetobacter acetii* a 28°C , con una agitación de 300 rpm. Previamente, *Acetobacter acetii* fue crecida en medio YPD (20 g L^{-1} peptona, 10 g L^{-1} de extracto de levadura y 20 g L^{-1} de manitol) durante 48 h y recogida mediante centrifugación (4500 rpm , 5 min), resuspendiendo el pellet celular obtenido en las lias. La oxidación de las lias por parte de *Acetobacter acetii* se llevó a cabo en 10 días, obteniéndose concentraciones de entre el 3 y el 5% v/v de ácido acético y cantidades no significativas de etanol. Tras este tiempo, se eliminó la bacteria *Acetobacter acetii* mediante centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos, siendo el sobrenadante las lias oxidadas utilizadas para el cultivo de *C. sorokiniana*. La composición aniónica de esas lias se determinó mediante cromatografía iónica, utilizando el cromatógrafo Metrhrom IC plus88, equipado con una columna Metrosep A Supp 5 – 205 / 40" y un detector de conductividad con supresión catiónica. La fase móvil de la columna fue NaHCO_3 ($1,404 \text{ mM}$) / Na_2CO_3 ($3,368 \text{ mM}$), a un flujo de $0,7 \text{ ml min}^{-1}$. Esta composición se muestra en la Tabla 2.2:

Tabla 2.2. Composición aniónica de las lias oxidadas utilizadas como fuente de carbono para el cultivo mixotrófico de *Chlorella sorokiniana*.

	Concentración (mg L ⁻¹)
Acetato	50000
NO ₂ ⁻	5,90
NO ₃ ⁻	20,7
Cl ⁻	56,8
Br ⁻	25,4
SO ₄ ⁻²	606,4
PO ₄ ⁻³	<LD

2.3. Cultivo en *fed-batch* y determinación de los parámetros cinéticos

El cultivo en *fed-batch* de *C. sorokiniana* se realizó en un reactor cilíndrico de 2 L con agitación y vaso encamisado (STR), equipado con una turbina tipo Rushton, que genera una agitación horizontal, y un sistema de aireación filtrada, ambos conectados a un sistema de control central Bio Controller ADI 1030 (Aplikon). El O₂ disuelto, la temperatura y el pH fueron controlados mediante un sensor polarográfico de oxígeno disuelto, un sensor Pt100 de temperatura y un electrodo de pH, respectivamente (Figura 2.1).



Figura 2.1. Instalación del reactor en el que se llevó a cabo el cultivo en *fed-batch*.

El procedimiento para llevar a cabo el cultivo *fed-batch* fue crecer un preinóculo de *C. sorokiniana* de 200 ml en medio TAP, con lias oxidadas como fuente de acetato, durante 3 días en condiciones estándar de cultivo. Posteriormente, los 200 ml fueron transferidos al reactor, que contenía 1,5 L de medio TAP con lias. Las condiciones del reactor fueron: una temperatura de 30 ± 2 °C, un pH de entre 6,7 y 7, una agitación de 550 rpm y una intensidad de luz de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie del reactor.

Cada 24 horas se tomaron muestras de 50 ml de cultivo. El cultivo se suplementó con 200 ml de medio que contenía lias y fuente nitrogenada cada 96 horas, con el fin de suplir el volumen perdido en las tomas de muestra. En cada adición de nutrientes se tomó una muestra antes y otra después de la misma para poder corroborar los valores obtenidos y el grado de dilución.

Los parámetros cinéticos calculados para determinar la eficiencia del cultivo fueron: la tasa de crecimiento específica (μ), el tiempo de generación (t_D), el contenido de lípidos ($Y_{L/X}$), el rendimiento de lípidos ($Y_{L/S}$), la productividad de biomasa (P_{biom}) y la productividad de lípidos (P_{lipid}); por medio de las siguientes ecuaciones:

- Tasa de crecimiento específica (μ): Se calculó durante la fase exponencial de crecimiento del cultivo *fed-batch*, siendo μ la pendiente obtenida al representar el ln del peso seco en función del tiempo. Debido al desfase producido por la dilución provocada en las

adiciones de nutrientes, el cálculo de este parámetro se llevó a cabo utilizando la herramienta de modelización DMFIT (<http://modelling.combase.cc>). Sus unidades son h^{-1} .

- Tiempo de generación. Se calculó mediante la ecuación:

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu}$$

- El contenido de lípidos se calculó mediante la ecuación:

$$Y_{L/X} = \frac{L_i - L_0}{X_i - X_0}$$

donde L_i y X_i son la concentración de lípidos y el contenido en peso seco en un tiempo t_i , respectivamente; y L_0 y X_0 son la concentración de lípidos y el contenido en peso seco en un tiempo 0 (primer día), respectivamente.

- El rendimiento de lípidos se calculó por medio de la ecuación:

$$Y_{L/S} = \frac{L_i - L_0}{S_0 - S_i}$$

donde S_i y S_0 son la concentración de acetato en el día t_i y t_0 (día de la adición del acetato), respectivamente; y L_i y L_0 son la concentración de lípidos en un tiempo t_i y t_0 , respectivamente.

- La productividad de biomasa (P_{biom}) se calculó como la pendiente de la ecuación de regresión lineal que se produce entre el peso seco y el tiempo de cultivo. Para su cálculo se utilizó el mismo método de modelización que para la tasa de crecimiento específica.
- La productividad de lípidos se calcula mediante la ecuación:

$$P_{lipid} (g L^{-1} día^{-1}) = \frac{L_{máx}}{t_i}$$

donde $L_{máx}$ es la concentración máxima de lípidos en el día t_i .

2.4. Preparación de los extractos crudos celulares

Las microalgas se recogieron a la mitad o al final de la fase exponencial de crecimiento, según su posterior uso, mediante centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos. En el caso de cultivos con metales pesados, se procedió a realizar un lavado con 3 volúmenes de medio de cultivo para eliminar los restos de metales presentes. La biomasa recogida se sometió a distintos procesos de rotura celular, tales como sonicación o agitación con perlas de vidrio. Otros métodos de rotura celular ensayados, como N_2 líquido, choque osmótico u homogenización en el mortero no fueron eficientes para esta microalga debido a su rígida pared celular.

2.4.1. Sonicación

Este proceso se utilizó para la obtención de los extractos crudos de las muestras de proteómica y los ensayos de inmunodetección de los transformantes de *C. sorokiniana*. Para ello, las células se resuspendieron en 2 ml g^{-1} peso húmedo (phc) de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y se

sometieron a sonicación (100 W) durante 10 periodos de 15 s, siendo el tiempo de espera entre pulsos de 1,5 min a 4°C. La suspensión obtenida se centrifugó durante 20 min a 13400 rpm en frío y el sobrenadante obtenido se utilizó directamente como extracto crudo o se congeló a -20 °C para su posterior utilización.

2.4.2. Agitación con perlas de vidrio

La rotura con perlas de vidrio se utilizó para los experimentos de actividad enzimática y como pretratamiento para la extracción del ARN en los ensayos de RT-PCR. Para ello, 0,15 g del pellet celular recogido mediante centrifugación se mezclaron con 0,4 ml de perlas de vidrio y 0,4 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0. La mezcla resultante se homogeneizó en el disruptor Digital Disruptor Genie® (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), aplicando 3 periodos de 30 s de agitación con un tiempo de espera entre periodos de 60 s a 4 °C. La suspensión obtenida se centrifugó durante 25 min a 13400 rpm en frío y el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto o se congeló a -20 °C.

2.5. Cálculo de la concentración de metales pesados y factor de bioconcentración

La determinación del contenido de Cu, Cd y As en las muestras de la microalga *C. sorokiniana* se llevó a cabo mediante Espectrometría de Plasma con Detector de Masas (ICP-MS) (Figura 2.2) con celda de colisión. Para ello se liofilizaron durante 48 h células recogidas al final de la fase exponencial del cultivo correspondiente. A continuación, se tomaron 0,05 g de cada muestra liofilizada, se sometieron a una digestión ácida añadiendo 1 ml de HNO₃, y se calentaron en un microondas durante 2 minutos a 350 W. Después de enfriarse las muestras, se adicionaron 1,5 ml de H₂O₂ y se volvieron a calentar en el microondas durante 2 minutos. Finalmente, cada mezcla se llevó hasta un volumen de 5 ml añadiendo agua Mili-Q. Las muestras se diluyeron 10 veces adicionando, por pesada, 0,5 ml de muestra, 4,4 ml de agua Mili-Q y 0,1 ml de patrón interno preparado a una concentración de 500 ppb.



Figura 2.2. Sistema de Espectrometría de Plasma con Detector de Masas (ICP-MS).

Para la determinación de la concentración del metal en el medio de cultivo se tomaron volúmenes de entre 25 y 75 µl en el caso del cultivo con metales, y 1 ml en el caso de los cultivos control. A continuación, se diluyeron hasta a un volumen final de 10 ml con agua Mili-Q, añadiendo también 0,1 ml del patrón interno preparado a una concentración de 500 ppb.

Para la medición de las muestras por ICP-MS con celda de colisión se utilizó un plasma de Ar, el cual se sustentó sobre una antorcha tipo Fassel, empleando una potencia de 1,9 kW y flujos de 0,5, 0,6 y 15 L min⁻¹ para los gases auxiliar, inyector y exterior, respectivamente. La muestra se introdujo mediante un nebulizador de flujo cruzado a un flujo de 1 ml min⁻¹. Como gas de reacción se utilizó el He a un flujo de 4,3 ml min⁻¹. Los distintos parámetros operativos se ajustaron mediante una disolución de calibración constituida por Li, Y, Ce y Tl para obtener la máxima señal y la mejor precisión. Además, se empleó una disolución multielemental estandarizada para la preparación de las curvas de calibración. La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica del patrón interno, empleando disoluciones de Sc, Rh, Tb y Ge.

El cálculo del factor de bioconcentración de cada metal en *C. sorokiniana* se llevó a cabo mediante la ecuación descrita por Ellison y colaboradores (2014):

$$BCF = \frac{C_b}{C_w}$$

donde C_b la concentración del metal en la biomasa de la microalga (mg metal kg⁻¹ peso seco) y C_w es la concentración en el medio de cultivo (mg metal L⁻¹).

2.6. Determinación de actividades enzimáticas

Las enzimas son proteínas que poseen propiedades catalíticas y cuya función es acelerar la reacción sobre la que actúan. Estas proteínas, por lo general, son termolábiles y sensibles a alteraciones físicas del medio en el que se hallen. En general, la variación de la velocidad del proceso catalizado se mide en unidades de actividad enzimática (U), que indica la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de sustrato (o producto) por minuto (μmol min⁻¹). Sin embargo, si queremos comparar entre los niveles de actividad de diferentes extractos crudos, es necesario utilizar unidades de actividad específica, que viene referido como unidades de actividad enzimática por miligramo de proteínas (U mg⁻¹). Todos los ensayos de actividad se llevaron a cabo con extractos crudos de células recogidas en mitad de la fase exponencial (40 h), según lo descrito en el apartado 2.4. de este Capítulo.

A continuación, se describen los ensayos de actividad de las enzimas estudiadas en la presente Tesis:

2.6.1. Ascorbato peroxidasa

La ascorbato peroxidasa (APX) es una enzima antioxidante que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, en presencia de ascorbato, produciéndose el radical ascorbato monohidrato según la reacción:

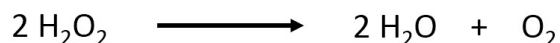


La actividad enzimática se determinó en base a las condiciones descritas por Amako et al. (1994) y adaptadas por Romero-Cruz, (2017). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μmol de Tris-HCl pH 8,0; 1 μmol de EDTA, 10 μmol de H₂O₂; 0,24 μmol de ascorbato sódico; y 50 μl de extracto crudo. La actividad se determinó espectrofotométricamente, midiendo la cinética de desaparición de ascorbato a 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a 25 °C. La reacción se inicia con la adición del ascorbato y el blanco se realiza del mismo modo, pero sin la adición del H₂O₂.

Previo la reacción hay un tiempo de estabilización de reactivos (sin el extracto crudo) de unos 8-10 segundos, tras los cuales se le adiciona el extracto crudo y el H₂O₂.

2.6.2. Catalasa

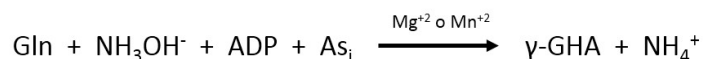
La enzima catalasa (CAT) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, dando lugar a oxígeno y agua, según la reacción:



La actividad catalasa se determinó a partir del ensayo realizado por Martins y English (2014), donde la mezcla de reacción contenía 10,5 μmol de H₂O₂ (preparado en 0,5 ml de Tris-HCl 52,5 mM, pH 8,0) en un volumen de 0,525 ml, y 25 μl de extracto crudo. La actividad se determinó espectrofotométricamente midiendo a 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) la cinética de desaparición del H₂O₂, a 25 °C. La reacción se inició con la adición del H₂O₂ y el blanco se realizó igual, pero sin el extracto crudo.

2.6.3. Glutamina sintetasa

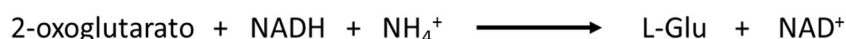
La actividad enzimática glutamina sintetasa (GS) se determinó en base a su actividad transferasa, que cataliza la síntesis de γ -glutamihidroxamato (γ -GHA) a partir de glutamina e hidroxilamina (NH₃OH⁺), y en presencia de ADP y arseniato (As_i), según la reacción:



La actividad enzimática se determinó en función a las condiciones descritas por Shapiro y Stadman (1970). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, 0,6 ml de mezcla de ensayo (40 mM de L-glutamina; 4 mM de MnCl₂; 0,5 mM de ADP; 66 mM de MOPS, pH 6,0); 60 μmol de hidroxilamina; 60 μmol de NaOH; 5 μmol de DTE, 50 μmol de HAsO₄⁻; y 50 μl de extracto crudo. Tras incubar la mezcla 10 min a 40 °C, se paró la reacción mediante la adición de 1 ml de reactivo ácido de Fe(III) que contenía, por 1 L: 33,4 g de FeCl₃·6H₂O; 7,8 ml de HCl al 37% (v/v); y 60,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v). Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se determinó el γ -GHA formado espectrofotométricamente a 500 nm ($\epsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El blanco se realiza igual, pero sin la presencia del extracto crudo en la mezcla de reacción.

2.6.4. Glutamato deshidrogenasa aminante

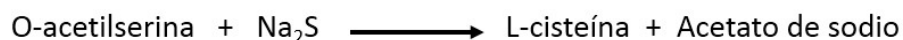
La actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) se determinó por medio de la reacción de aminación oxidativa que transforma el 2-oxoglutarato en L-glutamato:



La actividad enzimática se determinó según las condiciones descritas por Gronostajski et al. (1978). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μmol de Tris-HCl, pH 8,0; 25 μmol de 2-oxoglutarato (sal disódica); 100 μmol de NH₄Cl; 0,35 μmol de NADH y 100 μl de extracto crudo. La actividad se determinó espectrofotométricamente siguiendo la curva de desaparición del NADH a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a 38 °C. El blanco se realizó en ausencia del 2-oxoglutarato.

2.6.5. O-acetilserina (tiol)-liasa

La actividad O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL) se determinó colorimétricamente en base a la cantidad de L-cisteína formada en la reacción:



El ensayo de actividad se realizó según las condiciones descritas en León et al. (1987), donde la mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1,5 ml: 50 μmol de tampón fosfato de potasio pH 7,5; 10 μmol de Na_2S ; 20 μmol de O-acetilserina; y 20 μl de extracto crudo. Esta mezcla se incubó durante 10 min a 50 °C y, pasado ese tiempo, la reacción se paró mediante la adición de TCA 20% (p/v). Posteriormente se determinó la cantidad de L-cisteína formada mediante la adición de 0,5 ml de ácido acético 6 M y 0,5 ml del reactivo de nihidrina (que contiene 0,25 g de nihidrina en 6 ml de ácido acético y 4 ml de HCl), manteniendo la mezcla a 100 °C durante 10 min. A continuación, se llevó la mezcla a un baño de hielo y se adicionaron 4,5 ml de etanol 96% v/v para estabilizar el complejo formado. Finalmente se midió la absorbancia a 560 nm ($\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), realizando el mismo procedimiento para el blanco con la excepción de la adición de extracto crudo.

2.6.6. NAD-Isocitrato deshidrogenasa

La actividad NAD-isocitrato deshidrogenasa (NAD-IDH) se determinó por medio de la reacción de descarboxilación del isocitrato para producir 2-oxoglutarato:



La actividad NAD-IDH se determinó según lo establecido por Martínez-Rivas y Vega (1998). La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 ml: 50 μmol de tampón fosfato de potasio, pH 7,5; 4 μmol de MnCl_2 ; 1,5 μmol de NAD^+ ; 4 μmol de D,L-isocitrato y 50 μl de extracto crudo. La reacción cinética se inició con la adición del D,L-isocitrato y la actividad se determinó espectrofotométricamente midiendo la aparición de NADH a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a 25 °C. El blanco se realizó en ausencia de D,L-isocitrato.

2.7. Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para la determinación cuantitativa de los diferentes niveles de expresión de los genes que codifican las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutamina sintasa (GS), glutamato deshidrogenasa (GDH), NAD isocitrato deshidrogenasa (NAD-IDH) y O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL) en la microalga *C. sorokiniana* se utilizó la técnica qPCR.

2.7.1. Diseño de oligonucleótidos

El primer paso fue el diseño de oligonucleótidos específicos (*primers*) para cada gen, utilizando el programa *DNA Start* (Tabla 2.3). Todos ellos tienen una longitud de entre 15 y 25 pb, una temperatura de hibridación de entre 61 y 67 °C, y dan lugar a una secuencia de ADN de entre 250 y 400 pb.

Tabla 2.3. Oligonucleótidos utilizados para los experimentos de qPCR

Nombre del Gen	Gene Bank Accession number no.	Nombre	Secuencia
APX	PRW20193.1	qAPXF	GTTCCACGACGCCGGCTCCTACA
		qAPXR	CTGCCGCCCCACTGCCACCTTGAT
CAT	PRW57738.1	qCATF	CCCACCTGCGGGCTCAAGTTCCT
		qCATR	CGGTGGCGCTGCGTGTCTGGTA
GS	PRW34037.1	qGSF	CACCGGCCCCCTGGAGACC
		qGSR	GCAGGGGGATGCGGATGGAG
GDH	PRW44353.1	qGDHF	AGATGGGCGGCCGCTGGTAGC
		qGDHR	GCCGCCGCCGTTGGTGAAGATG
NAD-IDH	PRW57886.1	qNADIDHF	GTGGTGCCCGCGTGGTGGAGTC
		qNADIDHR	CCCGTTGGCGCCGATGTTGC
OASTL	PRW20938.1	qOASTLF	GCAACCCGGGGCCCCACAAGAT
		qOASTLR	GGAACAGCGCGGACGACAGGTAGC
18sCS	KF673387.1	q18sCSF	TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATC
		q18sCSR	CGCGTGCGGCCAGAAACA

2.7.2. Extracción del ARN y retrotranscripción

Para la extracción del ARN de *C. sorokiniana* se recogieron los diferentes cultivos a las 40 h de crecimiento y se procedió a la rotura celular según lo descrito en el apartado 2.4.2, aplicando pequeñas modificaciones descritas por Arriola et al. (2018) para la extracción de ARN de *C. sorokiniana*. Se utilizaron 100 mg de biomasa, 300 μ l de perlas de vidrio y 600 μ l de Trizol, y la mezcla se agitó durante 2 min en el disruptor. Tras reposar 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 200 μ l de cloroformo. Esta nueva mezcla se agitó en el vórtex 15 s, se centrifugó a 13400 rpm durante 3 min y se recogió el sobrenadante (fase acuosa). Finalmente, se utilizó el kit “Direct-Zol™ RNA MiniPrep” (Zimo Research) para la purificación del ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la obtención del cDNA a partir del ARN de *C. sorokiniana* se utilizó el kit “QuantiTect Reverse Transcription Kit” (Quiagen), con el que se obtuvo un volumen total de 20 μ l de cDNA con un rendimiento medio de 200 ng μ l⁻¹.

2.7.3. Análisis qPCR

La reacción qPCR se llevó a cabo en un equipo Mx3005P (Stratagene), con un fotomultiplicador como detector de fluorescencia, placa de 96 pocillos con tapa térmica, y un sistema óptico de dos ruedas con 5 filtros cada una. Se utilizó el complejo SYBRGreenI como fluoróforo inespecífico ($\lambda_{em} = 520$ nm y $\lambda_{ex} = 497$) y cada reacción se preparó para un volumen final de 10 μ l, con los siguientes componentes: 8 μ l del SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) de Takara con las

concentraciones establecidas por el fabricante (dNTPs, MgCl₂, SYBR Green, Taq polimerasa hot Start, buffer DNA polimerasa), 50-150 nM (1 µl) como concentración final de cada *primer* (for-rev) y 1 µl de DNA complementario conteniendo entre 100-150 ng. Cada muestra se analizó por triplicado. Se incluyó un control negativo (C-) sin DNA. Las condiciones de reacción fueron: 30 s a 95 °C para activar la Hot start Taq polimerasa y 40 ciclos para desnaturalizar (10 s a 95 °C), hibridar (30 s a la temperatura indicada por el *primer*) y polimerizar (30 s a 72 °C) el cDNA. La fluorescencia se midió al final de cada paso de hibridación de los cebadores, y al final del proceso se ejecutó una curva de disociación para comprobar la especificidad de los cebadores (entre 50 y 95 °C). Los datos se trataron con el software “Quick setup-4.5.2” y se utilizó el gen del 18s de *C. sorokiniana* (KF673387) como gen de referencia para normalizar, puesto que se ha demostrado que la expresión de este gen permanece invariable en presencia de metales pesados en el medio (Wan et al. 2014). Para la cuantificación relativa de la abundancia del ARN mensajero, se utilizó la aproximación del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001).

2.8. Análisis proteómico mediante espectrometría de masas

2.8.1. Pretratamiento de las muestras

Las proteínas de *C. sorokiniana* usadas en el análisis proteómico realizado en esta Tesis se asilaron a partir de extractos crudos obtenidos como se indica en el apartado 2.4.1.

La cuantificación se llevó a cabo mediante SWATH-MS (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra*) en el servicio de proteómica del IBVF. Para ello, los extractos crudos se precipitaron mediante el método del Trizol donde, a 700 µl de extracto crudo, se le añadió 1 ml de Trizol y se agitó en el vórtex durante 15 s, dejando reposar la mezcla en hielo 5 minutos. Posteriormente se le añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó 15 s, se incubó 5 min en hielo y se centrifugó en frío a 13400 rpm durante 15 min. Tras la separación de las fases, se seleccionó la fase orgánica (cloroformo) y se le adicionaron 300 µl de etanol puro. La mezcla se agitó suavemente y se centrifugó a 2300 rpm durante 10 min, tras lo que se extrajo el sobrenadante (fase orgánica y acuosa). A este sobrenadante se le adicionó 1 ml de isopropanol y se dejó 10 min a temperatura ambiente para que se produjera la precipitación de las proteínas. Pasado este tiempo, se centrifugó en frío a 13400 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó 3 veces con una solución 0,3 M de guanidina en etanol al 95%, se sonicó en un baño durante 5 minutos y se centrifugó en frío durante 5 min a 13400 rpm. El precipitado obtenido se volvió a lavar del mismo modo con etanol al 90% y, tras secarse, se resuspendió en una disolución de bicarbonato sódico (50 mM): trifluoroetanol (50%).

A continuación, se procedió a la digestión de las muestras. Para ello, unos 50 µg de proteínas se incubaron con DTT 4,5 mM durante 30 min a 60 °C y, posteriormente, se le añadió yodoacetamida hasta una concentración de 10 mM, incubándose 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. El tratamiento con tripsina se hizo a 37 °C durante toda la noche en relación 1:40 (tripsina:proteína). Al día siguiente se añadió ácido fórmico y se incubó a 37 °C durante 1 h. Finalmente se añadió acetonitrilo y agua, para que la concentración del digerido estuviera en torno a 0,5 µg µl⁻¹ y 2% acetonitrilo, inyectándose 2 µl (1 µg de proteína en columna) en el cromatógrafo líquido acoplado a un detector de masas (LC-MS). A cada una de las muestras se añadió también una mezcla de péptidos sintéticos de Sciex a una concentración final de 20

fentomoles μl^{-1} , para el alineado posterior de los cromatogramas, necesario para el procesamiento de SWATH.

2.8.2. Análisis LC-MS/MS

Para generar la librería de espectros se llevó a cabo, en primer lugar, una aproximación DDA (*data-dependent acquisition*) usando un nano-LC-MS/MS. Para ello se utilizó un triple cuadrupolo TOF (5600 plus, Sciex) equipado con una fuente de electrospray nano y acoplado a un nanoHPLCEKsigent. El software utilizado para el control de los equipos y la adquisición y procesado de los datos fue Analyst TF 1.7. Los péptidos eluidos se cargaron en una columna "trapcolumn" (AcclaimPepMap 100 C18, 5 μm , 10 \AA , 100 μm id x 20 mm, Thermo Fisher Scientific) de manera isocrática en ácido fórmico 0,1% / acetonitrilo 5% (v/v) a un flujo de 3 $\mu\text{l min}^{-1}$ durante 10 min. Posteriormente, se eluyeron en una columna analítica de fase reversa con el *emitter* incorporado (New Objective Pico Fritcolumn 75 μm id x 250 mm, empaquetada con Reprosil-PUR 3 μm), con un gradiente lineal del 5-30% (v/v) del solvente B en 120 min y, después, 15 min del 30 al 60% (v/v) con un flujo de 250 nl min^{-1} . El solvente A fue ácido fórmico 0,1% (v/v) y el B, acetonitrilo con fórmico 0,1% (v/v). El voltaje de la fuente se seleccionó a 2600 V y la temperatura del calefactor se mantuvo a 100 °C. El gas 1 se seleccionó a 17 psi, el gas 2 a cero, y el de cortina a 25 psi.

Para experimentos de identificación de proteínas, la adquisición se llevó a cabo con un método DDA, consistente en un TOF MS con una ventana de barrido de 400-1250 m/z, tiempo de adquisición de 250 ms, seguidos de 50 MS/MS con una ventana de barrido de 230-1500 m/z, tiempo de adquisición de 65 ms y con un tiempo de ciclo de 3,5 s.

2.8.3. Creación de la librería

Las identificaciones de péptidos y proteínas se realizaron mediante el software Protein Pilot (versión 5.0.1. Sciex) con el algoritmo Paragon. La búsqueda se realizó con la base de datos de proteínas de *C. sorokiniana* Uniproteome_Chlorellasorokinianaprotein (Enero 2019), especificando la modificación con yodoacetamida y las posibles modificaciones de cisteínas. La proporción de falsos positivos (FDR) se estableció en 0,01, tanto para péptidos como para proteínas. El espectro MS/MS de los péptidos identificados se utilizó para generar la librería de espectros para la extracción de picos SWATH, usando el *add-in* MS/MSALL para el software PeakView (versión 2.1 Sciex) con la aplicación SWATH Acquisition MicroApp (versión 2.0 Sciex). Los péptidos con un intervalo de confianza del 99% (obtenidos de la base de datos Protein Pilot) fueron incluidos en la librería de espectros.

Para la cuantificación relativa mediante SWATH, se analizaron las mismas muestras utilizadas para generar la librería de espectros usando el método DIA (*Data-Independent Acquisition*). Cada muestra (2 μl) fue analizada usando el LC-MS y el gradiente LC descritos para obtener la librería de espectros, pero aplicando en este caso el método SWATH. El método repetía un ciclo que consistía en la adquisición de 34 lecturas TOF MS/MS (de 230 a 150 m/z, tiempo de adquisición de 100 ms) de ventanas solapantes de aislamiento de precursores secuenciales de 25 m/z (solapamiento 1 m/z) cubriendo el rango de masas de 400 a 1250 m/z con una lectura TOF MS previa (400 a 1250 m/z, tiempo de adquisición 50 ms) para cada ciclo. El tiempo total del ciclo fue de 3,5 s.

La extracción de datos del cromatograma de iones fragmento de las corridas SWATH se llevó a cabo por PeakView (version 2.1) con el MS/MSALL, con la aplicación SWATH Acquisition MicroApp (version 2.0), que procesa los datos usando la librería de espectros creada de los datos dirigidos. Se seleccionaron más de 10 péptidos por proteína y 7 fragmentos por péptido, basándose en la intensidad de la señal. Los péptidos compartidos o modificados fueron excluidos del procesamiento. Se usaron ventanas de 12 min y 20 ppm para conseguir los cromatogramas de iones. La cuantificación SWATH se realizó para todas las proteínas de la librería de iones identificadas por el Protein Pilot con un FDR (*false discovery rate*) por debajo del 1%, generándose los cromatogramas de iones a partir de cada ion fragmento seleccionado. Las áreas de los picos de los péptidos se obtuvieron sumando las áreas de los picos de los iones fragmento correspondientes. PeakView calculó un FDR y una puntuación para cada péptido asignado según los componentes cromatográficos y del espectro. Sólo se cuantificaron los péptidos con un FDR por debajo del 5%. La cuantificación de las proteínas se calculó sumando las áreas pico de los péptidos correspondientes. Para analizar la abundancia diferencial de proteínas en los dos grupos, se usó la aplicación MarkerView (version 1.2.1, Sciex) para la normalización de la señal.

Los datos proteómicos obtenidos para este trabajo se depositaron en el repositorio ProteomeXchange Consortium a través de PRIDE (Vizcaíno et al, 2016) con el identificador PXD015932.

2.9. Manipulación genética

2.9.1. Plásmidos y construcciones utilizadas

Los vectores de expresión utilizados para la transformación genética tuvieron en común la presencia del gen de resistencia a paromomicina aminoglicosido 3'-fosfotransferasa (*APHVIII*) de *Streptomyces rimosus* como marcador selectivo, así como diferentes promotores heterólogos, que fueron: el promotor híbrido de *Chlamydomonas reinhardtii* *HSP70A/RbcS2*, el promotor de la nopalina sintasa (*NOS*) de *Agrobacterium tumefaciens*, y el promotor del ARN 35s del virus del mosaico de la coliflor *CaMV35S* (Figura 2.3), testados previamente por nuestro grupo de investigación en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Díaz-Santos et al. 2013). Se eligió el gen *APHVIII* como gen marcador ya que se ha demostrado que proporciona un fenotipo estable y tiene un uso de codones similar en el genoma de las algas verdes (Sizova et al. 2001).

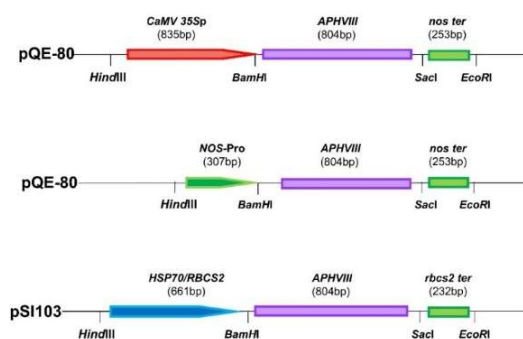


Figura 2.3. Construcciones utilizadas para la transformación de *Chlorella sorokiniana*. Las construcciones de ADN plasmídico utilizadas contienen el gen de resistencia a la paromomicina aminoglicosido 3'-fosfotransferasa (*APHVIII*) de *Streptomyces rimosus*. Se utilizaron 3 promotores heterólogos: el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV 35S*), el promotor de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (*NOS*) y el promotor híbrido *HSP70A/RBCS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

2.9.2. Electroporación

El procedimiento por el que se llevó a cabo la manipulación genética de la microalga *Chlorella sorokiniana* fue el de electroporación. Para ello, se tomó 1 ml de cultivo de la microalga en la fase exponencial de crecimiento ($5 \cdot 10^8$ células ml^{-1}), se centrifugó 2 min a 13.400 rpm, y se lavó 3 veces con una solución isoosmótica de glicerol (50 mM), para disminuir la concentración de sales. Las células de *C. sorokiniana* se volvieron a resuspender en una disolución de glicerol (50 mM) y se dejaron 10-20 min en hielo. Tras este tiempo, se tomaron 800 μl del cultivo celular y se adicionaron a la cubeta de electroporación (0,4 cm de separación entre los electrodos) junto con 40 μg de ADN. La mezcla se llevó a un electroporador Gene Pulser™ (BioRad) y se le aplicaron entre 1 y 3 pulsos con un voltaje de entre 1,8 y 3 kV por pulso. Tras la aplicación de la corriente eléctrica, se mantuvo la cubeta en hielo durante 5 min y se transfirió su contenido a un cultivo con 40 ml de medio TAP sin antibióticos, donde estuvo 24 h. Pasado este tiempo, se recogió el cultivo y el precipitado celular se sembró en placas de Petri que contenían una concentración de 100 μg ml^{-1} de paromomicina. Las colonias de los transformantes aparecieron a los 7-10 días del sembrado.

Para el análisis de los transformantes, se testaron las colonias seleccionadas mediante cultivos sucesivos en placas y en líquido con el objetivo de seleccionar los mejores transformantes.

2.9.3. Análisis molecular de los transformantes

Para determinar la integración de los diferentes plásmidos en el genoma de *C. sorokiniana* y para demostrar la expresión génica, los transformantes seleccionados fueron sometidos a un análisis PCR tras la extracción de su ADN genómico y de su ARN, respectivamente.

La extracción del ADN genómico de *C. sorokiniana* se realizó recogiendo por centrifugación 2 ml del cultivo y el precipitado fue resuspendido en 300 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 5 mM; SDS al 2% p/v; NaCl 0,3 M). La disolución obtenida se agitó a temperatura ambiente (5 min) y se incubó en frío durante otros 5 min. A continuación, se realizó la extracción de ADN mediante la adición de un volumen igual de fenol-cloroformo, agitación en vórtex y centrifugación durante 5 min a 13400 rpm en frío, manteniendo la fase acuosa. Este proceso se realizó cuatro veces, utilizando en el último paso cloroformo-agua. Posteriormente se precipitó el ADN añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto y dejando a -20 °C el recipiente durante 2-3 h. Pasado este tiempo, se centrifugó la muestra en frío a 13400 rpm y 10 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en etanol al 70% v/v. Posteriormente, se centrifugó la muestra 2 min a 13400 rpm y se volvió a descartar el sobrenadante. Finalmente, tras el secado, el precipitado se resuspendió en 40 μl de tampón de elución para obtener el ADN genómico puro.

La extracción de ARN y posterior paso de retrotranscripción a cDNA de los transformantes de *C. sorokiniana* se llevó a cabo tal como se describe en el apartado 2.7.2.

Para la amplificación mediante PCR, 1 μl de ADN genómico o de cDNA, según el caso, se añadió a un volumen total de 25 μl que contenían: 10 pmol de cada primer; 0,2 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa de Biotools (B&M Labs); 2,5 μl del buffer específico 10x (2,5 mM MgCl_2); y 0,25 μl de dimetilsulfóxido (DMSO). El programa de la PCR fue, en ambos casos: un paso de pre-desnaturalización a 96 °C de 30 s; 30 ciclos de desnaturalización (1 min a 96 °C), hibridación (30 s a 61 °C) y polimerización (30 s a 72 °C); seguido de un paso final de 5 min a 72 °C. Los *primers*

(Tabla 2.4) fueron diseñados para dar una amplificación de 360 pb de un fragmento del gen *APHVIII*, introducido en la microalga *C. sorokiniana*. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Tabla 2.4. Oligonucleótidos utilizados para el análisis por PCR de los transformantes de *C. sorokiniana*

<i>Primers</i>	5'--	3'
<i>Forward</i>	GAGGATCTGGACGAGGAGCGGAA	
<i>Reverse</i>	CCCTCAGAAGAAGCTCGTCCAACAGC	

2.9.4. Análisis de los transformantes mediante inmunodetección

Con el fin de corroborar que la expresión génica de la proteína APHVIII se llevó a cabo un ensayo de inmunodetección en los transformantes de *C. sorokiniana*. La recogida del cultivo y rotura celular se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 2.4.1. con la única excepción de que el tampón utilizado fue TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM).

Las proteínas del extracto crudo se separaron mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en geles al 10% de poliacrilamida (p/v), utilizando un tampón (pH 8,3) que contenía por litro: 1 g de SDS, 3 g de Trizma base, y 14,4 g de glicina. La electroforesis se llevó a cabo con una intensidad constante de 15 mA por placa, con el sistema CBB G-250 (BioRad). A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) usando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (BioRad). El programa utilizado tuvo un voltaje de 25 V durante 10 min. La membrana se lavó con tampón TBS y, justo después, fue bloqueada durante toda la noche con tampón TBSB (TBS con leche en polvo 5% p/v y Tween 20 0,1% v/v). Seguidamente, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario, utilizando anticuerpos policlonales anti-APHVIII de conejo (1:5000), obtenidos a partir de la proteína recombinante purificada por Díaz-Santos y colaboradores (2015). Este proceso se realizó en tampón TBS, con leche en polvo al 1%, durante 90 min a 4 °C, tras lo cual, la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con el mismo tampón a 4 °C y en agitación. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, de cabra anti-IgG de conejo (1:10000) conjugada con fosfatasa alcalina (AP) (SIGMA), en tampón TBS con leche en polvo al 1% durante 45 min a 4 °C. Finalmente, se reveló la membrana mediante la detección de la actividad fosfatasa alcalina incubándola con tampón TBS-PA (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; Nitroblue Tetrazolium 0,4 mM; BCIP 0,5 mM) a temperatura ambiente. Cuando se observó la aparición de las bandas correspondientes, la membrana se transfirió a agua destilada para parar la reacción.

2.10. Criopreservación

Para el proceso de criopreservación de la estirpe silvestre y los transformantes de *C. sorokiniana* se utilizaron como compuestos criopreservantes DMSO y etilenglicol (EG). Para ello se tomaron 5 ml de muestras de los cultivos al comienzo de la fase exponencial (D.O. aproximada de 0,200 U.A.) y se le adicionaron concentraciones de DMSO, EG, o ambos de entre el 5 y el 10% v/v, incubando estas muestras en oscuridad, a 4 °C, durante 5 h. A continuación, las muestras se alicuotaron en viales de 2 ml, con 1,5 ml del cultivo incubado con el criopreservante. Estas

alícuotas se colocaron en un contenedor NALGENETM (Nalge Nunc International), que contenía isopropanol para asegurar que la velocidad de congelación no fuera superior a $1,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, y se llevaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la descongelación, los viales almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron incubados a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y la suspensión celular obtenida transferida a 25 ml de medio TAP para ser cultivadas durante 12 h en oscuridad, 24 h con luz tenue, y finalmente transferidas a las condiciones mixotróficas de cultivo descritas en el apartado 2.2.2.

La viabilidad del proceso se llevó a cabo durante varios periodos de tiempo calculando el porcentaje de células vivas antes y después del proceso de criopreservación, mediante conteo en la cámara de Neubauer; con estos datos se determinó el denominado tiempo de recuperación, que es el tiempo que los cultivos, sometidos al proceso de criopreservación, tardan en alcanzar la mitad de la fase exponencial, midiendo la densidad óptica a 660 nm.

2.11. Determinación de aminoácidos

2.11.1. Obtención de aminoácidos

Para la obtención de aminoácidos se llevaron a cabo dos protocolos: uno para los aminoácidos estructurales y otro para los aminoácidos libres. En ambos casos se partía de biomasa liofilizada.

En el caso de aminoácidos estructurales, donde es necesario romper los enlaces peptídicos de las proteínas, se llevó a cabo previamente una hidrólisis ácida y otra básica. En ambos casos, se utilizaron 0,05 g de biomasa de microalgas, a los que se le añadió 1 ml de HCl 6 M, en el caso de la hidrólisis ácida, y 1 ml de NaOH 4,2 M, en el caso de la básica. La mezcla se calentó en viales de vidrio a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 70 min, para la hidrólisis ácida, y a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, para la básica. Ambas se agitaron a 400 rpm, para la homogeneización de las muestras, y en atmósfera de N_2 , según lo descrito por Walsh y colaboradores (2014), y Dai y colaboradores (2014), respectivamente. Tras este proceso las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes obtenidos se diluyeron 60 veces con agua Mili-Q, y se utilizaron para la posterior determinación de los aminoácidos.

En el caso de los aminoácidos libres se utilizó una técnica menos agresiva para evitar restos de aminoácidos estructurales en la muestra. Para ello, 50 mg de muestra se mezclaron con 0,5 ml de perlas de vidrio y 0,5 ml de agua Mili-Q. La mezcla resultante se homogeneizó según el protocolo seguido en el apartado 2.4.2. y el sobrenadante se utilizó para la posterior determinación de los aminoácidos.

2.11.2. Análisis de aminoácidos por GC-MS

La medición de la cantidad de aminoácidos de las diferentes microalgas presentadas en la Tabla 2.1 se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS). Para ello, el primer paso fue llevar a cabo una derivatización, con etanol/etilcloroformiato, de las muestras obtenidas según el procedimiento descrito en el apartado anterior, con el fin de formar N-etoxicarboniletilésteres. Para ello, a 100 μl del extracto diluido de la hidrólisis se le adicionaron 400 μl de una mezcla agua:etanol:piridina (60:32:8) y 40 μl de etilcloroformiato. Tras cada una de estas adiciones se agitó la muestra en el vórtex 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, se extrajeron los derivatizados de los aminoácidos con la adición de 200 μl de

cloroformo (con etilcloroformiato al 1%) y su posterior agitación en el vórtex durante 1 min. Este último paso se realizó por duplicado.

Una parte alícuota de 1 μ l de la fase orgánica obtenida fue inyectada en el cromatógrafo en modo *splitless* a través de un puerto de inyección *split/splitless* del GC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo GCMS-TQ8030 (Shimadzu). Los analitos se separaron en una columna capilar de sílice fundida Agilent HP-5MS (30 mx 0,25 mm i.d.), de 0,25 mm de espesor de película y con el siguiente programa de temperatura del horno: 40 °C (5 min) a 270 °C (20 min), aumentando la temperatura a 5 °C min⁻¹. La línea de transferencia se mantuvo a 280 °C y el gas portador fue helio, con un flujo constante de 1 ml min⁻¹ (velocidad media 36 cm⁻¹); y el espectrómetro de masas fue equipado con una fuente de ionización de electrones (EI) a 70 eV en modo de barrido (75-500 amu). La identificación de los aminoácidos derivatizados se logró comparando los tiempos de retención del cromatógrafo de gases y los espectros de masas con los de los compuestos estándar puros. Todos los espectros de masas también se compararon con la biblioteca del sistema de datos (NIST 11). La cuantificación de los aminoácidos en las muestras se llevó a cabo mediante el método de calibración externa con patrones de aminoácidos.

2.12. Microscopía

Las imágenes de microscopía fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia Leica DM6000B del IBVF, mediante el método diferencial de contraste de interferencia (DIC) utilizando el proyector de fluorescencia TX2 (Excitación 560-40 nm; Dicroico 595 nm; Emisión 645-75 nm). Para ello se utilizó una muestra de 0,1 ml del cultivo de *C. sorokiniana* tras 40 h de cultivo.

2.13. Determinaciones analíticas

2.13.1. Peso seco

El peso seco se determinó utilizando filtros Whatman GF/F (Whatman International Ltd). Para ello se filtró una muestra de 5 ml de cultivo. El filtro con la biomasa se mantuvo 48 h a 100 °C en la estufa, para finalmente enfriarse en un desecador. El peso seco se obtuvo por la diferencia entre el peso final del filtro y su peso antes del filtrado, medido en una balanza analítica.

2.13.2. Acetato

La determinación de acetato se realizó por HPLC (Hitachi LaChrom Elite HPLC), acoplado a un detector de índice de refracción (Hitachi L-2490). La muestra se hizo pasar a través de una columna Sugar-Pak (Waters) utilizando agua Mili-Q a 83 °C como fase móvil y un flujo de 0,5 ml min⁻¹.

2.13.3. Amonio

La determinación del contenido de amonio en el medio de cultivo celular se llevó a cabo con un electrodo selectivo de amonio (Crison Instruments S.A.). Para el ajuste de la fuerza iónica total se utilizó tampón ISA (*Ionic Strength Adjusted*) con una concentración 1 M de MgSO₄. En cada medida se utilizó 1 ml de medio de cultivo, 1 ml de tampón ISA, y se llevó a un volumen final de

10 ml con agua destilada. Con este volumen se realizaron las diferentes medidas con el electrodo a 25 °C.

2.13.4. Lípidos neutros

El contenido de lípidos neutros se cuantificó mediante espectrometría de fluorescencia, usando Rojo de Nilo como fluoróforo, como describieron Chen y colaboradores (2009). Para la medida se utilizó una longitud de onda de excitación de 510 nm y un rango de longitudes de onda de emisión de entre 500 y 800 nm, situándose el máximo de emisión en 535 nm. Se tomó una parte alícuota de 200 µl de cultivo de *C. sorokiniana* y se llevó hasta un volumen final de 2 ml en la cubeta de fluorescencia, añadiendo 100 µl de DMSO y 1,8 ml de tampón PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄). Esta disolución se mantuvo en agitación a 40 °C durante 20 min. A continuación, se procedió a tomar la medida de la fluorescencia basal (blanco). Seguidamente, se adicionaron 10 µl de la disolución de Rojo de Nilo (0,1 mg de Rojo de Nilo en 1 ml de acetona) y se mantuvo 15 minutos en agitación a 40 °C. Pasado ese tiempo, se realizó una nueva medida de fluorescencia. El valor real de fluorescencia, expresado en unidades de fluorescencia (UF), es la diferencia entre la medida final y el blanco. La cuantificación de los lípidos se llevó a cabo mediante el método de calibración externa utilizando trioleína.

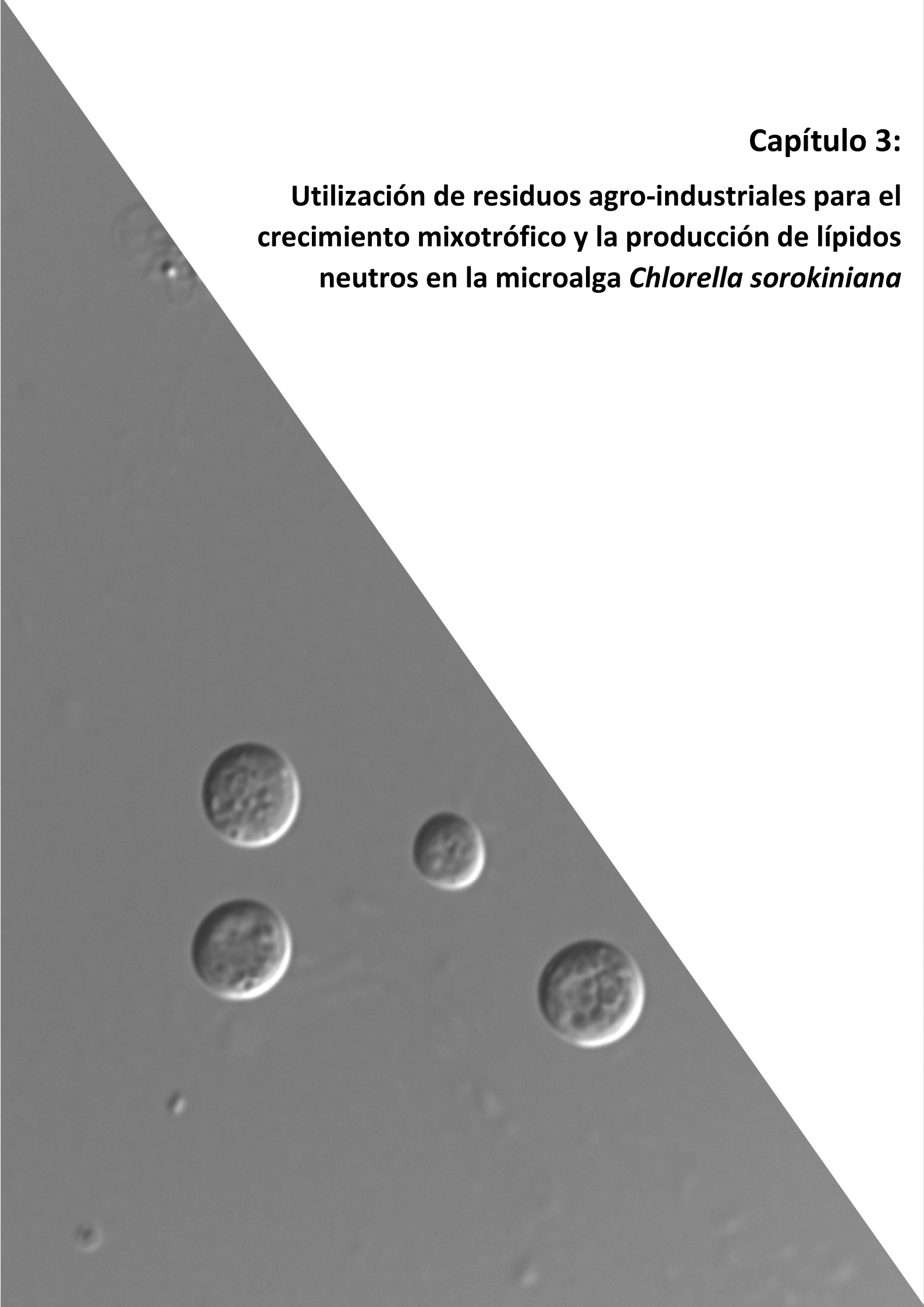
2.14. Análisis estadístico

Para los análisis de ANOVA y multivariantes se utilizó el programa IBM SPSS Statistics, Version 22.0. IBM Corp (Armonk, NY, USA).

Para el análisis de componentes principales (PCA) realizado en el Capítulo 6 se utilizaron componentes formadas por combinaciones lineales de los porcentajes de cada aminoácido a partir de los cálculos realizados por el programa SPSS Statistics.

Capítulo 3:

Utilización de residuos agro-industriales para el crecimiento mixotrófico y la producción de lípidos neutros en la microalga *Chlorella sorokiniana*



Este Capítulo ha sido publicado como:

León-Vaz, A., León, R., Díaz-Santos, E., Vígara, J., Raposo, S. Using agro-industrials wastes for mixotrophic growth and lipids production by the microalga *Chlorella sorokiniana*. *New Biotechnology*. 2019; 51:31-38.

Resumen

Aunque existe un creciente interés en el uso de microalgas para la producción de biocombustibles, los costes de producción aún continúan siendo muy altos para competir con los combustibles fósiles. Una de las principales limitaciones para la producción de microalgas en biorreactores es la disponibilidad de luz, especialmente en condiciones de alta densidad celular. En este Capítulo se estudia el crecimiento de *C. sorokiniana*, una microalga tolerante a condiciones ambientales adversas, bajo diferentes condiciones tróficas y utilizando fuentes de carbono tradicionales como la glucosa o la sacarosa; y fuentes de carbono alternativas, como el extracto de algarroba, el glicerol industrial o los residuos de lías, ricos en acetato, procedentes de la industria vinícola. El crecimiento de esta microalga con residuos de lías permite mitigar los problemas ocasionados por el apantallamiento celular de la luz observados en los cultivos fotoautotróficos, mejorando la tasa de crecimiento específica ($0,052 \text{ h}^{-1}$), y siendo la mejor opción de entre todas las fuentes de carbono. Además, se ha llevado a cabo el cultivo en modo semicontinuo por lotes (*fed-batch*) de *C. sorokiniana* en un reactor STR de 2 L, en las condiciones nutricionales previamente optimizadas de acetato (100 mM) procedente de los residuos de lías, y en amonio (30 mM). En este experimento, se llegó a producir una concentración de 11 g L^{-1} de peso seco de biomasa con un contenido en lípidos neutros del 38% (p/p), por lo que podría considerarse esta estrategia de cultivo como una forma muy efectiva de mejorar la productividad de biomasa y lípidos neutros para esta microalga.

Abstract

In recent years, there has been a growing interest in the use of microalgae for the production of biofuels, but its production cost continues being high to compete with fossil fuel prices. One of the main limitations for photobioreactor productivity is light shielding, especially at high cell densities. The growth of the green microalga *C. sorokiniana*, which is an industrial robust species, has been evaluated under different trophic conditions with traditional carbon sources, such as glucose and sucrose, and alternative low cost carbon sources, such as carob pod extract, industrial glycerol and acetate rich oxidized wine waste lees. The mixotrophic cultivation of this microalga with wine waste lees alleviates the problems of light shielding observed in photoautotrophic cultures, improving the specific growth rate (0.052 h^{-1}) in comparison with the other organic sources. The fed-batch mixotrophic culture of *C. sorokiniana* in a 2 L-STR reactor, with optimized nutritional conditions, 100 mM of acetate coming from the oxidized wine waste lees and 30 mM of ammonium, allowed obtaining an algal biomass concentration of 11 g L^{-1} with a lipid content of 38% (w/w). This fed-batch strategy has been found to be very effective to enhance the biomass and neutral lipid productivity.

3.1. Introducción

Las microalgas son un grupo heterogéneo de microorganismos fotosintéticos ampliamente utilizadas para la producción de compuestos de alto valor añadido, en acuicultura, alimentación humana o animal, o cosméticos, entre otras aplicaciones (Hamed, 2016). Cada año, más de 5000 toneladas de biomasa seca de microalga son producidas y comercializadas por un valor medio de 1,25 billones de euros (Wijffels y Barbosa, 2010). Además, en los últimos años se está produciendo un creciente interés por la producción de lípidos neutros en microalgas para generar biocombustibles (Chisti, 2007; Tan et al. 2016), con menor impacto sobre las emisiones de gases de efecto invernadero. Como consecuencia, se están llevando a cabo un mayor número de investigaciones que persiguen mejorar la eficiencia económica y productiva de los biorreactores (Acien et al. 2012), puesto que los costes de producción, recogida y procesamiento de microalgas para la generación de biocombustibles hacen que estos estén aún lejos de ser competitivos respecto a los combustibles fósiles (Chisti, 2013).

Para hacer frente a este problema, uno de los retos pendientes es el diseño del biorreactor, especialmente en condiciones de alta densidad celular (Cuaresma et al. 2009). Mientras que los niveles de nutrientes pueden ser controlados mediante factores operacionales (tasa de dilución, concentración inicial), la luz efectiva que llega al cultivo sólo puede ser controlada por el diseño del reactor y la disponibilidad de luz externa, la cual puede variar a lo largo del día o de la época del año. Por todo esto, se buscan alternativas donde la dependencia de la luz por parte de las microalgas disminuya, como el cultivo en condiciones heterotróficas, con una fuente de carbono orgánica (Zhao et al. 2014); o mixotróficas, con la utilización de una fuente de carbono externa y luz (Wang, J et al. 2014). De entre estas alternativas, las ventajas del cultivo mixotrófico, que combina aspectos de los cultivos foto- y heterotróficos, lo colocan como una prometedora opción para cultivar microalgas, que son capaces de llevar a cabo al mismo tiempo la asimilación de CO₂ y de fuentes de carbono orgánicas como azúcares (Li et al. 2013; Kumar et al. 2014), acetato (Yeh et al. 2012), o glicerol (Paranjape et al. 2016). Para lograr una producción mixotrófica económicamente viable de microalgas, es necesario encontrar una fuente de carbono de bajo coste, por lo que surge como una opción muy interesante la combinación del cultivo mixotrófico con el uso de residuos industriales, que reduce los costes, aumenta la eficiencia económica del proceso y promueve la economía circular (Ravindran et al. 2016).

Diferentes residuos que sustituyen a las fuentes de carbono tradicionales, tales como extracto de algarroba (Raposo et al. 2017), harina de maíz hidrolizada (Xu et al. 2006), restos de suero de leche (Rodrigues et al. 2016), restos de aguas residuales (Lizzul et al. 2014) o vinagre de manzana (Giovanardi et al. 2012), se han probado de forma exitosa para el cultivo de distintos microorganismos. Además, con el objeto de reducir el precio del biodiesel, se investigan microalgas capaces de generar grandes cantidades de lípidos neutros, junto con la producción simultánea de co-productos de alto valor añadido, para una mayor sostenibilidad económica (Abad y Turon, 2012). Por ello, en este Capítulo se evalúa el crecimiento de la microalga *C. sorokiniana* en diferentes condiciones de cultivo y utilizando residuos industriales, con el fin de establecer un sistema de cultivo semicontinuo capaz de obtener altas concentraciones de biomasa y lípidos neutros.

3.2. Influencia de la luz en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* cultivada bajo diferentes condiciones tróficas

Existe una importante dependencia entre el crecimiento de los cultivos fotoautotróficos y la intensidad luminosa. De hecho, si no existe limitación nutricional y el resto de los parámetros operacionales están optimizados, la tasa de crecimiento específica de estos cultivos suele ser directamente proporcional a la intensidad de luz, hasta un valor de saturación (León y Galván, 1999). Esta dependencia se produce debido al efecto de apantallamiento entre las células, que provoca que las más alejadas de la pared del reactor tengan más dificultades de realizar la fotosíntesis. Así, el diseño del fotobiorreactor cobra una gran importancia ya que se debe asegurar una adecuada distribución de la luz. Se puede concluir entonces que la luz es uno de los parámetros más difíciles de controlar a la hora de escalar los cultivos, puesto que no solo depende de su intensidad, sino también del diámetro del reactor y de la densidad celular de los cultivos. Por todo esto se ha llevado a cabo un estudio sobre apantallamiento celular en cultivos de *C. sorokiniana*, así como una comparativa del efecto que provoca la luz efectiva entre los cultivos foto- y mixotróficos de esta microalga.

Para evaluar el efecto del apantallamiento celular en diferentes puntos del fotobiorreactor, se prepararon cultivos de *C. sorokiniana* con una densidad celular conocida, cuyo rango iba de 0,1 a 2,0 g L⁻¹ de peso seco y se realizaron dos aproximaciones: en primer lugar, los cultivos fueron expuestos a una intensidad de luz fija de 850 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se midió la intensidad de luz efectiva a diferentes distancias (Figura 3.1A); y en segundo lugar, los cultivos fueron expuestos a una intensidad de luz variable, de entre 200 y 1200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la superficie del cultivo, y se tomaron medidas de la intensidad de luz efectiva a una distancia de 3,5 cm de la superficie (Figura 3.1B).

Como muestra la Figura 3.1A, para una densidad celular de 1 g L⁻¹, a 2 cm de la superficie, la intensidad de luz efectiva se redujo un 90%, por lo que el efecto de apantallamiento celular parece ser muy alto en cultivos de *C. sorokiniana*. Por otra parte, el incremento de la intensidad de luz en la superficie del reactor causó, en general, un incremento de la intensidad de luz efectiva (Figura 3.1B). Sin embargo, para cultivos de alta densidad celular, la luz efectiva a pocos centímetros de la pared del reactor continuó siendo demasiado baja ya que, en el caso de densidades superiores a 1 g L⁻¹, el incremento de la intensidad de luz de 200 a 1200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sólo provocó un incremento de la intensidad de luz efectiva de 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 3,5 cm de la pared del reactor, disminuyendo hasta una variación de sólo 11 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el caso de cultivos con una densidad celular de 2 g L⁻¹ de peso seco (Figura 3.1B). Esto indica que más del 99% de la luz que incide en la superficie del reactor es absorbida por el efecto pantalla que provocan las células más cercanas a las paredes del reactor.

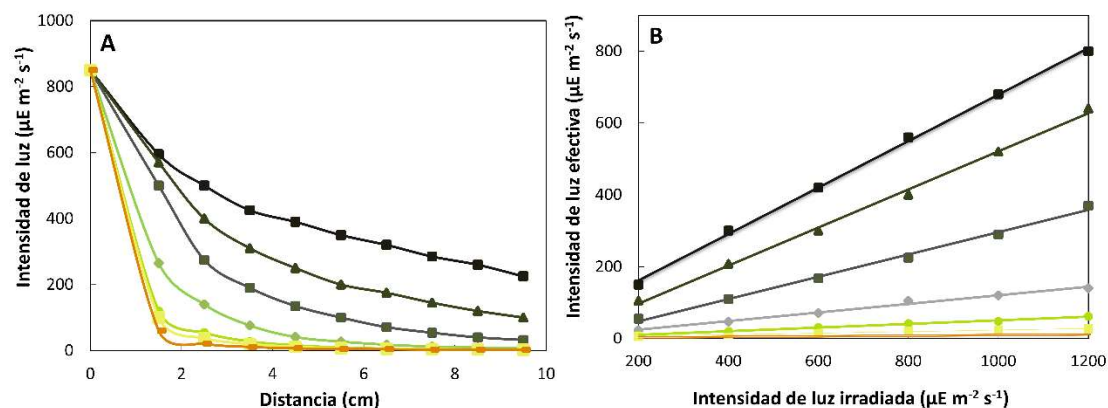


Figura 3.1. Influencia de la densidad celular en el apantallamiento producido en cultivos de *C. sorokiniana*. La intensidad de luz efectiva fue medida a diferentes distancias manteniendo una intensidad de partida de $850 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) y a una distancia fija de 3,5 cm de la superficie, variando la intensidad de luz irradiada (B). En ambos casos los cultivos de *C. sorokiniana* tuvieron una densidad celular de 0,1 (\square), 0,2 (Δ), 0,3 (\times), 0,7 (\diamond), 1,0 (\circ), 1,3 ($-$) y 2 () g L^{-1} de peso seco.

Estas dificultades a la hora de obtener cultivos de alta densidad celular debido al apantallamiento han sido descritas para diferentes especies de microalgas (Lohman et al. 2015). Aunque una agitación eficiente puede garantizar que todas las células se encuentren de forma momentánea en la superficie del reactor recibiendo una alta intensidad de luz, no es suficiente para compensar el apantallamiento que se produce en el reactor. Además, un exceso de intensidad de luz o de agitación puede llegar a inhibir el crecimiento celular, del mismo modo que aumentaría los costes de producción (Gris et al. 2013), por lo que incrementar la intensidad de luz en la superficie del reactor o la agitación de forma indiscriminada no es una solución para superar los problemas generados por el apantallamiento celular.

En este punto surge la idea de que el cultivo mixotrófico pueda ser un cultivo menos dependiente de la fotosíntesis que el fotoautotrófico, por lo que cabría esperar que su productividad sea mayor con la misma disponibilidad de luz. Para confirmar esta hipótesis, se cultivó la microalga *C. sorokiniana* en condiciones fotoautotróficas (CO_2 + luz) y mixotróficas (ácido acético + luz) en botes cilíndricos de 1,25, 2,5, 5 y 9 cm de radio con una concentración inicial de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de peso seco (Figura 3.2 y Tabla 3.1). La tasa específica de crecimiento y el tiempo de generación se calcularon a través de los datos tomados en la fase exponencial, según se describe en el Capítulo 2.

Tal y como era de esperar, la productividad de los cultivos disminuyó al aumentar el radio de los recipientes y, además, la reducción de la tasa de crecimiento fue mucho menos acentuada en el caso de los cultivos mixotróficos. Como muestra la Figura 3.2, los cultivos fotoautotróficos tuvieron una pendiente de $2,40 \text{ h cm}^{-1}$; mientras que la pendiente de los cultivos mixotróficos fue de $1,12 \text{ h cm}^{-1}$, siendo la pendiente de los cultivos mixotróficos menos de la mitad de la observada en condiciones fotoautotróficas. Con estos datos se podría concluir que el efecto de apantallamiento celular es mucho menor en el caso de cultivos mixotróficos, y esta diferencia se acentúa a medida que aumentamos el tamaño del recipiente.

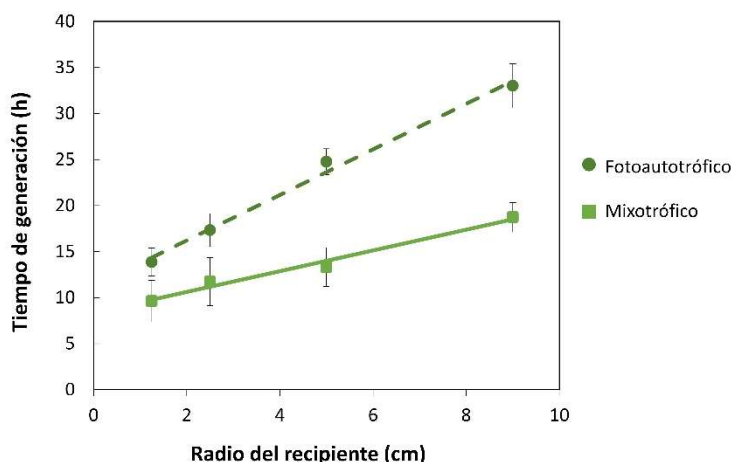


Figura 3.2. Influencia del diámetro del recipiente en el tiempo de generación de *C. sorokiniana*. Las medidas se tomaron sobre diferentes recipientes cultivados según lo descrito en el Capítulo 2. Para este experimento se utilizó CO₂ (3% v/v) como fuente de carbono del cultivo fotoautotrófico y ácido acético (16 mM) como fuente de carbono para el cultivo mixotrófico

Es importante resaltar también que los cultivos mixotróficos tuvieron, en todos los casos, una mayor tasa específica de crecimiento y una mayor concentración de biomasa final que los cultivos fotoautotróficos. Estos valores quedan recogidos en la Tabla 3.1, donde también se incluyen los datos de un cultivo en condiciones heterotróficas, cultivado de la misma forma que los mixotróficos, pero en ausencia de luz. Comparando los 3 tipos de cultivo, el cultivo mixotrófico presenta una tasa específica de crecimiento de más del doble que el cultivo fotoautotrófico y mayor que el heterotrófico (Tabla 3.1). Las diferencias entre cultivos fotoautotróficos y mixotróficos, que fueron mayores a medida que aumentó el tamaño del recipiente (Figura 3.2), confirman que la dependencia de la luz es mucho menor en los cultivos mixotróficos que, como se ha dicho previamente, combinan ventajas de los cultivos fotoautotróficos y heterotróficos. Además, en los cultivos mixotróficos, tanto la fuente de carbono externa, como el CO₂ generado endógenamente por la respiración, son metabolizados, contribuyendo a aumentar la productividad y a disminuir su dependencia de la luz.

Tabla 3.1. Biomasa máxima producida y tasa de crecimiento específica de la microalga *C. sorokiniana* cultivada en diferentes condiciones tróficas.

	Radio del biorreactor (cm)	Tasa de crecimiento específica (h ⁻¹)	Biomasa máxima (g L ⁻¹)
Mixotrófico	1,25	0,072	1,32
	2,50	0,059	1,47
	5,00	0,052	1,28
	9,00	0,037	1,08
Fotoautotrófico	1,25	0,050	1,16
	2,50	0,040	1,18
	5,00	0,028	0,66
	9,00	0,021	0,39
Heterotrófico	4,00	0,034	0,77

El valor de μ se calculó durante la fase exponencial de los cultivos y la biomasa máxima a las 48h de cultivo.

Otros estudios han reportado resultados similares al comparar la forma de cultivo foto- y mixotrófica en diferentes microalgas del género *Chlorella*, tales como *C. vulgaris* (Abreu et al. 2012), *C. protothecoides* (Wang et al. 2013); así como en otros estudios con *C. sorokiniana* usando otras fuentes de carbono (Kim et al. 2013; Wang et al. 2016b). Todas estas investigaciones concluyen, que la tasa de crecimiento específica en condiciones mixotróficas es mucho mayor para este tipo de microalgas que en condiciones exclusivamente fotosintéticas. Además, Kim y colaboradores (2013) determinaron que la concentración de carbono inorgánico disuelto en el medio de cultivo disminuye en condiciones fotoautotróficas, aumenta en condiciones heterotróficas y se mantiene constante en condiciones mixotróficas, lo que indicaría que el CO₂ generado durante el proceso de respiración puede ser reasimilado por medio de la fotosíntesis en *C. sorokiniana*.

3.3. Utilización de diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo

La elección de una fuente de carbono adecuada es esencial para el óptimo desarrollo del cultivo mixotrófico. Debido a esto, se evaluaron diferentes fuentes de carbono, con una concentración inicial de 20 g L⁻¹, para comprobar las preferencias de *C. sorokiniana* en términos de productividad de biomasa. Estas fuentes fueron: glucosa, sacarosa, urea, glicerol industrial, extracto de algarroba (Lima-Costa et al. 2012) y residuos de lías de vino oxidadas. También se utilizó un cultivo control con el mismo medio de cultivo, siendo la única fuente de carbono el CO₂ obtenido mediante la agitación, y llevándose a cabo los experimentos en matraces Erlenmeyer de 250 ml (4 cm de radio).

La Figura 3.3 muestra que *C. sorokiniana* puede usar glucosa, sacarosa o glicerol como fuente de carbono obteniendo un alto rendimiento, aunque no mejor que con acetato. Sin embargo, los residuos de lías oxidadas provocaron una mayor tasa de crecimiento que concentraciones equivalentes de acetato, demostrando ser la mejor fuente de carbono orgánica para *C. sorokiniana*. Finalmente, el crecimiento con extracto de algarroba fue levemente superior al control, pero estuvo por debajo del resto de las fuentes de carbono (Figura 3.3; Tabla 3.2). Este último resultado era esperable debido a que el extracto de algarroba posee una concentración del 26% de glucosa y del 56% de sacarosa (p/p), que es una concentración de azúcares totales menor que la utilizada en los ensayos con glucosa o la sacarosa comercial. Además, los resultados con extracto de algarroba muestran que, de acuerdo con Pérez-García y colaboradores (2011), ante la presencia de un sustrato que contiene más de un tipo de azúcar, las microalgas tienden a asimilar el de mayor afinidad, en este caso la glucosa, que es el azúcar menos abundante en el extracto de algarroba.

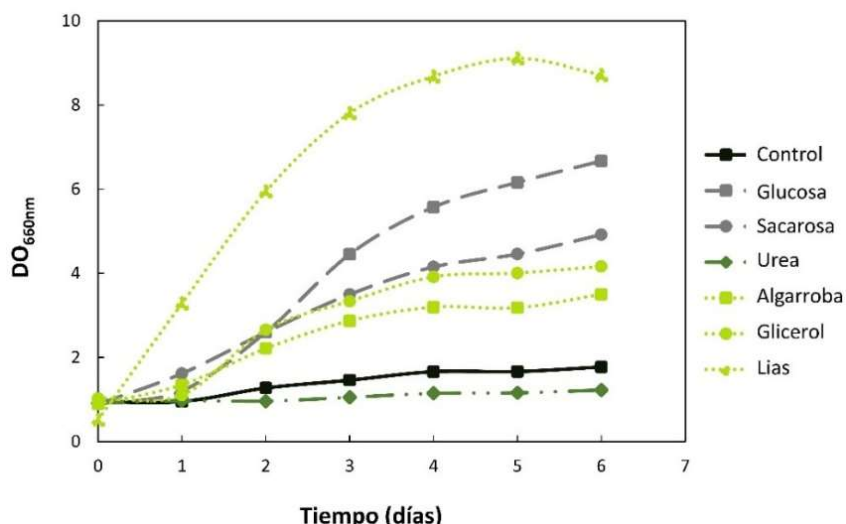


Figura 3.3. Curva de crecimiento de la microalga *C. sorokiniana* cultivada con diferentes fuentes de carbono. Para los cultivos se utilizó una concentración inicial de 20 g L⁻¹ de la fuente de carbono. Las fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa, sacarosa, urea, extracto de algarroba (algarroba), glicerol industrial (glicerol) y residuos de lías oxidadas (lías). Se utilizó también un control sin fuente de carbono.

Tabla 3.2. Tasa de crecimiento específica de *C. sorokiniana* cultivada con diferentes fuentes de carbono.

	Control	Gluc	Sac	Algarroba	Glicerol	Lías
μ (h ⁻¹)	0,005	0,027	0,016	0,011	0,016	0,036

Los cultivos se llevaron a cabo añadiendo una concentración de 20 g L⁻¹ de las fuentes de carbono: glucosa (Gluc), sacarosa (Sac), extracto de algarroba (Algarroba), glicerol industrial (Glicerol) y residuos de lías oxidadas (Lías). También se añadió un control sin fuente de carbono.

A partir de los resultados de la Figura 3.3 y la Tabla 3.2 se seleccionaron los residuos de lías oxidados como fuente de carbono para el crecimiento mixotrófico de *C. sorokiniana*, ya que se obtuvo la mayor tasa de crecimiento específica (0,036 h⁻¹), 7 veces mayor que la del cultivo control. Además, esta fuente de carbono posee otras ventajas como ser de bajo coste o tener una menor susceptibilidad de contaminación microbológica que otras, como la glucosa o la sacarosa. A parte de los residuos de lías oxidados, otros residuos industriales podrían explorarse como fuentes ricas en acetato de origen industrial, así, los efluentes de la industria textil o los residuos de digestiones anaeróbicas pueden ser alternativas prometedoras (Rodríguez et al. 2016).

3.4. Optimización de las concentraciones iniciales de acetato (lías oxidadas) y amonio para *Chlorella sorokiniana*

C. sorokiniana se cultivó en medio TAP con concentraciones crecientes de residuos de lías, ajustadas para que tuvieran una concentración inicial de entre 16 y 100 mM de acetato (Figura 3.4). Para el experimento se tomaron muestras cada 24 h con el fin de determinar el peso seco y la concentración de acetato en el medio. Los resultados mostraron que al incrementar la concentración de acetato en el medio se produjo un aumento de la biomasa final hasta una concentración de 80 mM de acetato (94 ml L⁻¹ de lías), concentración a la que parece haber una saturación del crecimiento (Figura 3.4A). No obstante, *C. sorokiniana* no empezó a mostrar una

inhibición en su crecimiento hasta concentraciones superiores a 300 mM de acetato (360 ml L⁻¹ de lias).

Además del peso seco, también se determinó la concentración de acetato en el medio de cultivo. Los resultados, que aparecen en la Figura 3.4B, mostraron que el acetato del medio de cultivo, procedente de las lias, sólo se consumió totalmente en los cultivos que tenían una concentración inicial de 16 mM. También se puede observar que hay una alta velocidad de consumo durante las primeras 72 h de crecimiento (Figura 3.4B), como se deduce de la pendiente inicial de la cinética de consumo, que aumenta ligeramente con la concentración de acetato, desde 0,315 hasta 0,544 mM h⁻¹. Sin embargo, hay un descenso marcado de la velocidad de consumo a partir de 72 h, a pesar de la disponibilidad de acetato en el medio, lo que podría indicar la limitación de otro nutriente en esas condiciones.

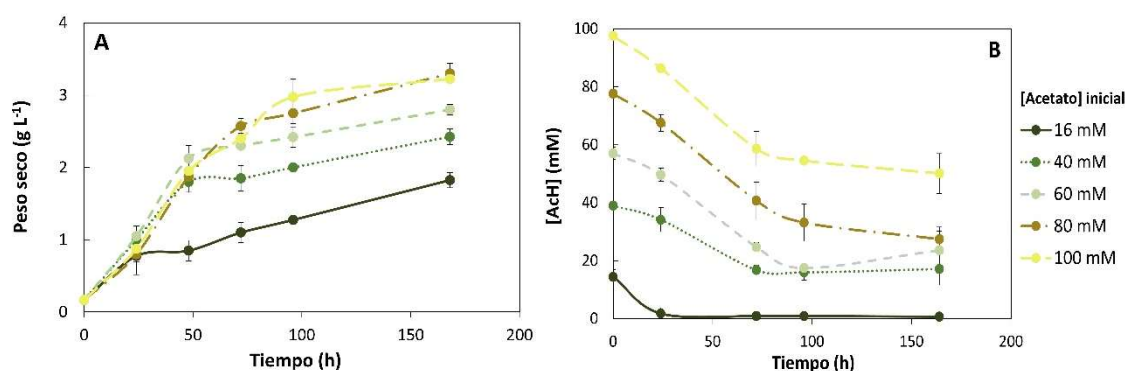


Figura 3.4. Curva de crecimiento (A) y consumo de acetato (B) de *C. sorokiniana* cultivada en condiciones mixotróficas con concentraciones iniciales crecientes de acetato. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en el Capítulo 2, utilizando una concentración inicial de 8 mM de amonio y de entre 16 y 100 mM de acetato procedente de los residuos de lias.

La alta concentración en fosfato del medio de cultivo, unido al alto contenido en sulfatos y sulfitos de los residuos de lias apuntarían al nitrógeno como elemento limitante en estas condiciones. Para comprobar este hecho, se midió el crecimiento y el consumo de amonio de la microalga con una concentración inicial fija de 100 mM de acetato y concentraciones crecientes de cloruro de amonio, desde 8 mM (concentración del medio TAP) hasta 100 mM, midiéndose su crecimiento y su consumo (Figura 3.5). La mayor cantidad de biomasa se obtuvo con concentraciones entre 20 y 30 mM de amonio. Para concentraciones de 50 mM o superiores hubo una importante inhibición del crecimiento (Figura 3.5A). Estos datos están de acuerdo con estudios previos en otras microalgas, que experimentaban una importante inhibición de su crecimiento con concentraciones altas de amonio en el medio (Markou et al. 2016). La Figura 3.5B nos muestra también que, para concentraciones inferiores a 30 mM, el amonio en el medio de cultivo después de 48 h era casi indetectable, lo que confirma que en los ensayos previos había un déficit de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, que limitaría el crecimiento celular.

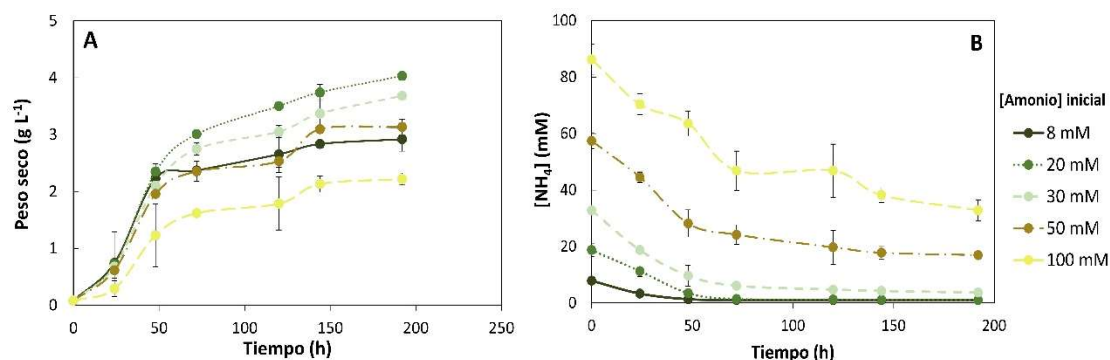


Figura 3.5. Curva de crecimiento (A) y consumo de amonio (B) de *C. sorokiniana* cultivada en condiciones mixotróficas con concentraciones crecientes de amonio. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en el Capítulo 2, utilizando una concentración inicial de 100 mM de acetato y de entre 8 y 100 mM de amonio.

El incremento de la concentración de amonio en el medio permitió un aumento de la biomasa desde $2,8 \text{ g L}^{-1}$ de peso seco en 4 días, con una concentración inicial de amonio de 8 mM; a 4 g L^{-1} de peso seco en el mismo tiempo con 20 mM de amonio (Figura 3.5A). Además, incrementando la concentración de amonio se consiguió casi 3 veces más biomasa que en el cultivo control (16 mM de acetato y 8 mM de amonio), cuyo peso seco era de $1,4 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 3.4A). Debido a estos resultados, los siguientes experimentos con la microalga *C. sorokiniana* se realizaron cultivándola con concentraciones de acetato (lías oxidadas) y amonio de 100 y 30 mM, respectivamente.

3.5. Influencia de la concentración de acetato (lías oxidadas) en la productividad de lípidos

Para estudiar la influencia del acetato en el proceso de acumulación de lípidos neutros, se cultivó *C. sorokiniana* en presencia de lías oxidadas como fuente de carbono (100 mM de acetato) y con amonio 30 mM. En mitad de la fase exponencial, se recogieron los cultivos y se llevaron a un medio carente de fuente de nitrógeno, con concentraciones iniciales de acetato (lías oxidadas) de 16, 50 y 100 mM. Se tomaron muestras de estos cultivos cada 24 h para determinar el contenido de lípidos neutros totales, mediante espectrometría de fluorescencia usando Rojo de Nilo como fluoróforo (Figura 3.6). Los resultados confirmaron que *C. sorokiniana* posee una gran capacidad para acumular lípidos neutros bajo carencia de N, tanto en valores de concentración lipídica (Figura 3.6A), como en valores de porcentaje de peso seco (Figura 3.6B).

El incremento de la concentración de acetato hasta 100 mM permitió que *C. sorokiniana* fuera capaz de acumular concentraciones de lípidos de hasta $0,94 \text{ g L}^{-1}$ y sobre el 40% del total de peso seco, lo que es 6 veces los valores de concentración y 3 veces los valores de peso seco obtenidos en condiciones estándar del medio de cultivo (16 mM de acetato). Estos resultados, unidos con el aumento de biomasa al aumentar la concentración de acetato (Figura 3.4), indican que el crecimiento mixotrófico de *C. sorokiniana*, utilizando los residuos de lías de vino oxidadas como fuente de carbono, puede generar un alto contenido en lípidos neutros ($0,39 \text{ g}$ de lípidos por g de peso seco), lo que aumenta el potencial biotecnológico del proceso.

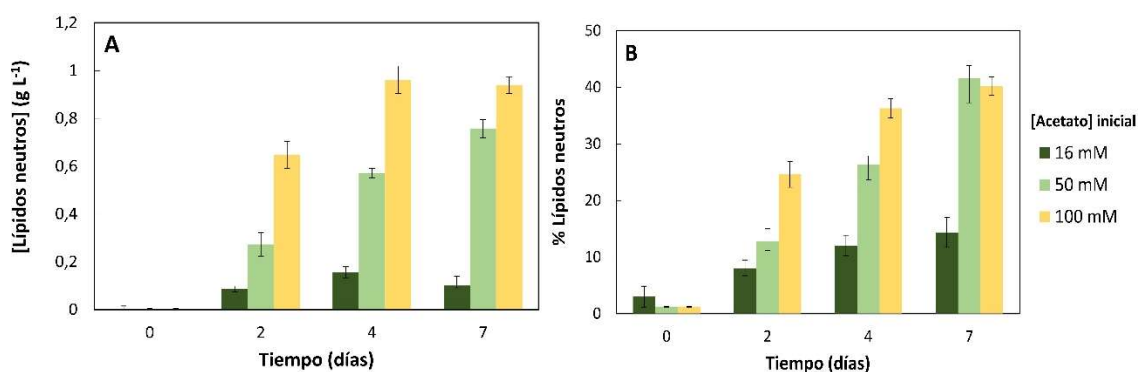


Figura 3.6. Concentración de lípidos neutros (A) y porcentaje de lípidos en el peso seco (B) en *C. sorokiniana* cultivada en ausencia de nitrógeno con concentraciones crecientes de acetato. Las condiciones de cultivo son las descritas en el Capítulo 2, sin la adición de fuente de N y con concentraciones de acetato de 16, 50 y 100 mM.

Todos estos datos concuerdan con los reportados previamente sobre el efecto de otras fuentes de carbono, como glucosa (Li et al. 2014), carbonato (Lohman et al. 2015), o glicerol (Paranjape et al. 2016) sobre la productividad de lípidos en *C. sorokiniana*. Cabe resaltar también que se ha descrito que el acetato puede actuar como promotor de la producción de lípidos en *C. sorokiniana* cuando es cultivada simultáneamente con otra fuente de carbono, como la glucosa (Kumar et al. 2014).

3.6. Desarrollo del cultivo *fed-batch* como estrategia para mejorar la productividad de biomasa y lípidos en *Chlorella sorokiniana* utilizando lias como fuente de carbono

El cultivo en *fed-batch* de *C. sorokiniana* se llevó a cabo en un reactor STR de 2 L. Para ello se diferenciaron dos fases: una primera fase de 3 ciclos (0-72 h, 72-144 h, 144-216 h) para la producción de biomasa con adiciones periódicas de los residuos de lias y cloruro de amonio; seguida de una segunda fase de 2 ciclos (216-288 h, 288-360 h) en la que se indujo la producción de lípidos y donde el medio fresco adicionado sólo contenía los residuos de lias (Figura 3.7). El total de biomasa producida y la tasa de crecimiento específica se determinaron en cada adición (Tabla 3.3) y la comparación de estos valores con los obtenidos en las Tablas 3.1 y 3.2 nos muestra que la biomasa total producida en el reactor fue significativamente superior a la obtenida en otros recipientes a menor escala, tanto en condiciones mixotróficas, como fotoautotróficas o heterotróficas.

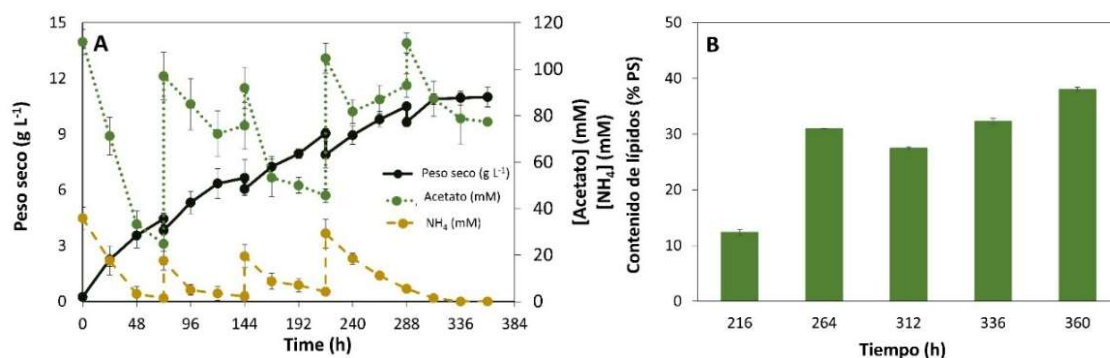


Figura 3.7. Evolución del peso seco, consumo de acetato y amonio (A) y contenido de lípidos neutros (% PS); (B) de *C. sorokiniana* cultivada en un reactor 2L-STR. Las condiciones de cultivo fueron las determinadas en el Capítulo 2 para el reactor 2L-STR en condiciones mixotróficas, con una concentración de 100 mM de acetato procedente de los residuos de lías y 30 mM de amonio. Se realizaron adiciones periódicas de residuos de lías y amonio (72, 144 y 216 h) o de residuos de lías (288 h) con el fin de recuperar las concentraciones iniciales de estos compuestos.

La tasa de crecimiento específica obtenida en el reactor durante las primeras 72 h fue algo mayor (0,055 h⁻¹) que la obtenida en un matraz con un diámetro equivalente (0,052 h⁻¹), tal y como muestra la Tabla 3.1, debido posiblemente a la mayor velocidad y eficiencia de la agitación del reactor. En este primer ciclo hay un alto consumo de acetato y un consumo casi total de amonio (Figura 3.7A). Sin embargo, los valores de crecimiento y consumo de acetato y amonio van disminuyendo en los siguientes ciclos (Figura 3.7A; Tabla 3.3). La tasa de crecimiento específica observada en el reactor durante todo el proceso fue de 0,039 h⁻¹; no obstante, la biomasa total producida en el reactor fue 10 veces superior a la obtenida en los matraces con un diámetro equivalente al diámetro del STR, incrementándose de 1,28 a 11,0 g L⁻¹. La ratio C:N:P en el cultivo del reactor fue de 33:12:1, considerando como C total sólo el aportado por el acetato. Aunque la concentración de acetato que aportan los residuos de lías fue menor que la recomendada según la ratio de Redfield (106:16:1) para microalgas (Hillebrand y Sommer 1999), existe un aporte extra de CO₂ proveniente de la aireación y de la respiración celular, el cual podría ayudar en el incremento de la productividad del sistema.

Tabla 3.3. Tasa de crecimiento específica y biomasa máxima producida en el cultivo *fed-batch* del biorreactor STR.

Tiempo (h)	0 - 360	0 - 72	72 - 144	144 - 216	216 - 288	288 - 360
μ (h ⁻¹)	0,039	0,055	0,011	0,005	0,004	0,002
ΔX (g L ⁻¹)	10,75	4,20	2,83	3,00	2,60	1,35

μ : tasa de crecimiento específica; ΔX : biomasa máxima obtenida en cada ciclo, calculada como la diferencia entre el valor final y el inicial.

En la segunda fase de cultivo fue donde tuvo lugar la producción de lípidos y la desaceleración de los valores de crecimiento, debido a la menor disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo (Figura 3.7B; Tabla 3.3). El contenido de lípidos fue determinado a partir de las 216 h de cultivo, tiempo en el que se realizó la última adición de nitrógeno. La toma de muestra se realizó de forma repetida a partir del final del cuarto ciclo, donde el consumo de la fuente de nitrógeno fue casi total. Durante estos dos últimos ciclos, el contenido de lípidos neutros creció hasta alcanzar el 38% del total de peso seco (Figura 3.7B) al final del quinto ciclo. La productividad de lípidos obtenida en este trabajo (193,37 mg L⁻¹ día⁻¹; Tabla 3.4) fue mayor que la que se obtuvo en estudios previos con *C. sorokiniana* utilizando glucosa o acetato de sodio como fuente de

carbono (Kumar et al. 2014; Zheng et al. 2017); o con otras especies de microalgas cultivadas de forma mixotrófica (Lin, W et al. 2017).

Tabla 3.4. Parámetros cinéticos del crecimiento de *C. sorokiniana* en el reactor 2L-STR utilizando el método *fed-batch*.

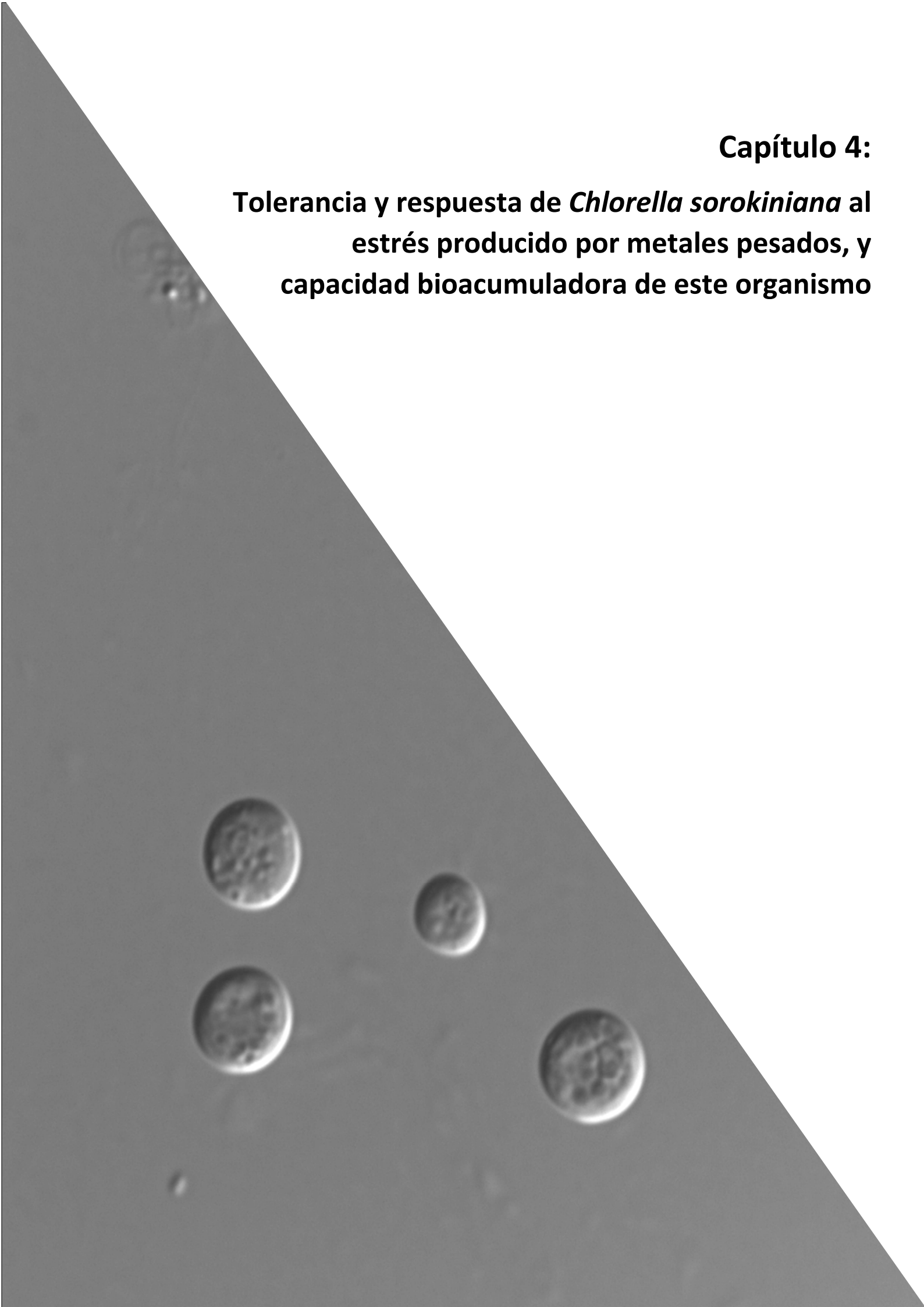
μ (h ⁻¹)	X _{max} (g L ⁻¹)	Prod _x (g L ⁻¹ day ⁻¹)	L _N (g L ⁻¹)	Y _{L/x} (g g ⁻¹)	Prod _L (mg L ⁻¹ day ⁻¹)
0,039	11,00	1,39	1,16	0,38	193,37

μ : tasa específica de crecimiento, calculada con el software DMFIT; X_{max}: biomasa máxima; Prod_x: productividad de biomasa; L_N: lípidos neutros; Y_{L/x}: contenido de lípidos; Prod_L: productividad de lípidos.

La acumulación de lípidos neutros en sistemas *fed-batch* con glucosa o acetato de sodio como fuente de carbono ha sido recientemente descrita para la microalga *C. sorokiniana* (Kumar et al. 2016) u otras microalgas (Wang et al. 2016b). Al igual que en los estudios presentados con los residuos de lías, esos autores también describen una mayor producción de lípidos en condiciones mixotróficas, y corroboran que una mayor disponibilidad de acetato da lugar a una mayor productividad de lípidos, puesto que el acetato se transforma fácilmente en acetyl CoA (Muthuraj et al. 2013), la molécula precursora para la síntesis de lípidos. Además, a pesar de que *C. sorokiniana* ha sido cultivada para la producción de lípidos neutros con diferentes tipos de residuos industriales (Lizzul et al. 2014; Riaño et al. 2016), estos estudios no han llegado a obtener una concentración de biomasa tan alta como la obtenida en el presente trabajo, en el que se utilizan residuos de lías como fuente de carbono para el crecimiento celular de *C. sorokiniana*.

Capítulo 4:

Tolerancia y respuesta de *Chlorella sorokiniana* al estrés producido por metales pesados, y capacidad bioacumuladora de este organismo



Parte de este Capítulo ha sido publicado como:

León-Vaz, A., Romero, LC., Gotor, C., León, R., Vígara, J. Effect of cadmium in the microalga *Chlorella sorokiniana*: A proteomic study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021; 207:111301.

León-Vaz, A., Romero, LC., Gotor, C., León, R., Vígara, J. Dataset for proteomic analysis of *Chlorella sorokiniana* cells under cadmium stress. *Data in Brief*. 2020; 33:106544.

Resumen

Los metales pesados son uno de los elementos más peligrosos existentes en el medioambiente y su presencia, principalmente debido a actividades humanas, puede alterar los ecosistemas acuáticos, afectando tanto a los organismos que los ocupan, como al medio en el que viven. De hecho, la conservación y descontaminación de los ecosistemas acuáticos es uno de los retos más importantes en la actualidad. En este Capítulo, se ha estudiado el potencial uso de la microalga *Chlorella sorokiniana* como elemento biorremediador. Para ello, esta microalga se ha cultivado con diferentes concentraciones de Cu^{+2} , Cd^{+2} , As (III) y As (V), y se ha estudiado su efecto sobre el crecimiento y la asimilación de N. La determinación de la concentración intracelular de estos metales pesados o metaloides ha revelado que *Chlorella sorokiniana* muestra una gran tolerancia a los metales pesados y es capaz de acumular grandes concentraciones intracelulares de Cd. También, se ha llevado a cabo un estudio del efecto del Cd, tanto a nivel de expresión génica, como a nivel de actividad enzimática, sobre diferentes enzimas antioxidantes, como son la ascorbato peroxidasa (APX) o la catalasa (CAT); y de otras enzimas implicadas en el metabolismo del N y del S, tales como la glutamina sintasa (GS), la glutamato deshidrogenasa (GDH), la NAD-isocitrato deshidrogenasa (NAD-IDH) o la O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL). Todas las enzimas estudiadas, mostraron diferentes grados de inducción en presencia de metales pesados, excepto la GS que resultó ser reprimida por Cd. Finalmente, mediante SWATH-MS (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra*), se ha observado que la exposición de *C. sorokiniana* a una concentración de 250 μM de Cd^{2+} durante 40 h, causa una represión en la expresión de proteínas de diferentes rutas metabólicas, tales como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la glucólisis, el ciclo de Krebs o la biosíntesis de proteínas ribosomales. No obstante, otras rutas como la fotorrespiración, las enzimas antioxidantes, la gluconeogénesis, el catabolismo del almidón o la biosíntesis de glutamato, cisteína, serina y glicina se vieron inducidas en estas condiciones, así como también se vieron alteradas la ruta de síntesis de lípidos y caroteoides. La alta tolerancia de *C. sorokiniana* al Cd y su alta capacidad para la acumulación de este metal apuntan a la posible utilización de esta microalga en procesos de biorremediación.

Abstract

Heavy metals are among the most hazardous materials for the environment and their presence, mainly caused by human activity, is able to alter aquatic ecosystems, both organisms and biocenosis. The preservation and decontamination of these environments is, nowadays, one of the most important challenges. In this chapter, the chlorophyte microalga *Chlorella sorokiniana* was tested as a potential bioremediator for heavy metals. This microalga was cultured with different concentrations of Cu^{+2} , Cd^{+2} , As (III) and As (V), and their growth and N consumption was studied. The intracellular heavy metals concentration revealed that *Chlorella sorokiniana* shows high tolerance the heavy metals and is an outstanding Cd accumulator organism. Furthermore, different antioxidant enzymes, such as ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), and enzymes involved in N and S metabolism, such as glutamine syntethase (GS), glutamate dehydrogenase (GDH), NAD-isocitrate dehydrogenase (NAD-IDH) and O-acetylserine (thiol)-lyase (OASTL) were studied both at gene expression and enzymatic activity levels. These enzymes exhibited different grades of upregulation in most of them, excepting GS, which showed a downregulation when *Chlorella sorokiniana* was cultured with heavy metals. Additionally, using the sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra mass spectrometry (SWATH-MS), we concluded that exposure of *C. sorokiniana* to 250 μM Cd^{2+}

for 40 h caused downregulation of different metabolic pathways, such as photosynthesis and oxidative phosphorylation, glycolysis, TCA cycle and ribosomal proteins biosynthesis. However, photorespiration, antioxidant enzymes, gluconeogenesis, starch catabolism and biosynthesis of glutamate, cysteine, glycine and serine were upregulated, under the same conditions. Finally, exposure to Cd also led to changes in the metabolism of carotenoids and lipids. The high tolerance of *C. sorokiniana* to Cd and its high accumulation capacity points to this microalga as a potential microorganism to be used in bioremediation processes.

4.1. Introducción

Los metales pesados son unos de los principales contaminantes debido a su persistencia en el ecosistema y a los efectos adversos que causan en la cadena trófica o la salud humana. La creciente industrialización, así como otras actividades humanas generan una alta cantidad de compuestos tóxicos, entre ellos metales pesados, en suelos y aguas, lo que da lugar a cambios en los ciclos biogeoquímicos y alteraciones del medio ambiente (Shahid et al. 2020). Este problema se acrecienta en ecosistemas acuáticos, donde, en la mayoría de los casos, van a parar los residuos de actividades urbanas e industriales (Jain y Das, 2017), siendo las actividades mineras el principal foco de contaminación por metales pesados (Ouyang et al. 2018). La acumulación de metales pesados en microorganismos que forman parte de la base de la cadena trófica puede provocar también procesos de biomagnificación, lo que daría lugar a graves daños en el ecosistema (Newton y McClary, 2019).

Para la remediación eficiente de la contaminación por metales pesados se han investigado diferentes métodos químicos, como pueden ser la precipitación química, el intercambio iónico, la floculación o la filtración mediante membranas (Fu y Wang, 2011). Por otra parte, estudios recientes han mostrado el potencial de bacterias y microalgas para retirar metales pesados de ecosistemas acuáticos (Hu et al. 2018; Li, H et al. 2020). Entre todos los organismos, las microalgas destacan, debido a su tolerancia y a su alta capacidad de acumular metales pesados. Además, aunque estas sustancias puedan alterar el metabolismo o la velocidad de crecimiento de las microalgas, éstas pueden crecer en medios con altas concentraciones de metales pesados de forma económicamente eficiente y medioambientalmente segura (Shahid et al. 2020). Por todo esto, las microalgas pueden ser consideradas como una alternativa prometedora para la aplicación de procesos de biorremediación de ecosistemas acuáticos. Asimismo, resulta de gran interés el estudio del impacto que pueden causar los metales pesados en el metabolismo de las algas.

Los organismos fotosintéticos han desarrollado diferentes respuestas con el objetivo de mitigar el estrés producido por los metales. Así, las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por este tipo de estrés son eliminadas por diversos sistemas antioxidantes que se clasifican en enzimáticos, como el ciclo del ascorbato-glutatión y la enzima catalasa; y no enzimáticos, donde destacan moléculas como el glutatión (GSH), el ácido ascórbico, o las fitoquelatinas (PCs), éstas últimas encargadas de secuestrar los cationes de los metales pesados para transportarlos a las vacuolas (Gill y Tuteja, 2010). Ambas respuestas pueden funcionar de forma coordinada como elementos mitigadores de estrés con el fin de evitar problemas en el desarrollo del organismo, daños en el ADN o interferencias en el metabolismo celular (Gutsch et al. 2018).

C. sorokiniana es una microalga que puede jugar un papel fundamental en procesos de biorremediación. Esta microalga ofrece un gran número de ventajas en comparación con otras, como pueden ser su robusta pared celular o su capacidad de crecer en un amplio rango de ambientes adversos, entre los que destacan medios de cultivo contaminados con metales pesados (Liang et al. 2017). Además, *C. sorokiniana* tiene una alta tasa de crecimiento en comparación con otras microalgas previamente utilizadas en procesos de biorremediación, tales como *Chlamydomonas reinhardtii*, *C. minutissima* o *Scenedesmus sp.* (Salama et al. 2019). Por todo esto, se podría considerar a la microalga *C. sorokiniana* como un organismo con un gran potencial para llevar a cabo diferentes estudios de biorremediación en presencia de metales pesados, así como para estudiar su respuesta celular y metabólica frente a estos compuestos. Sin embargo, todavía no se ha realizado ningún estudio global completo de todo el metabolismo

celular cuando la microalga es cultivada en presencia de metales pesados. En este contexto, la proteómica surge como una herramienta poderosa, capaz de dotarnos de un profundo conocimiento de las respuestas metabólicas y los mecanismos de detoxificación que utilizan las microalgas bajo estrés metálico. La proteómica cuantitativa, basada en cromatografía líquida y análisis de espectrometría de masas, presenta un amplio rango de ventajas frente a la electroforesis bidimensional, tales como la capacidad de estudiar un mayor número de proteínas, evitando las variaciones experimentales entre geles, o la mejora del análisis cuantitativo (Li et al. 2018). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en plantas para comparar la expresión de proteínas bajo diferentes estímulos ambientales y su efecto en las diferentes rutas metabólicas (Aroca et al. 2017; Singh et al. 2016). Además, la mejora con la utilización de la cuantificación SWATH-MS frente al análisis dependiente de datos (DDA) proporciona una cobertura mayor de proteínas, facilitando la reproducibilidad del proceso (Krasny et al. 2018). Hasta la fecha, no se han realizado muchos estudios proteómicos en microalgas si se compara con otros organismos como las plantas (Anad et al. 2017; Porier et al. 2018).

Por todo esto, en este Capítulo se evalúa la tolerancia de la microalga *C. sorokiniana* a diferentes metales pesados tales como el Cu^{+2} , Cd^{+2} ; y metaloides como el As en sus estados de oxidación III y V, tanto en su crecimiento, como en la capacidad acumuladora de estos metales, y en cómo afecta a ciertas enzimas antioxidantes y del metabolismo del N y el S. Además, se presenta un estudio proteómico de *C. sorokiniana* cultivada con una concentración de 250 μM de Cd, comparándolo con las condiciones estándar de crecimiento en ausencia del metal, utilizando para ello la técnica SWATH-MS.

4.2. Tolerancia, acumulación y respuesta al estrés producido por distintos metales pesados en la microalga *Chlorella sorokiniana*

4.2.1. Efecto de los metales pesados en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*

Para estudiar el efecto de los metales pesados en el crecimiento de *C. sorokiniana* se cultivó la microalga en medio TAP con concentraciones iniciales de los metales pesados de entre 0,1 y 5 mM de Cu, 50 y 500 μM de Cd, 0,25 y 5 mM de As (III) y 2,5 y 50 mM de As (V).

Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 4.1, indican que la microalga *C. sorokiniana* es capaz de tolerar altas concentraciones de estos metales pesados. En la Figura 4.1A se puede observar que el crecimiento de la microalga sólo se ve afectado de manera significativa ($p < 0,05$) a partir de una concentración de 500 μM de Cu, alcanzando una biomasa final un 20% menor que la del cultivo control. No obstante, *C. sorokiniana* puede crecer incluso con una concentración de 1 mM de Cu, alcanzando sobre el 70% de la biomasa final del cultivo control. Estos resultados muestran que esta microalga posee una tolerancia a este bioelemento superior a la mostrada por *Chlamydomonas reinhardtii* (Domínguez, 2008), o a la indicada en estudios previos realizados con otra estirpe de *Chlorella* (Hamed et al. 2017). Además, se ha descrito que algunos organismos pueden desarrollar tolerancia al cobre como un método de adaptación cuando crecen en ambientes contaminados por este metal (Romero-Cruz, 2017), lo que podría indicarnos que *C. sorokiniana* habría desarrollado este mecanismo de defensa para poder crecer a concentraciones tan altas de cobre.

Por otra parte, *C. sorokiniana* muestra una menor tolerancia al Cd que al Cu (Figura 4.1B), manteniendo un crecimiento similar al cultivo control hasta una concentración de Cd 200 μM , a

partir de la cual, los cultivos muestran una tasa específica de crecimiento similar al control sólo durante las primeras 24 h, produciéndose una considerable desaceleración en la velocidad de crecimiento a partir de ese tiempo. Como consecuencia, en cultivos con concentraciones de Cd de 250 y 500 μM , la biomasa de *C. sorokiniana* al final de la fase exponencial fue de entre el 75 y el 55% de la del cultivo control, respectivamente. Esto podría producirse debido a la mayor toxicidad de este metal, que es capaz de inhibir la síntesis de clorofilas y el proceso de la fotosíntesis en microalgas incluso a bajas concentraciones (Wang et al. 2018). No obstante, *C. sorokiniana* muestra una alta tolerancia a este metal pesado, superior a otras estirpes de *Chlorella* (Wang et al. 2018) o a la de la microalga extremófila *Coccomyxa onubensis* (Romero-Cruz, 2017).

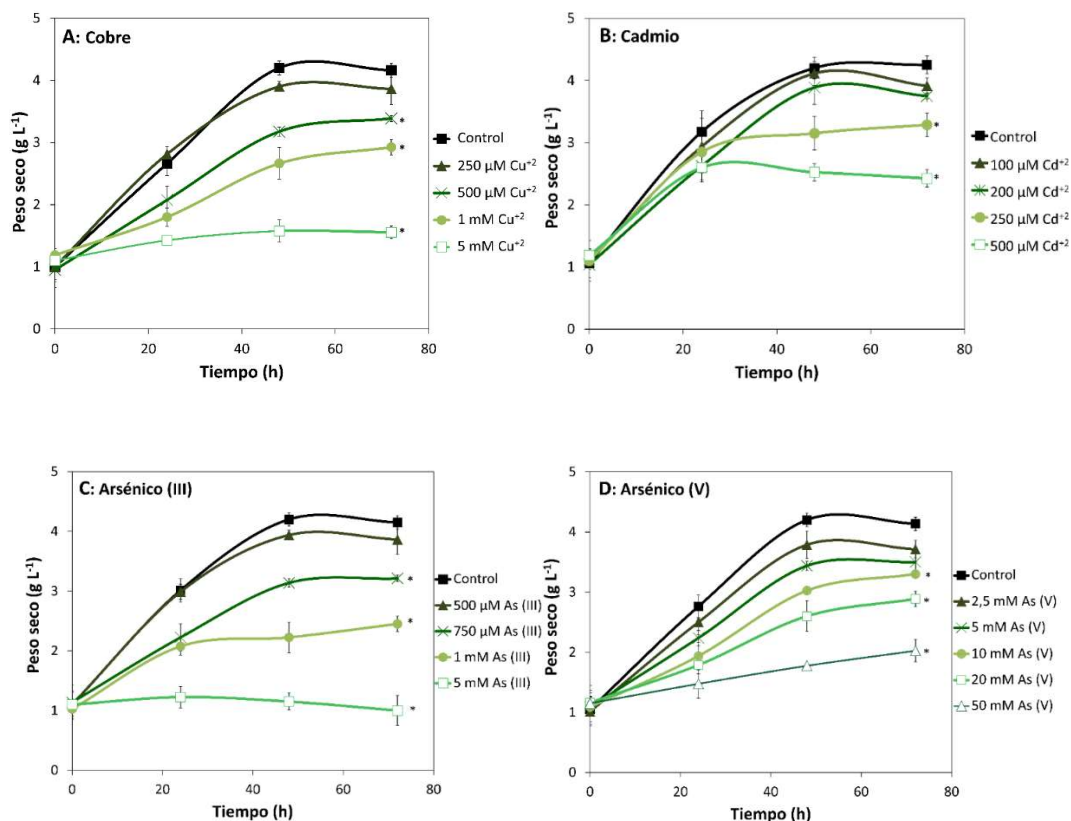


Figura 4.1. Curva de crecimiento de *C. sorokiniana* cultivada con diferentes concentraciones de Cu²⁺ (A), Cd²⁺ (B), As III (C) y As V (D). La microalga fue cultivada en medio TAP optimizado, según lo descrito en el Capítulo 2. * Indica diferencias estadísticamente significativas de biomasa final entre el control y los diferentes cultivos ($p < 0,05$).

Respecto al arsénico, la Figura 4.1C pone de manifiesto que *C. sorokiniana* es capaz de tolerar hasta concentraciones de 500 μM de As (III), sin un descenso significativo de su biomasa final, siendo incluso capaz de sobrevivir a concentraciones de 1 mM o superiores. En el caso del As (V) (Figura 4.1D), el decrecimiento de la biomasa final y la tasa de crecimiento específica (Figura 4.2B) es proporcional al aumento de la concentración del metaloide. Además, *C. sorokiniana* es capaz de tolerar concentraciones de 50 mM de arseniato, obteniéndose un 50% de la biomasa final que se obtendría en condiciones normales de cultivo, a las 72 h (Figura 4.1D). Este hecho, puede deberse a los diferentes mecanismos descritos en microalgas para reducir la toxicidad del As, como pueden ser la oxidación de arsenito a arseniato, la metilación del As o la formación de otros compuestos menos tóxicos que contienen As (Wang et al. 2015). Esta enorme tolerancia

al metaloide en sus diferentes estados de oxidación es superior a la de otras microalgas como *C. vulgaris* (Jiang et al. 2011), y similar a la de organismos extremófilos salinos como *Dunaliella salina* o *Nannochloropsis sp.* (Updahay et al. 2016).

La Figura 4.2 muestra la relación entre la tasa de crecimiento específica y la concentración de los metales pesados ensayados. En el caso del Cd la figura muestra dos tendencias: una de ellas hasta una concentración de 200 μM , donde hay una pequeña inhibición del crecimiento, alcanzando un 90% de la tasa de crecimiento específica del control; y otra a partir de esta concentración, donde existe una fuerte inhibición de la velocidad crecimiento, siendo la tasa de crecimiento específica a 500 μM un 40% del valor del cultivo control (Figura 4.2A). A esa misma concentración, para el Cu y el As (III), la inhibición del crecimiento fue menor, situándose la tasa de crecimiento específica en valores de un 70 y un 90% del cultivo control, respectivamente (Figura 4.2A). Cabe destacar también que, a concentraciones inferiores a 200 μM , los valores de la tasa de crecimiento específica no fueron en ningún caso más bajos del 90% del cultivo control, lo que indica la alta tolerancia de *C. sorokiniana* a la presencia de estos metales en el medio, mayor a la mostrada por *Chlamydomonas reinhardtii*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis chuii* o *Coccomyxa onubensis* (Domínguez, 2008; Debelius et al. 2009; Romero-Cruz, 2017).

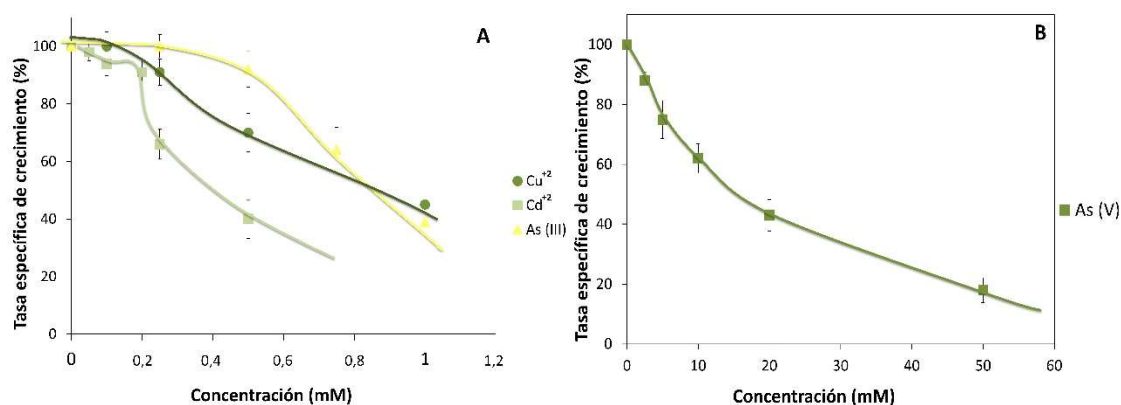


Figura 4.2. Porcentaje de la tasa de crecimiento específica respecto al control de *C. sorokiniana* cultivada con Cu^{+2} , Cd^{+2} y As III (A); y As V (B). Los valores de la tasa de crecimiento fueron calculados en función de los datos de la Figura 4.1, siendo el 100% el valor del cultivo control.

Además, la Figura 4.2B nos muestra el mismo estudio para el arseniato que, al tener un rango de concentraciones superior al resto, ha sido representado aparte. En la figura se puede observar que *C. sorokiniana* también tolera altas concentraciones de As (V) siendo, a una concentración de 20 mM, donde alcanza valores inferiores al 50% de la tasa de crecimiento específica del control. Esta tolerancia puede deberse a que, al ser el anión AsO_4^{-3} estructuralmente análogo al PO_4^{-3} y ser absorbidos a la célula por los mismos transportadores (Wang et al. 2015), puede provocar que ambos iones compitan por entrar en la célula lo que, en casos de altas concentraciones de fosfato, se bloquee la entrada de arseniato y la toxicidad del As (V) sea menor. Este hecho podría explicar la alta tolerancia que la microalga muestra al As (V), cuya concentración se encuentra un orden de magnitud por encima del resto de metales pesados.

4.2.2. Efecto de los metales pesados en el consumo de nitrógeno de *Chlorella sorokiniana*

Uno de los principales problemas que se suelen observar cuando las microalgas son cultivadas en medios con metales pesados es el efecto provocado en el consumo de N (Anu et al. 2018).

Para corroborar este efecto en *C. sorokiniana*, se ha estudiado cómo afectan los metales pesados y metaloides, previamente testados, sobre el consumo de amonio, fuente de N utilizada en este estudio. Los resultados de la velocidad de consumo de amonio, mostrados en la Tabla 4.1, se han obtenido cultivando *C. sorokiniana* con las concentraciones indicadas de metales pesados y metaloides durante las primeras 24 h de cultivo, que es el momento de mayor velocidad de consumo del amonio. Aunque en todos los casos la tendencia es que a mayor concentración de metal hay un menor consumo de amonio, sólo aparecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el consumo a concentraciones de 5 mM de Cu y As (V), y 1 mM de As (III). Sin embargo, no aparecieron diferencias significativas en el consumo de amonio cuando *C. sorokiniana* fue cultivada con Cd en el medio de cultivo, a las concentraciones ensayadas.

Tabla 4.1. Velocidad de consumo de amonio de *C. sorokiniana* durante las primeras 24 horas de cultivo.

Cu²⁺ (mM)	v (mM h⁻¹)	As (III) (mM)	v (mM h⁻¹)
Control	0,887 ± 0,075	Control	0,930 ± 0,065
0,25	0,874 ± 0,031	0,50	0,887 ± 0,012
0,50	0,705 ± 0,028	0,75	0,772 ± 0,058
1	0,601 ± 0,003	1	0,738 ± 0,029*
5	0,437 ± 0,054*	5	0,434 ± 0,009*

Cd²⁺ (µM)	v (mM h⁻¹)	As (V) (mM)	v (mM h⁻¹)
Control	0,751 ± 0,058	Control	1,013 ± 0,072
100	0,741 ± 0,133	2,5	0,938 ± 0,062
200	0,691 ± 0,083	5	0,776 ± 0,058*
250	0,702 ± 0,027	10	0,751 ± 0,030*
500	0,608 ± 0,040	20	0,581 ± 0,028*
		50	0,537 ± 0,035*

Las muestras fueron tomadas de los cultivos de las Figuras 4.1 y 4.2. * Indica diferencias estadísticamente significativas entre el control y los diferentes cultivos ($p < 0,05$).

Al comparar la velocidad de consumo de amonio (Tabla 4.1) con el crecimiento (Figura 4.1), se puede observar como la inhibición del crecimiento de la microalga a una concentración de 5 mM de Cu o As (III) es debida posiblemente a la inhibición en el consumo de amonio, entre otros posibles factores, al no poder asimilar uno de los elementos básicos para su crecimiento. Por otra parte, a concentraciones de 1 mM, de estos dos elementos, se produce una inhibición del crecimiento que no se corresponde con una inhibición significativa del consumo de amonio, lo que indicaría que entran en juego otros mecanismos celulares, producidos por la exposición a estos metales (Torres et al. 2008), que evitan el crecimiento de la microalga, a pesar de tener disponibilidad celular de N. También se produce una inhibición significativa en el consumo de amonio a concentraciones de 5 mM o superiores de As (V) (Tabla 4.1). A pesar de que a esta concentración no se produce una inhibición significativa del crecimiento (Figura 4.1D), se puede observar como sí existe una inhibición parcial del mismo, obteniéndose una biomasa final de entre el 75-80% de la del control. Esta inhibición parcial del crecimiento podría deberse, entre otros factores, a este menor consumo de amonio.

4.2.3. Capacidad de acumulación de metales pesados de *Chlorella sorokiniana*

Además de la tolerancia y el consumo de amonio, también se ha estudiado la capacidad de acumulación intracelular de estos metales y metaloides por parte de la microalga *C. sorokiniana*, como uno de los puntos clave para conocer su potencial biorremediador. Para ello, se recogieron cultivos de *C. sorokiniana*, tras 72 h de exposición a distintas concentraciones de metales, y se calculó la concentración de metal en la biomasa y en el medio de cultivo con el fin de obtener

los valores de concentración intracelular del metal y del factor de bioconcentración (BCF), presentando los valores mostrados en la Tabla 4.2. Por una parte, se puede observar que *C. sorokiniana* es capaz de crecer en altas concentraciones de As, tanto en forma de arseniato como de arsenito, sin llegar a acumular este metaloide. Por otra parte, *C. sorokiniana* es capaz de acumular Cu a concentraciones medias, especialmente en comparación con lo acumulado en el cultivo control, que contiene trazas de Cu; y acumula Cd (en torno a 11000 ppm) a altas concentraciones (500 μ M); (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Peso seco acumulado y factor de bioconcentración (BCF) de *C. sorokiniana* con diferentes metales pesados a las 72 h de cultivo.

	Acumulación (ppm)	BCF
Control		
Cu	50,76 \pm 0,863	-
Cd	<LD	-
As	<LD	-
250 μM Cu⁺²	1409,6 \pm 9,493	94,541
500 μM Cu⁺²	2232,4 \pm 98,43	105,25
250 μM Cd⁺²	2939,7 \pm 59,49	181,09
500 μM Cd⁺²	11232 \pm 348,7	566,57
500 μM As III	59,769 \pm 1,917	3,128
750 μM As III	58,986 \pm 2,268	1,191
10 mM As V	50,411 \pm 1,102	0,067
20 mM As V	145,31 \pm 1,548	0,100

Los valores de acumulación se calcularon mediante ICP-MS. Los valores de BCF vienen dados por la concentración de metal pesado intracelular y la concentración de metal pesado restante en el medio, tal y como se describe en el Capítulo 2.

Los datos de As muestran que *C. sorokiniana* acumula bajas concentraciones de este metaloide, lo que podría ser también la causa de su alta tolerancia al As, superior a otras especies con mayor capacidad acumulativa de este metaloide como *Chlorella sp.*, *Monoraphidium arcuatum* o *Coccomyxa onubensis* (Levy et al. 2005; Romero-Cruz, 2017). Por otro lado, aunque *C. sorokiniana* puede acumular altas concentraciones de Cu, el BCF obtenido es inferior al de otras microalgas (Atay et al. 2013; Yan y Pan, 2002), a pesar de que las concentraciones de Cu que se han utilizado en este estudio han sido iguales o superiores a las probadas en los trabajos mencionados.

Finalmente, los resultados de acumulación en Cd pueden explicar los resultados de la Figura 4.1B y 4.2A, donde se muestra una inhibición en la tasa específica crecimiento de la microalga a concentraciones superiores de 200 μ M y una parada del aumento de biomasa a partir de las 24 h de exposición al metal, respectivamente. Este comportamiento podría deberse a que las altas concentraciones de Cd intracelular afecten directamente otras rutas metabólicas, como pueden ser la fotosíntesis o la fotorrespiración, produciendo una inhibición de la capacidad de crecimiento de los cultivos de *C. sorokiniana*. Además, aunque los valores de BCF obtenidos para Cd son similares a los de otras macro- y microalgas (Chen et al. 1998; Ellison et al. 2014), los valores de concentración del metal en el medio de cultivo e intracelular en *C. sorokiniana* fueron mucho mayores que los utilizados en estos estudios, lo que pone de manifiesto que *C.*

sorokiniana posee un gran potencial como organismo biorremediador de Cd. De hecho, las ventajas de tener una alta tolerancia y una alta capacidad acumulativa permiten que *C. sorokiniana* pueda ser utilizada, como elemento biorremediador, en ecosistemas con altas concentraciones de Cd, donde otros organismos capaces de acumular altas concentraciones de este metal no puedan sobrevivir (Santiago-Martínez et al. 2015).

4.2.4. Efecto de metales pesados en la expresión génica y la actividad enzimática

La acumulación intracelular de metales pesados puede provocar alteraciones en otras rutas metabólicas. Debido a esto, se ha realizado un estudio de los niveles de expresión génica y de la actividad enzimática de dos enzimas antioxidantes, como son la ascorbato peroxidasa (APX) y la catalasa (CAT); y cuatro enzimas más que participan en la biosíntesis de los aminoácidos requeridos para la producción de GSH y PCs, como son la glutamina sintetasa (GS), la glutamato deshidrogenasa (GDH), la O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL) y la NAD-isocitrato deshidrogenasa (NAD-IDH). Estos experimentos se realizaron durante la fase exponencial (42 h) de crecimiento del cultivo, para evitar el estrés debido a la ausencia de algún nutriente; y las concentraciones utilizadas de cada metal o metaloide fueron: 500 μM de Cu, 250 μM de Cd, 750 μM de As (III) y 10 mM de As (V), que son las concentraciones donde empezaron a detectarse diferencias estadísticamente significativas en la biomasa final del cultivo (Figura 4.1). En los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos.

Enzimas antioxidantes: APX y CAT

Como muestran las figuras 4.3 y 4.5, la presencia de Cu, Cd, As(III) o As(V) en el medio de cultivo de *C. sorokiniana*, a las concentraciones indicadas, provocó una alta actividad antioxidante en la microalga. A nivel de expresión génica hay un aumento tanto en la expresión del gen *APX* como del gen *CAT* (Figura 4.5), que codifican las enzimas APX y CAT, respectivamente. Sin embargo, a nivel de la actividad enzimática, llama la atención la disminución de la actividad APX en los cultivos de Cu y Cd (Figura 4.3). Esta disminución podría ser debida a un proceso de inhibición enzimática, producida probablemente por la acumulación intracelular de Cu y Cd en la microalga (Tabla 4.2). Para confirmar esta hipótesis, se realizó estudio de inhibición de la actividad APX, utilizando el extracto crudo obtenido a partir del cultivo control; de tal forma que se adicionaron cantidades crecientes del metal (Cu o Cd) a la mezcla de reacción del ensayo de actividad APX. Los resultados de este ensayo muestran que la actividad APX se inhibió casi en su totalidad con cantidades de 25 μmoles de Cu y 100 μmoles de Cd en la mezcla de ensayo (Figura 4.4). Este comportamiento en la actividad APX ha sido previamente descrito en plantas hiperacumuladoras de estos dos elementos, que también sufrieron una inhibición en la actividad APX debido a las concentraciones intracelulares de los metales (Daud et al. 2014). Por otro lado, en el caso del As, el nivel de actividad APX fue 1,5 veces mayor en los cultivos que contenían este metaloide, en sus dos estados de oxidación (Figura 4.3). De la misma manera, también se observó un aumento en los niveles de expresión génica de *APX*, que llegó a ser hasta 11 veces mayor en los cultivos que contenían arseniato (Figura 4.5), lo que demuestra que esta enzima juega un papel principal en la eliminación de las ROS producidas por la presencia de este metaloide, especialmente en el caso del As (V), tal y como ha sido demostrado previamente en plantas tratadas con As (Praveen et al. 2019; Updahay et al. 2016).

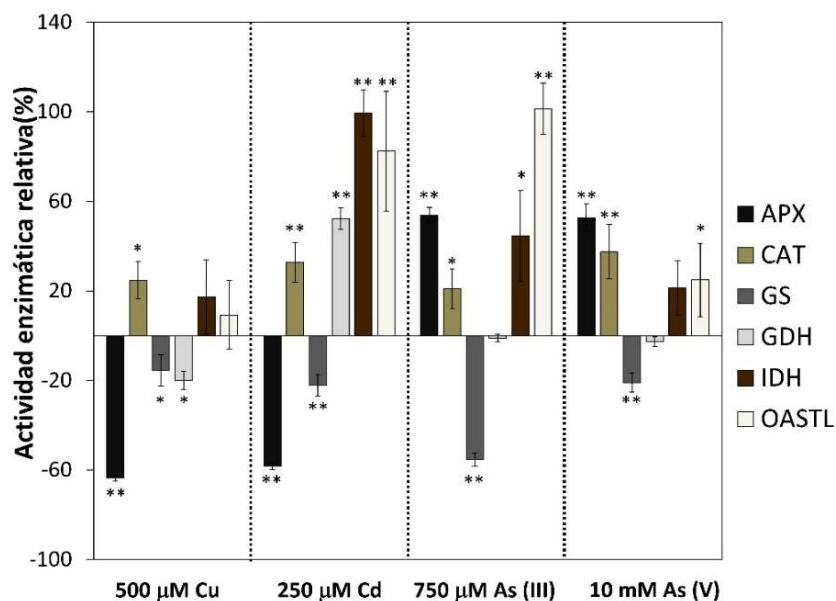


Figura 4.3. Actividad enzimática relativa de enzimas antioxidantes y precursoras de glutamato y cisteína, de *C. sorokiniana* sometida a estrés metálico tras 42 h de cultivo. Las enzimas ensayadas fueron ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutamina sintetasa (GS), glutamato deshidrogenasa (GDH), NAD isocitrato deshidrogenasa (IDH) y O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL). *Diferencias estadísticamente significativas entre el control y los diferentes cultivos, siendo $p < 0,05$; **y siendo $p < 0,01$.

En cuanto a la catalasa, los niveles de actividad de *C. sorokiniana* aumentaron entre 1,2 (Cu) y 1,4 (As V) respecto al cultivo Cu control (Figura 4.3); mientras que los niveles de expresión génica aumentaron entre 2 (Cu) y 14 (As III) veces (Figura 4.5). Los mayores niveles de expresión génica se produjeron en presencia del Cd y del As, en sus dos estados de oxidación, mostrando grandes diferencias significativas ($p < 0,01$) en estos casos. No obstante, los niveles de actividad CAT, mostraron valores muy similares en todos los casos ensayados. También, es importante destacar el mayor nivel de expresión del gen *CAT* en presencia de arsenito, en comparación con los niveles observados en cultivos con arseniato, posiblemente debido a la mayor toxicidad del As (III), lo que activa una respuesta mayor, tal y como ha sido reportado por Upadhyay y colaboradores (2016). Además, la sobreexpresión tan alta de la CAT en los cultivos de Cd compensaría la inhibición observada de la actividad APX, reemplazándola para evitar una sobreacumulación de H_2O_2 en las células. Finalmente, los bajos niveles de expresión génica y actividad CAT en presencia de Cu concuerdan con lo observado en estudios previos en *Chlamydomonas reinhardtii* (Domínguez, 2008; Nowicka et al. 2016) donde la enzima CAT sufre una leve inducción cuando la microalga está expuesta a altas concentraciones de Cu en el medio de cultivo.

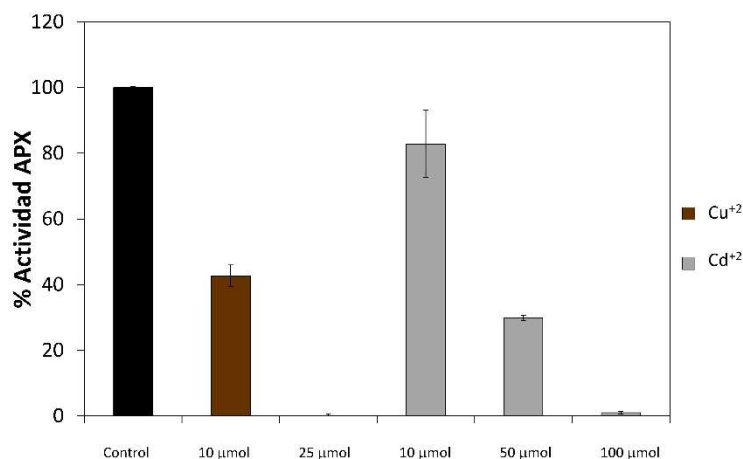


Figura 4.4. Estudio de inhibición de la actividad APX de *C. sorokiniana* provocada por la presencia de Cu²⁺ (barras marrones) y Cd²⁺ (barras grises) en la mezcla de ensayo. A la mezcla de ensayo del cultivo control se le adicionaron las cantidades indicadas de estos elementos en disolución y se midió la actividad APX según lo descrito en el Capítulo 2.

Enzimas del metabolismo del nitrógeno y el azufre

El ciclo GS-GOGAT, junto con la GDH y la NAD-IDH, forman parte del entramado encargado de la síntesis del glutamato, aminoácido requerido para la síntesis de PCs (Gill y Tuteja, 2010), por lo que se ha estudiado el efecto que produce la presencia de metales pesados en el medio de cultivo sobre estas enzimas. Por un lado, la GS sufre una inhibición significativa tanto a nivel de actividad enzimática (de entre el 40 y el 80% de los valores del control), como de expresión génica (de entre el 30 y el 90% de los valores del control), siendo en presencia de As (III) donde se produjo la mayor inhibición (Figuras 4.3 y 4.5). Sin embargo, para los otros tres metales, aunque hubo inhibición de la actividad enzimática, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a nivel de expresión génica. Similares resultados han sido publicados para otras microalgas (Devriese et al. 2001; Romero-Cruz, 2017), lo que indica que existe un bloqueo parcial del ciclo GS-GOGAT, que desfavorece la producción de glutamato, necesario para la síntesis de PCs. No obstante, la inhibición de esta enzima depende de la concentración del metal (Erdal y Turk, 2016; Praveen et al. 2019), lo que justificaría que en ciertos casos las diferencias no fueran significativas, como ocurrió para el Cu, Cd y As (V); (Figura 4.5).

Este bloqueo parcial del ciclo GS-GOGAT provocaría que la producción de L-glutamato se realice por parte de la enzima GDH, remarcando el rol principal de esta enzima en situaciones de estrés (Vega, 2019), que también participa en la reasimilación del amonio producido en la fotorrespiración (Mifflin y Habash, 2002). Los resultados de la expresión génica de esta enzima en *C. sorokiniana* parecen corroborar estas afirmaciones, ya que hay un incremento significativo de los niveles GDH con casi todos los metales ensayados (Figura 4.5), especialmente cuando la microalga es cultivada con Cd en el medio, donde muestra un nivel 7 veces mayor de expresión génica y 1,6 veces mayor de actividad enzimática, respecto al cultivo control. En el caso del As (V), el aumento significativo de los niveles de expresión génica de la GDH no se corresponde con los niveles de actividad enzimática, mostrando *C. sorokiniana* un comportamiento similar a la planta *Brassica juncea* cuando es cultivada con As (Praveen et al. 2019). Finalmente, habría que destacar una inhibición significativa, tanto a nivel de expresión génica como de actividad enzimática, de la enzima GDH en el caso del cultivo con Cu.

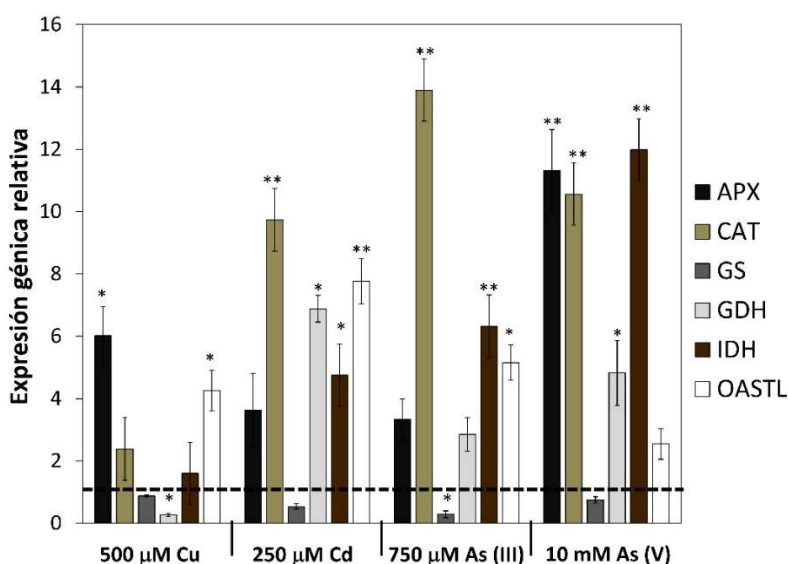


Figura 4.5. Expresión génica relativa de enzimas antioxidantes y precursoras de glutamato y cisteína de *C. sorokiniana* sometida a estrés metálico tras 42 h de cultivo. Los genes estudiados fueron los que codifican para ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutamina sintetasa (GS), glutamato deshidrogenasa (GDH), NAD isocitrato deshidrogenasa (IDH) y O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL). *Diferencias estadísticamente significativas entre el control y los diferentes cultivos, siendo $p < 0,05$; **y siendo $p < 0,01$.

Otra enzima implicada en la síntesis de L-glutamato es la NAD-IDH, que se encarga de aportar el α -cetoglutarato necesario. Las Figuras 4.3 y 4.5 muestran un aumento del nivel de actividad y de expresión de esta enzima cuando *C. sorokiniana* es cultivada con los distintos metales pesados. Por un lado, la Figura 4.3 muestra un aumento significativo de la actividad NAD-IDH en los cultivos con Cd y As (III), siendo de hasta el doble del nivel de actividad del control, en el caso del Cd. Por otra parte, hay un incremento significativo de la expresión génica de esta enzima en los cultivos de Cd, As (III) y As (V) de 5, 6 y 12 veces, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados previamente por nuestro grupo de investigación en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, a nivel de actividad enzimática, en cultivos con Cd (Domínguez, 2008), probablemente debido a la necesidad de α -cetoglutarato para la producción de glutamato, precursor tanto del GSH como de las PCs. Por otra parte, aunque no hay muchos estudios publicados con esta enzima en condiciones de estrés por metales, se ha demostrado que la NAD-IDH puede jugar un papel fundamental a la hora de aliviar el estrés producido por As en plantas (Rodríguez-Ruiz et al. 2019).

Finalmente, la OASTL es una enzima implicada en el metabolismo del S que produce cisteína, otro de los aminoácidos necesarios para la síntesis de GSH y de PCs. La Figura 4.3 muestra un incremento de la actividad enzimática OASTL de entre 1,2 y 2 veces respecto al cultivo control, siendo significativo en el caso del Cd, As (III) y As (V). Del mismo modo, la Figura 4.5 muestra también un aumento significativo de la expresión génica de la OASTL en el caso del Cu, Cd y As (III) de entre 4 y 8 veces, respecto al control. En el caso del Cd, la inducción significativa de la OASTL junto con la de la GDH y la NAD-IDH parece indicar que está inducida la síntesis de PCs y el transporte hacia las vacuolas de Cd^{+2} , lo que está de acuerdo con los resultados de acumulación de este metal que se recogen en la Tabla 4.2. Del mismo modo, la inducción de la producción de cisteína en presencia de As ha sido descrita en plantas y microalgas, tanto a nivel de actividad enzimática como a nivel de expresión génica. Se postula que este aminoácido puede intervenir en algún mecanismo mitigador del estrés oxidativo causado por este metaloide

(Rodríguez-Ruiz et al. 2019; Kumar et al. 2019; Updahyay et al. 2016). Finalmente, siguiendo la tendencia de las otras enzimas estudiadas, el Cu es el metal que menos afecta la enzima OASTL de la microalga *C. sorokiniana*. Aunque, a la concentración estudiada este elemento provoca diferencias significativas en la biomasa final, no afecta demasiado a las diferentes rutas metabólicas estudiadas.

4.3. Estudio proteómico del efecto del cadmio en la microalga *Chlorella sorokiniana*

El Cd es uno de los metales pesados considerados como más tóxicos, ya que ha demostrado ser un elemento cancerígeno, mutagénico y disruptor hormonal (Tchounwou et al. 2012). Además, puede provocar daño pulmonar, problemas de fragilidad ósea o alteraciones del calcio en los sistemas biológicos (Dixit et al. 2015). En organismos fotosintéticos, el Cd ha sido señalado como un elemento capaz de reducir la actividad fotosintética y el crecimiento celular, causar estrés oxidativo, daños en el ADN e interferir en el metabolismo celular (Marchelo et al. 2018). Con el fin de obtener una comprensión más profunda de los mecanismos de respuesta que desarrolla *C. sorokiniana* a la presencia de Cd, que es el metal que acumula en mayor cantidad, se ha realizado un estudio sobre el efecto que este metal provoca en la morfología de la microalga, mediante microscopía, y en su metabolismo, en base a un estudio proteómico utilizando la técnica de SWATH-MS. Esta técnica es especialmente novedosa en *C. sorokiniana*, ya que las bases de datos no han reportado estudios proteómicos previos en esta microalga.

4.3.1. Efecto de la exposición al cadmio en el crecimiento y la morfología celular de *Chlorella sorokiniana*

Para comprobar los efectos del Cd se cultivó la microalga *C. sorokiniana* en medio TAP optimizado y concentraciones crecientes de Cd, entre 100 y 250 μM , con un cultivo control en ausencia de Cd (Figura 4.6A). Durante las primeras 24 h, el crecimiento fue bastante similar en todos los cultivos, no obstante, a partir de este tiempo, se produjo una inhibición significativa del crecimiento en el cultivo con 250 μM de Cd. Por lo cual, para realizar los estudios morfológicos se utilizó esta concentración de Cd en el medio de cultivo de *C. sorokiniana*, utilizando siempre un control en ausencia del metal, y recogiendo los cultivos tras 40 h de crecimiento, una vez que existe la inhibición real del crecimiento, y antes de que exista limitación de nutrientes.

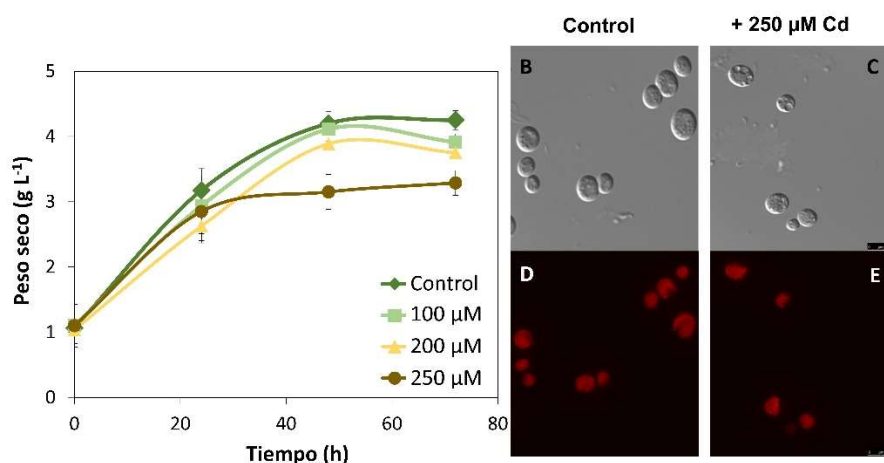


Figura 4.6. Efectos fisiológicos del Cd en *C. sorokiniana*. Curva de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de Cd (A), y alteraciones morfológicas (B y C) y de fluorescencia (D y E) de las células de *C. sorokiniana* en ausencia (B y D) y presencia de 250 μM de Cd en el medio de cultivo (C y E), tras 40 h de cultivo.

Los estudios morfológicos en ausencia y presencia de Cd se realizaron mediante microscopía óptica, tal y como se describe en el Capítulo 2. Las imágenes (Figura 4.6B y C) muestran que la presencia de este metal provocó diversas variaciones morfológicas en *C. sorokiniana*. Una de ellas fue el tamaño y el número de vacuolas de las células tratadas con Cd (Figura 4.6C), que fue considerablemente mayor que en las no tratadas, posiblemente debido a la acumulación de este metal, ya que uno de los mecanismos de detoxificación más común en organismos fotosintéticos es el transporte del catión metálico hacia las vacuolas mediado por PCs (Cobbet, 2000). Además, las imágenes de fluorescencia tomadas de las mismas células (Figura 4.6D y E) mostraron que la intensidad de la fluorescencia debida a la clorofila fue mucho mayor en el caso de las células no tratadas con Cd (Figura 4.6D), lo cual justificaría los resultados de crecimiento mostrados en la Figura 4.6A, y es coherente con estudios fisiológicos previos en *C. sorokiniana* que muestran una menor actividad fotosintética en presencia de Cd (Carfagna et al. 2013). Por otra parte, los datos de concentración intracelular de Cd en la microalga y en el medio de cultivo fueron $2,73 \pm 0,06$ ppm y 145 ± 27 μM , respectivamente, lo que indican que *C. sorokiniana* es capaz de retirar hasta un 40% del Cd del medio de cultivo, mostrando su capacidad bioacumuladora tal y como se indicó en la Tabla 4.2, en relación a su alto factor de bioconcentración para Cd.

4.3.2. Alteraciones en el proteoma de *Chlorella sorokiniana* como consecuencia de la exposición al cadmio

Para el análisis SWATH-MS, en primer lugar, se generó una librería de proteínas de *C. sorokiniana* identificadas. Para ello, las proteínas del extracto crudo se extrajeron mediante el método del TRIzol, tal y como se describe en el Capítulo 2. Los extractos crudos preparados a partir del cultivo control y de los cultivos en presencia de Cd 250 μM , se sometieron a una digestión trípica, para posteriormente analizarlos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS/MS). Se analizaron tres replicas biológicas de cada una de las condiciones. Tras lo cual, los péptidos se analizaron mediante una aproximación DDA (*Data Dependent Acquisition*), generando una librería de espectros de fragmentación de cada una de las muestras a analizar. Tras integrar los seis conjuntos de datos, se identificaron 13193 péptidos (1% *False Rate Discovery*; FDR y 96% confianza) correspondientes a 1776 proteínas (1% FDR).

En segundo lugar, se llevó a cabo la cuantificación por SWATH. Para ello las muestras se analizaron por duplicado (dos réplicas de cada una de las tres muestras biológicas del control y del cultivo tratado con Cd) mediante método DIA (*Data Independent Acquisition*), usando las mismas condiciones cromatográficas que para generar la librería. De los espectros de fragmentación de los 12 conjuntos de datos se obtuvieron un total de 30635 transiciones iónicas, 4386 péptidos y 1432 proteínas. De estas, 779 fueron estadísticamente diferentes con un valor de $p < 0,05$ (Figura 4.7A). De este grupo, 218 fueron más abundantes en los cultivos no tratados con Cd (*fold change* $> 1,5$), y 255 fueron más abundantes en los cultivos tratados con Cd (*fold change* $< 0,66$). Además, se detectaron 317 proteínas que estaban presentes sólo en los cultivos no tratados y 412 presentes sólo en los cultivos tratados con Cd.

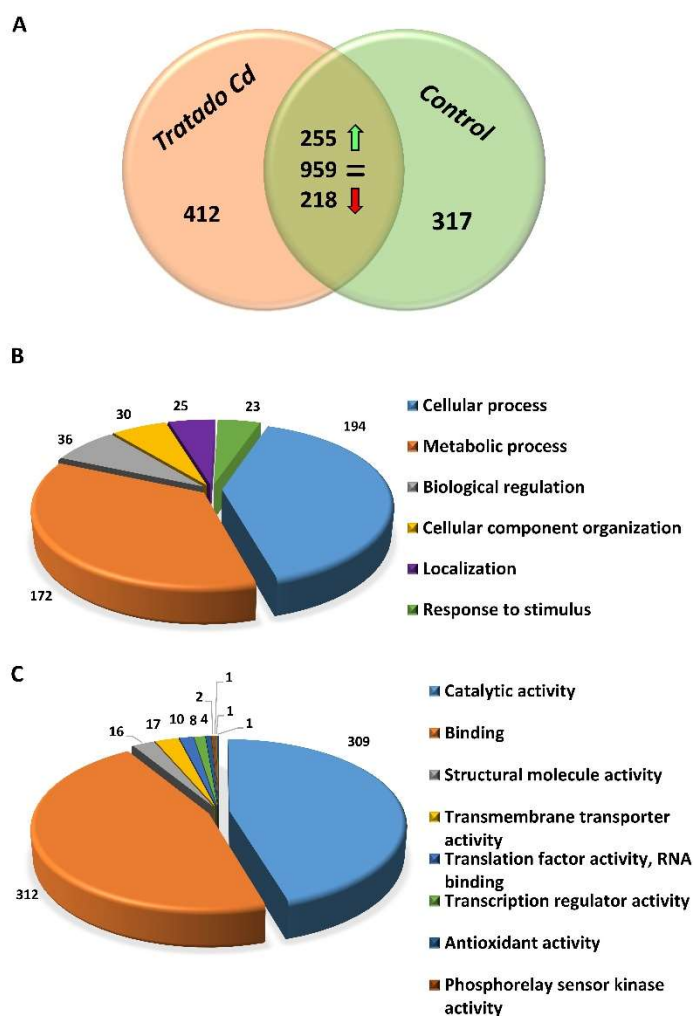


Figura 4.7. Diagrama de Venn con las proteínas identificadas de *C. sorokiniana* en el control y en cultivo tratado con 250 μM de Cd (A), y clasificación funcional según GO de las proteínas que sólo se encontraron o fueron significativamente más abundantes en los cultivos tratados con Cd clasificadas en procesos biológicos (B) y función molecular (C). De las 1432 proteínas cuantificadas en ambos cultivos, 218 se encontraron reprimidas en Los cultivos tratados con Cd (flecha roja), 255 fueron inducidas (flecha verde) y 959 no mostraron diferencias estadísticamente significativas (=). Las otras proteínas solo se encontraron en una de las dos condiciones

Se clasificaron las 667 proteínas que fueron más abundantes o que sólo aparecieron en los cultivos tratados con Cd por GO (*Gene Orthology*), según la base de datos UniProt (Pundir et al.

2016). En esta clasificación de GO se obtuvieron, según procesos biológicos, 172 proteínas que intervienen en procesos metabólicos y 194 proteínas que participan en procesos celulares, incluyendo las respuestas al estrés y la reparación del ADN (Figura 4.7B). La clasificación según las funciones moleculares mostró que la mayoría de las proteínas identificadas tenían algún tipo de actividad catalítica (Figura 4.7C). El análisis de estas proteínas en el mapa de rutas metabólicas KEGG también indicó que la mayor parte de las proteínas, 136, formaban parte de rutas metabólicas, especialmente en la biosíntesis de metabolitos secundarios y aminoácidos.

Finalmente, para determinar la relevancia funcional del efecto del Cd en la fisiología de *C. sorokiniana*, se analizaron las interacciones proteína-proteína mediante la base de datos STRING v10.5 (Szklarczyk et al. 2015), utilizando una alta confianza (*interaction score* > 0,700). Se observaron un total de 364 interacciones proteína-proteína (Figura 4.8), y se detectaron al menos tres clústeres de proteínas conectados por la función biológica. El primero contiene las proteínas implicadas en rutas metabólicas y el metabolismo del carbono (nodos rojos), que a su vez está unido a un segundo clúster de proteínas del espliceosoma y la unión de ARN (nodos verdes). Por último, el tercer clúster agrupa a proteínas ribosomales y otras sin una función definida (nodos azules).

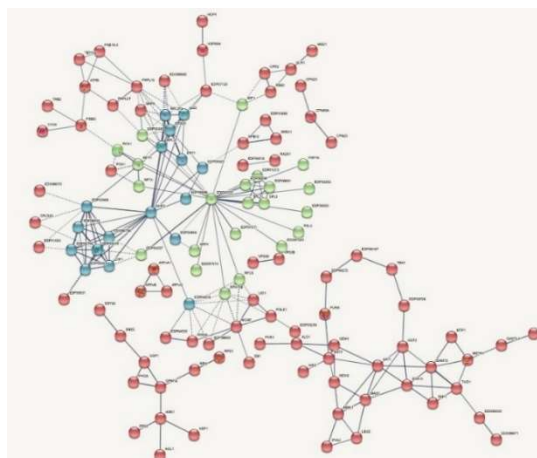


Figura 4.8. Red de interacción proteína-proteína de las que fueron significativamente más abundantes o sólo fueron localizadas en los cultivos tratados con Cd. Los círculos representan las proteínas y las líneas de unión las interacciones. Los nodos en rojo, azul o verde son los clústeres localizados por el algoritmo *k-means*.

4.3.3. Efecto del cadmio en la fotosíntesis y la fotorrespiración

Uno de los procesos fisiológicos más importantes para las microalgas y que es más susceptible de sufrir alteraciones en presencia de metales pesados es la fotosíntesis (Azhar et al. 2019). En este sentido, el estudio proteómico realizado en *C. sorokiniana* revela que la mayor parte de las proteínas relacionadas con la fotosíntesis estaban reprimidas en los cultivos de Cd con diferencias estadísticamente significativas respecto a los cultivos control (Figura 4.9A, Tabla 4.3). Entre estas proteínas se incluyen la ferredoxina (11,7 veces), la ferredoxina NADP reductasa (1,8 veces), las subunidades III, VI y XI del centro de reacción del fotosistema I (3,9, 2,0 y 4,2 veces, respectivamente). También se muestra una leve inducción de la proteína 2 del potenciador de oxígeno del fotosistema II (1,5 veces). Además, 5 proteínas antena, 2 de ellas del fotosistema I y 3 del fotosistema II, se mostraron reprimidas en los cultivos con Cd en el medio. El conjunto de todos estos resultados muestran una clara represión general de la fotosíntesis, así como una inhibición en la producción de clorofilas, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia (Figura 4.6D y E), donde las imágenes mostraban que las

células de *C. sorokiniana* cultivadas en presencia de Cd tenían menor nivel de fluorescencia, debida a la clorofila, lo que indica un menor contenido de este compuesto y, consecuentemente, una menor actividad fotosintética. Además, estos resultados concuerdan también con estudios previos realizados en otras microalgas o plantas, en los que se indican como el Cd provoca una disminución de la capacidad fotosintética en estos organismos (Ma et al. 2018).

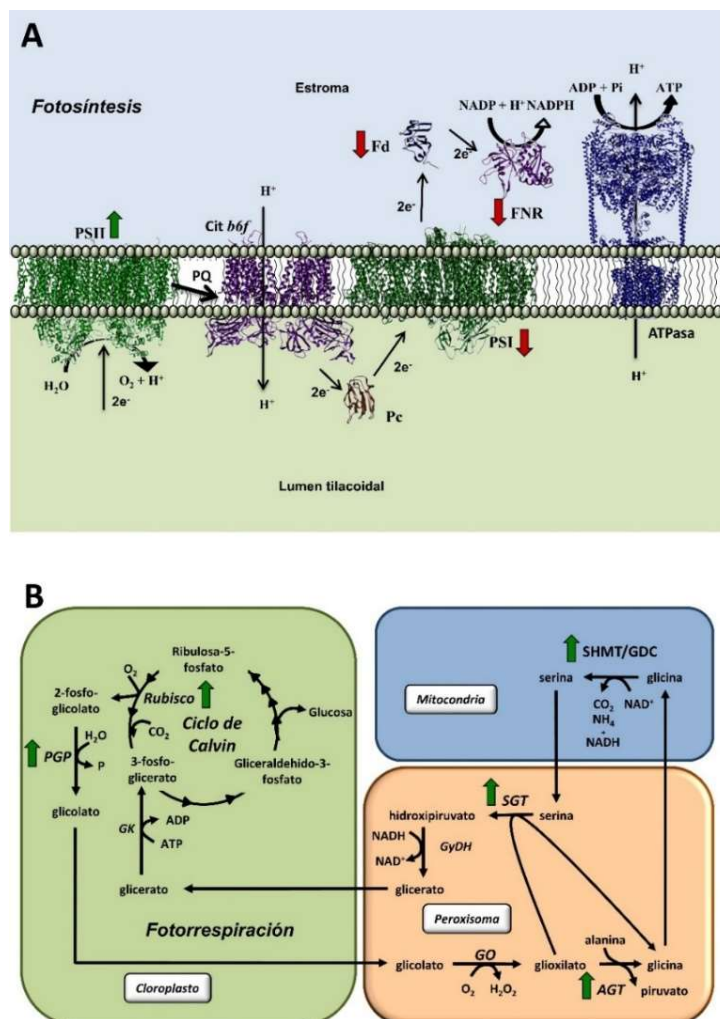


Figura 4.9. Efecto del Cd en las rutas de fotosíntesis y fotorrespiración de *C. sorokiniana*. Los diagramas de la fotosíntesis (A) y la fotorrespiración (B) muestran las proteínas inducidas en los cultivos tratados con Cd con flechas verdes, y las proteínas reprimidas con flechas rojas. Los archivos del *Protein Data Bank* (PDB) de las estructuras 3D representadas son: 1W5C para el fotosistema II (PSII), 1Q90 para el complejo citocromo b6f (Cit b6f), 6JO5 para el fotosistema I (PSI), 2PLT para la plastocianina (Pc), 4ITK para la ferredoxina (Fd), 3VO1 para la ferredoxina-NADP reductasa (FNR) y 5Y5Z para la ATPasa. Las proteínas de la fotorrespiración indicadas son: ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), fosfoglicerato fosfatasa (PGP), glicolato oxidasa (GO), alanina-glioxilato aminotransferasa (AGT), serina hidroximetiltransferasa (SHMT), glicina descarboxilasa (GDC), serina-glioxilato aminotransferasa (SGT), glicerato deshidrogenasa (GyDH), y glicerato quinasa (GK).

Por otro lado, como se aprecia en la Figura 4.9B, el proceso de fotorrespiración se encontró inducido en *C. sorokiniana* cuando se cultivó en presencia de Cd. Aunque este proceso consume ATP y poder reductor, se ha propuesto como un mecanismo de adaptación que las plantas suelen adoptar cuando existen problemas con el normal funcionamiento de la cadena de transporte electrónica cloroplástica (Li, T et al. 2020). Además, la fotorrespiración genera otros

metabolitos como la glicina, necesaria para la síntesis de GSH y PCs (D' Alessandro et al. 2013). Los resultados de este estudio (Figura 4.9B y Tabla 4.3) mostraron una inducción significativa de la Rubisco (2,1 veces), la fosfoglicerato fosfatasa (2,1 veces), la alanina-glioxilato aminotransferasa (2,2 veces), la serina hidroximetiltransferasa (1,8 veces) y la serina-glioxilato aminotransferasa (2,0 veces). Estos resultados concuerdan con estudios previos donde, mediante ensayos fisiológicos, se vio un aumento de la capacidad fotorrespiratoria de *C. sorokiniana* en presencia de Cd (Carfagana et al. 2013); o, mediante estudios proteómicos, al demostrarse una inducción de la fotorrespiración cuando la microalga *Skeletonema dohrnii* fue cultivada con este metal (Thangaraj et al. 2019).

4.3.4. Respuestas en la fosforilación oxidativa debido al cadmio

La exposición de *C. sorokiniana* al Cd también mostró una represión de síntesis de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 4.10; Tabla 4.3), donde la mayor parte de los complejos se vieron afectados. Los complejos I, II y III tuvieron una represión de 1,7, 1,6 y 4,3 veces, respectivamente. Sin embargo, el complejo V (ATP sintasa) no se vio afectado por la exposición al Cd. Estos resultados pueden estar relacionados con la inducción de las proteínas de la fotorrespiración (Figura 4.9B), ya que ambos procesos compiten por el O₂ disponible en las células. Además, se ha descrito que esta competición puede causar episodios de hipoxia en la mitocondria por lo que, al estar inducida la fotorrespiración, la fosforilación oxidativa tendría menor capacidad de realizarse y se reduciría la expresión de sus proteínas y su actividad (Gupta et al. 2009). También existe una represión en el complejo IV (Citocromo c oxidasa; 5,6 veces), que junto con la observada en el complejo III (Complejo bc₁) podría dar lugar a la alteración de la homeostasis celular y, como consecuencia, a la acumulación de ROS, tal y como ha sido descrito para la microalga *Thalassiosira pseudonana* (Lin, Q et al. 2017).

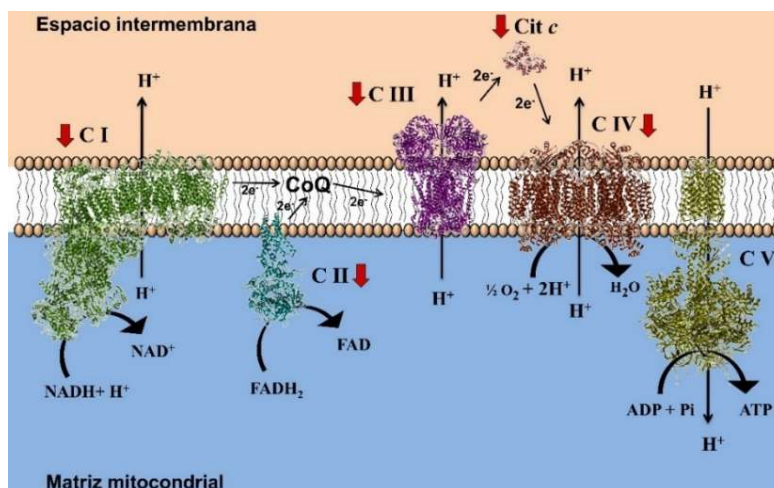


Figura 4.10. Efecto del Cd en la fosforilación oxidativa de *C. sorokiniana*. El diagrama de la cadena respiratoria mitocondrial muestra las proteínas reprimidas (flechas rojas). Los archivos del *Protein Data Bank* (PDB) de las estructuras 3D representadas son: 5LDW para el complejo I (CI), 4PED para la coenzima Q (CoQ), 1NEN para el complejo II (CII), 1PPJ para el complejo III (CIII), 3ZCF para el citocromo c (Citc), 5B1B para el complejo IV (CIV) y 2XND para el complejo V (CV).

4.3.5. Estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo antioxidante producidos por cadmio

Para mitigar la toxicidad de las ROS en el organismo, las plantas y microalgas han desarrollado diferentes mecanismos con el fin de intentar controlar la cantidad de estos compuestos en la

célula. En este estudio se comprobó que, cuando la microalga *C. sorokiniana* está expuesta a Cd, la producción de GSH se induce significativamente mediante las enzimas lactoglutación cloroplástica, lactoglutación liasa, hidroxilglutación hidrolasa y glutatión sintetasa, cuya expresión aumentó 1,5, 2,0, 2,1 y 2,1 veces, respectivamente (Tabla 4.3). Además, las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión S transferasa sufrieron una leve inducción en los cultivos con Cd en el medio (1,2, 1,3 y 1,1 veces respectivamente). Otras enzimas del ciclo glutatión-ascorbato inducidas de forma significativa fueron la L-ascorbato peroxidasa y la monodehidroascorbato reductasa (1,8 y 1,5 veces, respectivamente). Finalmente, la catalasa también estaba inducida significativamente en los cultivos tratados con Cd (1,7 veces). Estos resultados confirman los datos que venían dando estudios previos, tanto fisiológicos como proteómicos, en microalgas y plantas superiores sometidas a estrés metálico, donde el sistema antioxidante es activado con el fin de controlar el aumento de ROS que se produce como respuesta a este tipo de estrés (Ismail et al. 2018; Du et al. 2018). Por último, los datos proteómicos de las enzimas L-ascorbato peroxidasa y catalasa, confirman los resultados de actividad enzimática y expresión génica mostrados en las Figuras 4.3 y 4.5, respectivamente.

Tabla 4.3. Lista de las proteínas que presentan diferencias significativas entre los cultivos control y los tratados con Cd, clasificadas mediante rutas metabólicas.

<i>Accession</i>	Proceso biológico/Proteína	<i>Fold Change</i> (media)	<i>p</i>
Fotosíntesis			
A0A2P6U1P1	Ferredoxina	11,7	0,0000
A0A2P6TNF1	Ferredoxina-NADP+ reductasa	1,8	0,0000
A0A2P6TC44	Centro de reacción del fotosistema I subunidad XI	4,2	0,0000
A0A2P6TPV8	Centro de reacción del fotosistema I subunidad III	3,2	0,0000
A0A2P6TPU7	Centro de reacción del fotosistema I subunidad VI cloroplástica	2,0	0,0489
A0A2P6TWR3	Fotosistema II proteína 2 del potenciador de oxígeno	1,6	0,0013
Fotorrespiración			
A0A2P6TYH6	Rubisco activasa	2,1	0,0186
A0A2P6TG73	Fosfoglicolato fosfatasa	2,1	0,0042
A0A2P6TUL8	Alanina-glioxilato aminotransferasa 2 proteína mitocondrial	2,2	0,0004
A0A2P6TS62	Serina hidroximetiltransferasa	1,5	0,0000
A0A2P6U1P2	Serina-glioxilato aminotransferasa isoforma A	2,0	0,0000
Fosforilación oxidativa			
A0A2P6TPM0	NADH-ubiquinona oxidoreductasa complejo I	1,7	0,0000
A0A2P6TZ97	Succinato-CoA ligasa subunidad beta, mitocondrial	1,6	0,0000
A0A2P6TX21	Complejo citocromo bc1 subunidad 7	4,3	0,0000
A0A2P6TEI8	Citocromo c oxidasa subunidad 6B	5,6	0,0000
A0A2P6THQ1	Citocromo c oxidasa mitocondrial subunidad 13 kD	2,1	0,0000
Respuesta al estrés			
A0A2P6THP5	Lactoglutación cloroplástica putativa	2,0	0,0003
A0A2P6TJM0	Lactoilglutación liasa isoforma X2	1,5	0,0000
A0A2P6TZH8	Hidroxilglutación hidrolasa	2,1	0,0002
A0A2P6TSG0	Glutatión sintetasa	2,1	0,0000
A0A2P6TI90	Glutatión peroxidasa	1,2	0,1540
A0A2P6TMT4	Glutatión reductasa	1,3	0,0000
A0A2P6TZS9	Glutatión S-transferasa isoforma B	1,1	0,5313
A0A2P6TNR8	Glutatión S-transferasa	1,1	0,4884
A0A2P6TC42	L-ascorbato peroxidasa 6	1,8	0,0001
A0A2P6TYS0	Monodehidroascorbato reductasa	1,5	0,0000

Accession	Proceso biológico/Proteína	Fold Change (media)	p
A0A2P6TUJ2	Catalasa	1,7	0,0000
A0A2P6TT94	Heat shock 70 kDa 14	1,5	0,0000
A0A2P6TZR3	Heat shock 70 kDa 17	1,3	0,0003
A0A2P6TR21	Heat shock 70	1,5	0,0065
A0A2P6TM18	Heat shock 70	1,2	0,0004
A0A2P6TT53	Heat shock 70B	1,9	0,0000
A0A2P6TSH5	Hsp70-Hsp90 2		
A0A2P6TX62	Hsp70 factor intercambiador de nucleótidos FES1 isoforma X1		
A0A2P6TG12	28 kDa estable a la acidez y al calor Hsp isoforma X1		
Metabolismo de carbohidratos			
A0A2P6TZQ3	Acetil-CoA sintetasa	2,2	0,0000
A0A2P6TD11	Piruvato carboxilasa isoforma B	2,1	0,0000
A0A2P6TKK3	Piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad beta-cloroplástica	1,7	0,0796
A0A2P6TFS0	Piruvato, fosfato diquinasa	1,4	0,0000
A0A2P6TPT3	Fosfofructoquinasa isoforma A	1,5	0,0181
A0A2P6TCP5	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	1,4	0,0000
A0A2P6TBJ6	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	1,3	0,0190
A0A2P6U3Z2	Alpha-1,4 glucan fosforilasa	2,3	0,0000
A0A2P6TQG1	Alpha-amilasa	1,7	0,0954
A0A2P6TUQ4	4-alpha-glucanotransferasa	1,5	0,0484
A0A2P6U2S7	Citrato sintasa	1,9	0,0000
A0A2P6TQ82	Fumarato isoforma A	1,6	0,0000
A0A2P6TTG2	Succinato deshidrogenasa mitocondrial	1,7	0,0003
A0A2P6U4Q6	Succinato deshidrogenasa subunidad b560	2,3	0,0000
Metabolismo N/S			
A0A2P6V4A3	Glutamato sintasa	3,1	0,0000
A0A2P6TJV8	Glutamato deshidrogenasa	1,1	0,3563
A0A2P6TQL0	Glutamina sintetasa	1,3	0,0003
A0A2P6TEV1	Sulfito reductasa isoforma A	2,3	0,0000
A0A2P6TE71	Cisteína sintasa	1,5	0,0000
A0A2P6TWT6	Serina treonina-fosfatasa 2A activador	1,7	0,0065
Biosíntesis de aminoácidos			
A0A2P6U2U0	Serina hidroximetiltransferasa	1,8	0,0000
A0A2P6TS62	Serina hidroximetiltransferasa	1,5	0,0000
A0A2P6U422	Serina hidroximetiltransferasa	1,1	0,5046
A0A2P6U2V8	Alanina aminotransferasa 2	1,5	0,0000
A0A2P6TJZ5	Alanina aminotransferasa isoforma B	1,6	0,0000
A0A2P6TUL8	Alanina-glioxilato aminotransferasa 2 proteína mitocondrial	2,2	0,0004
A0A2P6TYD7	Fosfoserina fosfatasa	1,8	0,0005
A0A2P6U101	Serina/treonina fosfatasa	2,5	0,0000
A0A2P6TWE7	Aspartato aminotransferasa	2,3	0,0000
A0A2P6TPG2	Pirrolina-5-carboxilato reductasa	1,7	0,0000
A0A2P6TUJ0	Aldehido deshidrogenasa 22A1	3,8	0,0055
A0A2P6TEC8	Aldehido deshidrogenasa	2,4	0,0000
Metabolismo de Lípidos/Carotenoides			
A0A2P6TKW3	Acil-ACP desaturasa	5,6	0,0000
A0A2P6TEE4	Zeaxantina epoxidasa	1,7	0,0344
A0A2P6TFB0	ξ-caroteno desaturasa	2,5	0,0000

Los cuadros rojos indican proteínas reprimidas en presencia de Cd y, los verdes, las inducidas en las mismas condiciones. Los cuadros azules reflejan las proteínas sólo detectadas en los cultivos con Cd en el medio. *Tabla 4.3 Continuación*

Otra estrategia antioxidante que poseen las plantas y las microalgas es la reparación de proteínas dañadas. En esta respuesta, se induce la síntesis de un grupo de proteínas denominadas HSPs (*Heat Shock Proteins*), cuya función es actuar de chaperonas asistiendo a la reparación de proteínas dañadas (Hasan et al. 2017), lo que justifica que muchas de las HSPs de *C. sorokiniana* se indujeron en los cultivos tratados con Cd o que sólo se detectan en estas condiciones (Tabla 4.3). Estos resultados se correlacionan, además, con los datos de Sewelam y colaboradores (2019), que demostraron que la expresión de las HSPs en *Arabidopsis thaliana* crecida en condiciones normales es muy baja. Las HSPs también son capaces de prevenir la agregación de proteínas en condiciones de estrés, y la mayoría son fácilmente inducibles o, incluso, se expresan de manera constitutiva en situaciones ambientales adversas, por lo que su inducción en los cultivos de Cd es lógica (Mu et al. 2013).

Aunque la inducción del ciclo glutatión-ascorbato y de las HSPs son mecanismos de respuestas frente al estrés oxidativo, existen otras rutas metabólicas, que también pueden verse afectadas por el estrés metálico. Algunas de las principales son las encargadas de la asimilación de nutrientes.

4.3.6. Efecto del cadmio en la asimilación y el metabolismo del carbono

En el presente estudio, la principal fuente de carbono de *C. sorokiniana* es el acetato, que es asimilado y convertido en acetyl-CoA por la enzima acetyl-CoA sintetasa (ACS). En la microalga clorofita *Chlamydomonas reinhardtii*, la expresión del gen que codifica para la ACS se induce cuando aumenta la concentración de la fuente de C (Rengel et al. 2018). Sin embargo, en este estudio, donde el medio de cultivo tiene una concentración de 100 mM de acetato (en exceso para las necesidades de la microalga), se observa, una represión de la proteína ACS (2,2 veces) en las células cultivadas en presencia de Cd. Este hecho, provocaría una limitación de la suplementación de C vía acetato y, como consecuencia, la microalga debería buscar o activar vías alternativas de suministro de carbono. Los resultados proteómicos muestran una leve inducción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (1,3 veces), capaz de catalizar la transformación de oxalacetato a fosfoenolpiruvato en la gluconeogénesis, lo que indicaría que esta ruta contribuiría a la aportación de glucosa como fuente de C. Además, se puede comprobar también una inducción en los primeros pasos de la glucólisis en los cultivos tratados con Cd (Figura 4.11; Tabla 4.3), aunque sólo la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa mostraron diferencias estadísticamente significativas (1,5- y 1,7 veces). Por otra parte, la α -1,4-glucanofosforilasa (2,4 veces), la 4- α -glucanotransferasa (1,5 veces) y la α -amilasa (1,7 veces) también se ven inducidas bajo estrés provocado por Cd, lo que podría explicarse como un mecanismo de adaptación por el cual la microalga *C. sorokiniana* podría degradar parte de las reservas de almidón para aumentar la disponibilidad de carbono en estas condiciones adversas.

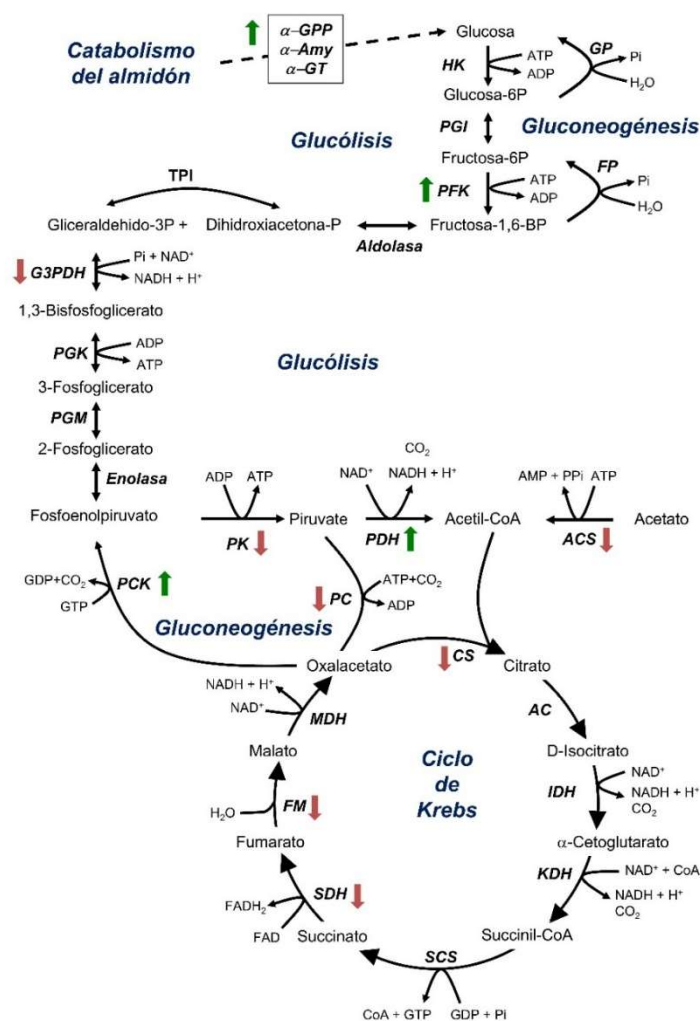


Figura 4.11. Alteraciones en el metabolismo del almidón, glucólisis, gluconeogénesis y ciclo de Krebs en *C. sorokiniana* tras su exposición a Cd. Los esquemas del catabolismo del almidón, glucólisis, gluconeogénesis y ciclo de Krebs muestran las proteínas inducidas en Cd con flechas verdes y las reprimidas con flechas rojas. Las proteínas representadas son: α -1,4 glucanfosforilasa (α -GPP), α -amilasa (α -Ami) y 4- α -glucanotransferasa (α -GT) para el catabolismo del almidón; hexoquinasa (HK), glucosa 6-fosfato isomerasa (PGI), 6-fosfofructoquinasa (PFK), aldolasa, triosa fosfato isomerasa (TPI), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), fosfoglicerato quinasa (PGK), fosfoglicerato mutasa (PGM), enolasa, piruvato quinasa (PK), piruvato deshidrogenasa (PDH) y acetil CoA sintetasa (ACS) para la glucólisis; piruvato carboxilasa (PC), piruvato carboxiquinasa (PCK), fructosa-1,6-bifosfatasa (FP) y glucosa 6-fosfatasa (GP) para la gluconeogénesis; y citrato sintasa (CS), actinasa (AC), isocitrato deshidrogenasa (IDH), α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH), succinil CoA sintasa (SCS), succinato deshidrogenasa (SDH), fumarasa (FM), y malato deshidrogenasa (MDH) para el ciclo de Krebs.

La exposición de *C. sorokiniana* al Cd produjo una represión de algunas enzimas del ciclo de Krebs (Figura 4.11; Tabla 4.3), siendo la represión estadísticamente significativa en el caso de la citrato sintasa (1,9 veces), la fumarasa (1,6 veces) y la succinato deshidrogenasa (2,3 y 1,7 veces). No obstante, el ciclo de Krebs no sufre excesivas alteraciones, lo que está de acuerdo con lo reportado previamente en plantas, donde sólo algunas de las enzimas se ven reprimidas en presencia de Cd (He et al. 2019). Este hecho podría ocurrir para mantener el soporte de poder reductor en la célula bajo condiciones de estrés. Además, en presencia de Cd, la expresión de la piruvato deshidrogenasa también se encuentra inducida (Tabla 4.3), lo que apoyaría este postulado.

4.3.7. Alteraciones en la asimilación y el metabolismo del nitrógeno y el azufre

La fuente de N que se utilizó para el cultivo de *C. sorokiniana* fue amonio, que es la fuente preferida por las microalgas y se asimila a través del ciclo GS-GOGAT, así como de manera alternativa a través de la GDH (Vega, 2019). Los resultados de este estudio muestran una inducción de este ciclo debido al efecto del Cd, principalmente en el caso de la GOGAT (3,2 veces); (Figura 4.12; Tabla 4.3). Por otra parte, la enzima GDH se encuentra levemente inducida (1,1 veces), lo que concuerda con los resultados de expresión génica y actividad enzimática previamente mostrados en las Figuras 4.3 y 4.5. Este aumento observado en la GDH, puede ser debido al papel que juega en la reasimilación del amonio producido durante la fotorrespiración (Mifflin y Habash, 2002), que como previamente se ha indicado se encuentra inducida (Figura 4.9B); o bien en su participación en el aporte de glutamato necesario para la síntesis de GSH o de las PCs (Devriese et al. 2001). Además, diferentes estudios realizados con *Chlamydomonas reinhardtii* también han mostrado un incremento de la actividad GDH bajo diferentes condiciones de estrés, como el tratamiento con metales pesados, la alta salinidad o la alta luz (Domínguez et al. 2003).

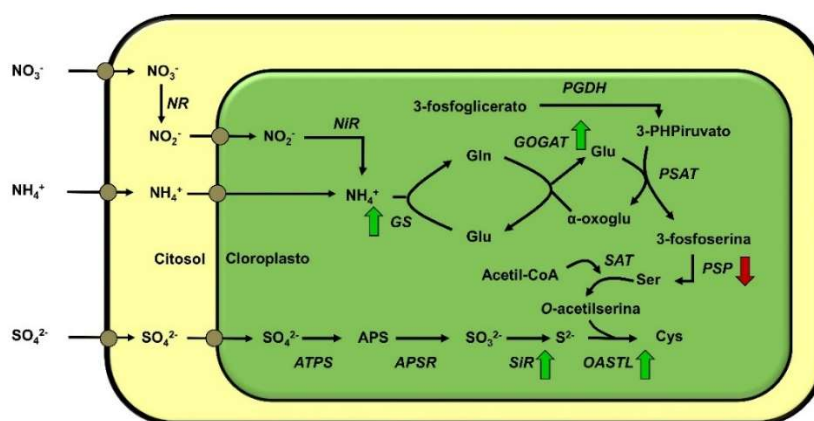


Figura 4.12. Cambios del proteoma en la ruta de asimilación del N y el S cuando *C. sorokiniana* es cultivada con Cd. Se representan las rutas de asimilación del N y el S, donde las proteínas inducidas en los cultivos de Cd están indicadas por las flechas verdes, y las reprimidas, por las flechas rojas. Las proteínas representadas son: nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NiR), glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) en la asimilación del N; y fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH), fosfoserina transaminasa (PSAT), fosfoserina fosfatasa (PSP), ATP-sulfurilasa (ATPS), adenosina-fosfosulfato reductasa (APSR), sulfito reductasa (SiR) y O-acetilserina (tiol)-liasa (OASTL), en la asimilación del S.

Por otra parte, el azufre es otro elemento esencial en el crecimiento de las microalgas, y los resultados de este estudio muestran una inducción general de la ruta de asimilación del S cuando se cultivó *C. sorokiniana* con Cd (Figura 4.12; Tabla 4.3). Las enzimas afectadas en el proteoma de *C. sorokiniana* fueron la sulfito reductasa y la OASTL, que aparecen inducidas de forma significativa (2,3 y 1,5 veces, respectivamente). Además, los resultados previamente mostrados de actividad enzimática y expresión génica indicaban también una inducción en la enzima OASTL cuando *C. sorokiniana* es cultivada con la misma concentración de Cd (Figura 4.3 y 4.5). Resultados previos en *Chlamydomonas reinhardtii* muestran que la presencia de Cd en el medio además incrementa el consumo de sulfato en un 40% (Vega et al. 2006), confirman nuestros resultados.

La inducción de la asimilación de N y de S, por Cd, genera un aumento de la concentración de glutamato y cisteína y, junto con la inducción de la producción de glicina por la fotorrespiración (Figura 4.9B), provoca un aumento de la expresión de los aminoácidos precursores de las PCs,

que se han descrito como elemento de detoxificación para el estrés producido por Cd (Morelli y Scarano, 2004).

4.3.8. Cambios causados por el cadmio en la síntesis de aminoácidos

Además del aumento anteriormente indicado en la síntesis de glutamato y cisteína, la producción de glicina y serina, en *C. sorokiniana*, fue también inducida de manera estadísticamente significativa por la exposición a Cd, a través de la serina hidroximetiltransferasa, la alalina aminotransferasa y la alanina-glioxilato aminotransferasa (1,8, 1,6 y 2,2 veces, respectivamente), en el caso de la glicina; y la fosfoserina fosfatasa y la serina/treonina fosfatasa (1,8 y 2,5 veces, respectivamente), en el caso de la serina. Previamente se ha mencionado que la glicina interviene en la síntesis de GSH y PCs, por lo que parece lógico una inducción de su síntesis bajo el estrés provocado por el Cd. Por otra parte, la serina es necesaria para la síntesis de cisteína y glicina y, por lo tanto, también para la obtención de GSH y PCs (Zhou et al. 2017), por lo que también parece normal que la microalga también responda aumentando la síntesis de este aminoácido. Además, se ha puesto de manifiesto en un reciente estudio transcriptómico la importancia de la enzima serina/treonina fosfatasa cuando la microalga *Ochromonas sp.* está sometida a estrés abiótico, como elemento mitigador del mismo (Zhang et al. 2018).

4.3.9. Efectos del cadmio en las proteínas ribosomales

Los ribosomas tienen un rol principal en el metabolismo de proteínas, por lo que es necesario saber cómo afecta la exposición de Cd a la expresión de proteínas ribosomales. Los resultados proteómicos en *C. sorokiniana* mostraron que 30 proteínas relacionadas con los ribosomas se encontraron reprimidas en presencia de Cd (Figura 4.9), mientras que 9 de ellas, principalmente se la subunidad mayor del ribosoma, se encontraron inducidas. Esta represión general de las subunidades ribosomales podrían ser la causante de la menor concentración de proteínas observada en *C. sorokiniana* cuando es sometida a condiciones de estrés, de acuerdo con los resultados de concentración de los extractos crudos cultivados con Cd ($1,1 \text{ mg ml}^{-1}$ en los cultivos control frente a $0,7 \text{ mg ml}^{-1}$ en los cultivos sometidos a tratamiento de Cd). Además, estudios transcriptómicos similares han reportado la represión de las proteínas ribosomales, en plantas y otras microalgas clorofitas, cuando se cultivaron con Cd en el medio (Zhu et al. 2018; Zhu et al. 2019).

4.3.10. Otras alteraciones inducidas por cadmio

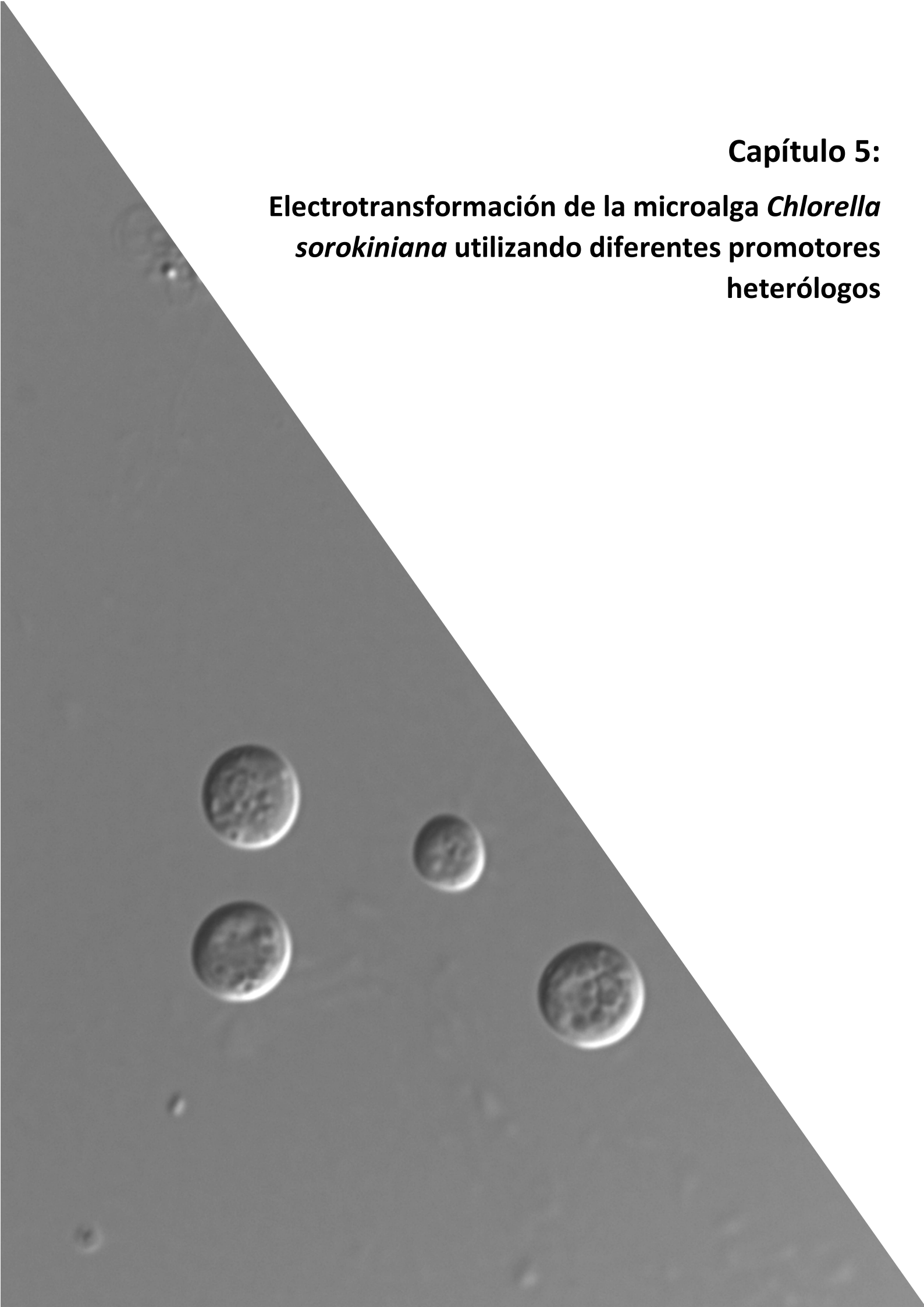
Además de las rutas anteriormente indicadas, existen otras que también pueden ser susceptibles al estrés metálico, como pueden ser las implicadas en la síntesis de lípidos o de carotenoides. En *C. sorokiniana* sometida a estrés por Cd, los resultados muestran una fuerte inducción de la acil-ACP desaturasa (5,6 veces), enzima que participa en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (Tabla 4.3). Sin embargo, también se puede observar una represión general en la biosíntesis de glicerolípidos en estas condiciones. Esta respuesta concuerda con los resultados morfológicos de las células de *C. sorokiniana* (Figura 4.6C y E), puesto que la represión de la producción de glirerolípidos puede causar daños en la pared celular y modificar su estructura, tal y como aparece en las imágenes, y como se ha descrito en *Euglena gracilis* (Einicker-Lamas et al. 1996).

Por otra parte, este estudio proteómico no reveló excesiva información sobre la ruta de la carotenogénesis, ya que tan solo se cuantificaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la zeaxantina epoxidasa (ZEP) y la ξ -caroteno desaturasa (ZDS). La ZEP es una

enzima que cataliza la conversión de zeaxantina en violaxantina y que en este caso se encuentra reprimida (1,7 veces). Esto puede deberse a que, bajo situaciones de estrés, la acumulación de zeaxantina se encuentra inducida (Varela et al. 2015), por lo que esta enzima se hace menos necesaria para la célula. Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado, que la expresión génica de la ZEP en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* se encuentra reprimida, y el equilibrio zeaxantina-violaxantina desplazado hacia el primer compuesto, en condiciones de estrés tales como alta luz o carencia de nitrógeno en el medio (Couso et al. 2012). La ZDS, también reprimida en los cultivos tratados con Cd (2,5 veces), participa en la desaturación del fitoeno, que comprende los pasos desde fitoeno, mediados por la fitoeno desaturasa (PDS) y por la ZDS, a trans licopeno. Estas dos enzimas tienen un mecanismo común y utilizan plastoquinona (PQ) como aceptor de H, conectado esta ruta con la cadena de transporte de electrones de la fotosíntesis (Grossman et al. 2004). Debido a que la presencia de cadmio provocó una represión de la fotosíntesis (Figura 4.9A), existe una baja capacidad de oxidación del plastoquinol para regenerar la PQ, por lo que habría una baja disponibilidad del aceptor de H necesario para el funcionamiento de esta enzima, al igual que se ha observado en estudios previos con *Euglena gracilis* en condiciones de estrés (Kato et al. 2019).

Capítulo 5:

Electrotransformación de la microalga *Chlorella sorokiniana* utilizando diferentes promotores heterólogos



Resumen

En este Capítulo se describe la optimización del proceso de electroporación para la transformación de la microalga *Chlorella sorokiniana* utilizando el gen de resistencia a la paromomicina, aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (*APHVIII*) de *Streptomyces rimosus*, como marcador selectivo. Este gen fue expresado bajo el control de tres promotores heterólogos diferentes: el del gen del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV 35S*), el de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (*NOS*) y el promotor híbrido *HSP70A/RBCS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*. A partir del número de transformantes obtenidos se pudo concluir que el promotor *CaMV 35S* fue el más eficiente de los tres para *Chlorella sorokiniana*. Además, se corroboró la presencia del gen marcador en el genoma de *Chlorella sorokiniana* mediante PCR, así como su expresión, tanto a nivel de transcritos como a nivel de proteínas, mediante RT-PCR y *western blot*, respectivamente. Finalmente, se desarrolló un método de criopreservación de los transformantes a -80 °C para su conservación durante largos periodos de tiempo.

Abstract

In this chapter, an electroporation procedure was optimized for the nuclear transformation of *Chlorella sorokiniana*, using the paromomycin resistance aminoglycoside 3'-phosphotransferase (*APHVIII*) gene from *Streptomyces rimosus* as selective marker. The *APHVIII* gene was expressed under the control of three different heterologous promoters, such as those from the cauliflower mosaic virus 35S RNA gene (*CaMV 35S*), the nopaline synthase (*NOS*) gene from *Agrobacterium tumefaciens*, and the hybrid *HSP70A/RBCS2* promoter from *Chlamydomonas reinhardtii*. Transformants were obtained for all the promoters tested, being the *CaMV 35S* promoter the most efficient one. The presence of the marker gene in the genome of *C. sorokiniana* transformants was demonstrated by PCR and its expression was detected, both at transcript and protein levels, by RT-PCR and western blot analysis, respectively. In addition, a method for long-term cryopreservation of the transformant lines at -80 °C has been optimized.

5.1. Introducción

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de organismos fotosintéticos con un gran potencial biotecnológico, cuyo interés ha ido creciendo en los últimos años gracias a sus aplicaciones como combustibles de tercera generación o a su capacidad de producir compuestos de alto valor añadido (Chia et al. 2018; Henley et al. 2019). Uno de los retos más importantes es incrementar la productividad de biomasa de estos organismos con el fin de obtener bioproductos con unos precios más competitivos en el mercado, especialmente en el caso de biocombustibles. Para ello se están llevando a cabo intensas campañas de prospección con el fin de aislar e identificar nuevas especies de microalgas con mejores tasas de crecimiento y contenido en los productos deseados, además de estudios para mejorar el diseño de fotobiorreactores que permitan la producción eficiente y económicamente competitiva de microalgas a gran escala. Destacan también los intentos para mejorar los fenotipos de las cepas conocidas, con el fin de lograr cepas mejoradas con mayor potencial biotecnológico, siendo la ingeniería genética la estrategia más prometedora, según indican muchos autores (Fajardo et al. 2019; Sharma et al. 2018).

La microalga más estudiada y la primera cuyo genoma fue modificado genéticamente es la clorofita *Chlamydomonas reinhardtii*, que continúa siendo, tras más de 30 años, el organismo modelo para las herramientas bioinformáticas desarrolladas en microalgas (León-Bañares et al. 2004). Sin embargo, los recientes éxitos obtenidos en la modificación genética de otras microalgas de interés aplicado como *Nannochloropsis gaditana* (Ajjawi et al. 2017), *Tetraselmis chuii* (Úbeda-Mínguez et al. 2017) o *Pavlova lutheri* (Prasad et al. 2019a) han estimulado la investigación en este campo. No obstante, aunque el número de microalgas modificadas genéticamente continúa creciendo, todavía existen limitaciones importantes para conseguir la expresión estable y eficiente de genes exógenos en microalgas, como la baja eficiencia de la transformación, la falta de promotores u otras secuencias reguladoras adecuadas, o la inestabilidad de los transformantes (León-Bañares et al. 2004).

Otro problema adicional es el mantenimiento de los transformantes obtenidos durante largos periodos de tiempo, puesto que los subcultivos sucesivos requieren gran esfuerzo y suponen un riesgo de contaminaciones o variaciones clonales. La criopreservación surge como una excelente opción para solventar estos inconvenientes, ya que puede detener la actividad celular y preservar la viabilidad del cultivo, así como la integridad del genoma durante largos periodos de tiempo (Kirsop, 1984). Muchos estudios han demostrado la viabilidad de la criopreservación de un gran número de especies de microalgas en N₂ líquido (Nakanishi et al. 2012; Wahyu et al. 2016). Sin embargo, este método supone altos costes, frente a lo que surge el método de criopreservación a -80 °C, que se está empezando a implantar en algunas especies (Fernandes et al. 2019; Garrido-Cárdenas et al. 2019).

Uno de los organismos más prometedores desde el punto de vista biotecnológico es la microalga *C. sorokiniana*. El gran potencial biotecnológico de esta especie, así como su alta velocidad de crecimiento y su robustez, hacen de *C. sorokiniana* una microalga prometedora para su desarrollo industrial a gran escala (Marchelo et al. 2018). Sin embargo, a pesar de diversos intentos, todavía no se ha podido establecer un método eficaz de modificación genética de esta microalga que permita obtener transformantes estables. Por ello, en este Capítulo se desarrolla un método de electrotransformación para la manipulación genética de las células intactas de *C. sorokiniana*, utilizando diferentes promotores heterólogos, con el fin de comprobar la expresión del gen de resistencia a la paromomicina aminoglicósido 3-fosfotransferasa (*APHVIII*) de *Streptomyces rimosus*.

5.2. Optimización del método de electroporación para la microalga *Chlorella sorokiniana*

El método de electroporación es el más utilizado para la manipulación genética de microalgas del género *Chlorella* tales como *C. vulgaris* (Kumar et al. 2018), *C. pyrenoidosa* (Run et al. 2016) o *C. zofingiensis* (Liu et al. 2014). No obstante, también se han transformado especies de *Chlorella* con otras aproximaciones metodológicas como el bombardeo de partículas (Dawson et al. 1997), la transformación de protoplastos (Liu et al. 2013) o la transformación mediada por *Agrobacterium* (Norashikin et al. 2018), aunque no de manera generalizada ni con tanta eficiencia.

A pesar de que para varias especies del género *Chlorella* se han establecido protocolos de manipulación genética que generan transformantes estables, no sucede así en *C. sorokiniana*. La aproximación más cercana a la obtención de transformantes de esta microalga fue realizada por Dawson y colaboradores (1997), que obtuvieron transformantes estables a partir de una estirpe de *C. sorokiniana* deficiente en nitrato reductasa (NR) a la que se le introdujo mediante bombardeo de partículas el gen que codifica a la NR de *C. vulgaris*. Sin embargo, este método no es aplicable a la estirpe silvestre, ya que esta aproximación requiere la generación previa de mutantes deficientes en NR mediante mutación aleatoria, lo cual es estadísticamente muy difícil y, como consecuencia, se ve invalidado como método generalizado de manipulación de *C. sorokiniana*. Frente a este procedimiento, la electroporación surge como un método capaz de solventar los problemas causados por la pared celular, y así mejorar la eficacia de la manipulación genética de la estirpe silvestre.

Para la optimización del protocolo de transformación para *C. sorokiniana*, el primer paso fue optimizar los parámetros clave de la electroporación, que son el voltaje del pulso eléctrico, el número de pulsos y la osmolaridad del medio. Las condiciones de osmolaridad fueron las primeras en definirse, para lo que se utilizó una disolución no iónica de glicerol (50 mM) con la que se les hizo un pretratamiento a las muestras, lavando la mismas 3 veces con esta solución. Se probaron también otras opciones, como menor número de lavados o la utilización de una disolución con 10 mM de Tris-HCl y 10 mM de glicerol, sin embargo, con estas alternativas se produjeron errores de transmisión de corriente eléctrica durante la electroporación, por lo que se fijó la solución de glicerol 50 mM para los siguientes ensayos.

Para la selección de las otras dos condiciones de electroporación se utilizó el gen de *Streptomyces rimosus* APHVIII sin promotor. Este gen, codifica para la aminoglicósido 3-fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico paromomicina, y ha sido testado previamente en nuestro laboratorio de forma exitosa en la transformación de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Díaz-Santos et al. 2013). La expresión del gen APHVIII sin promotor va a depender de su inserción en una región adyacente a un promotor endógeno o en fase de lectura con un gen nativo, y se verá influenciada por la presencia de regiones reguladoras exógenas. Además, para que la cantidad de ADN no sea el factor limitante, se añadieron a cada muestra a electroporar 40 µg de ADN. En el proceso de optimización se varió el voltaje utilizado y el número de pulsos, y los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.1, donde se aprecia que ambos factores afectan al número de transformantes obtenidos. Se puede comprobar que con un único pulso el número de transformantes es muy bajo, al igual que con un voltaje menor de 2,5 kV. Las condiciones óptimas extraídas de la Tabla 5.1. son 2,5 kV y 3 pulsos, donde se obtuvieron una media de 800 transformantes por reacción, y que serán los parámetros utilizados para los siguientes experimentos. Los resultados obtenidos están de acuerdo con estudios previos que muestran que, en general, para la electroporación de microalgas o plantas

se requieren voltajes altos, como ocurre en el caso de *C. pyrenoidosa* que, para su electroporación se utilizaron 3,3 kV (Run et al. 2016), en *Dunaliella salina*, que requirió 6 kV (Geng et al. 2003); o en *Chlamydomonas reinhardtii*, que fue electroporada con un voltaje de 3,3 kV (Wang et al. 2019).

Tabla 5.1. Eficiencia de la transformación de *C. sorokiniana* bajo diferentes condiciones de electroporación.

Voltaje (KV cm)	Número de pulsos	Número de transformantes
1,8	2	0
1,8	3	0
2,5	1	0
2,5	2	80±13
2,5	3	800±46
3,0	1	2±0,4
3,0	2	15±1
3,0	3	350±22

El número de transformantes es la media aritmética de 3 experimentos independientes (n=3).

5.3. Transformación de *Chlorella sorokiniana* con el gen *APHVIII* bajo el control de tres diferentes promotores heterólogos

La elección de promotores altamente activos es uno de los factores más importantes para el desarrollo de un método de manipulación genética eficaz, así como para asegurar la alta expresión de proteínas heterólogas en las microalgas. Aunque las transformaciones con mayor eficiencia suelen obtenerse con promotores endógenos, tal y como se ha descrito en otras especies microalgales, como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Phaeodactylum tricornutum* (León-Bañares et al. 2004), *Ostreococcus tauri* (Chen y Hu, 2019) o *Dunaliella salina* (Feng et al. 2014), el objetivo de encontrar promotores universales capaces de generar transformantes de una amplia variedad de microalgas hace que la búsqueda de promotores heterólogos universales sea una técnica que, a largo plazo, pueda dar mejores resultados. En el presente estudio se han utilizado 3 promotores heterólogos para conseguir la expresión del gen de resistencia a paromomicina *APHVIII* en *C. sorokiniana*: el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (*CaMV 35S*), el promotor de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (*NOS*) y el promotor híbrido *HSP70A/RBCS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las construcciones de los plásmidos (Figura 2.3) se sintetizaron en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Díaz-Santos et al. 2013).

Tras la electroporación, los transformantes obtenidos fueron sembrados en placas con una concentración de 100 µg ml⁻¹ de paromomicina con el fin de seleccionar los que presentaban resistencia al antibiótico. Los resultados de la Figura 5.1 y la Tabla 5.2 muestran que el número de transformantes obtenidos bajo los promotores *CaMV 35S* y *NOS* fue mucho mayor que el número de transformantes obtenidos bajo el promotor *HSP70A/RBCS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*, a pesar de la mayor proximidad filogenética entre ésta y *C. sorokiniana*. No obstante, el promotor *HSP70A/RBCS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* se ha utilizado de manera exitosa en microalgas como *Porphyridium purpureum* (Prasad et al. 2019b) o *C. ellipsoidea* (Liu et al. 2014), por lo que era lógico pensar que podría tener una buena eficiencia en *C. sorokiniana*. Los

resultados de los transformantes obtenidos (Figura 5.1) muestran el acierto de la utilización de promotores heterólogos en la electroporación de *C. sorokiniana*

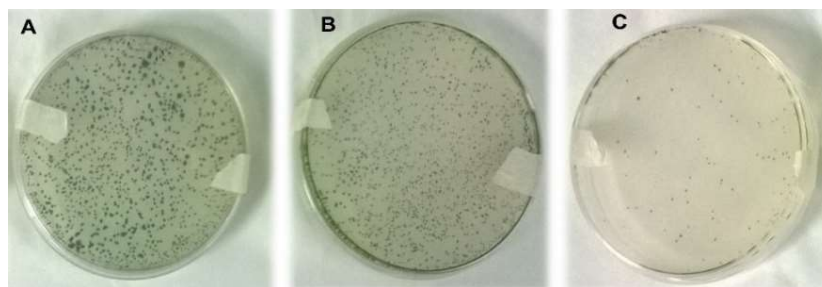


Figura 5.1. Colonias de *C. sorokiniana* que mostraron resistencia a la paromomicina después de la electroporación con el gen *APHVIII*. Las células fueron transformadas con 10 μg de ADN que contenía el gen *APHVIII* con los promotores *CaMV 35S* (A), *NOS* (B) y *HSP70A/RBCS2* (C). El procedimiento de electroporación se llevó a cabo según las condiciones optimizadas y las colonias aparecieron tras 15 días en incubación en las placas con paromomicina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$).

En la Tabla 5.2 se puede observar que la eficiencia de la transformación con el promotor del virus del mosaico de la coliflor *CaMV 35S* es 1,5 veces mayor que al utilizar el promotor de la nopalina sintasa (*NOS*) de *Agrobacterium*, y más de 3 veces mayor que con el *HSP70A/RBCS2*. Los resultados de los dos promotores con mayor eficiencia son inversos a los reportados en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (Díaz-Santos et al. 2013), aunque no existen más trabajos con el promotor *NOS* que puedan aportar más claridad al motivo por el que esto sucede. Sin embargo, el promotor *CaMV 35S*, típicamente utilizado en plantas superiores, ha sido bastante usado también en otras microalgas como *Pavlova lutheri* (Prasad et al. 2019a), *C. ellipsoidea* (Liu et al. 2013), o *Nannochloropsis sp.* (Cha et al. 2011) con diversos resultados. En muchos de estos casos, la expresión de los genes foráneos fue muy baja y no se ofrecen datos de la estabilidad de los transformantes. En otros casos, los transformantes tuvieron una expresión inicial buena, pero fue progresivamente perdiendo la resistencia al gen selectivo debido a un fenómeno de silenciamiento (Doron et al. 2016). Estos problemas de silenciamiento o baja expresión pueden ser debidos al promotor (Úbeda-Mínguez et al. 2017) o a que algunos genes marcadores se suelen mostrarse particularmente susceptibles al silenciamiento, como el caso del silenciamiento del ARNi del gen *AAD* de *Chlamydomonas reinhardtii* (Yamasaki et al. 2008), o del gen de la β -glucoronidasa (*GUS*) de *Phaeodactylum tricornutum* (Cerutti et al. 2011).

Tabla 5.2. Eficiencia de la transformación de *C. sorokiniana* con diferentes promotores.

Construcción genética	Número de transformantes por reacción	Eficiencia de la transformación (transformantes célula ⁻¹ μg^{-1} DNA)
<i>CAMV 35Sp-APHVIII-NOster</i>	917 \pm 45	9,2 x 10 ⁻⁷
<i>NOSp-APHVIII-NOster</i>	694 \pm 26	7,0 x 10 ⁻⁷
<i>HSP70A/RBCS2p-APHVIII-RBCS2ter</i>	252 \pm 31	2,6 x 10 ⁻⁷

El número de transformantes es la media aritmética de 5 experimentos de transformación (n=5). Las reacciones se realizaron con los parámetros optimizados obtenidos en la Tabla 5.1. Más información sobre las construcciones en el Capítulo 2.

5.4. Análisis de la integración de los transgenes y su expresión

Para confirmar la integración y la expresión del ADN introducido en *C. sorokiniana* se seleccionaron 21 colonias de entre los transformantes que tuvieron resistencia al antibiótico (7 de cada promotor) y se inocularon en medio de cultivo suplementado con paromomicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), dejándolos crecer hasta alcanzar la fase exponencial. A continuación, se extrajo el ADN genómico de los transformantes y se analizó por PCR la presencia del gen *APHVIII*. Los resultados muestran un fragmento amplificado en todos los transformantes, de unas 360 pb, correspondiente al gen que codifica la *APHVIII* (Figura 5.2A), lo que confirma la integración de este gen marcador en el genoma de los transformantes de *C. sorokiniana*.

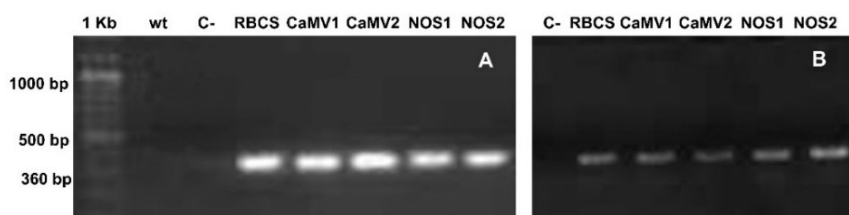


Figura 5.2. Detección del gen *APHVIII* en las colonias de *C. sorokiniana* crecidas en paromomicina tras la electroporación. Bandas de ADN genómico (A) y cDNA (B) de diferentes colonias de *C. sorokiniana* resistentes a la paromomicina obtenidas tras la realización de las PCR. La banda que aparece a 360 pb es el fragmento que codifica al gen *APHVIII*. En el caso del ADN genómico se incluyó una muestra de *C. sorokiniana* no sometida a la transformación (wt) como control negativo, además del control negativo incluido en la PCR sin ADN (C-). Las demás muestras fueron transformantes con los promotores *HSP70A/RBCS* de *Chlamydomonas reinhardtii* (RBCS), el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV1; CaMV2), el promotor de la nopalinasintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS1; NOS2).

Además, se probó la eficiencia de los 3 promotores en la expresión de los transcritos de *APHVIII*. Como se puede comprobar en la Figura 5.2B, la presencia de banda de cDNA confirma que el gen *APHVIII* se está expresando correctamente, obteniéndose además altos niveles de expresión del transcrito correspondiente. Del mismo modo, se realizaron análisis de inmunodetección utilizando anticuerpos anti *APHVIII*, que permitieron detectar, en todos los transformantes seleccionados, la presencia de una proteína de unos 29 kDa, correspondiente a la proteína *APHVIII* (Figura 5.3). Todos estos resultados confirman que la utilización de los promotores *CaMV 35S*, *NOS* y *RBCS2/HSP70A* con el gen marcador *APHVIII* provocan una integración estable del ADN en *C. sorokiniana*, generando transformantes con un alto nivel de expresión génica y de proteínas. Resultados similares con los promotores de los genes *CaMV 35S* y *NOS* fueron reportados previamente por nuestro grupo de investigación para la obtención de transformantes estables en *Chlamydomonas reinhardtii* (Díaz-Santos et al. 2013).

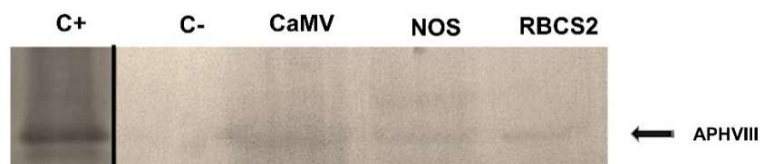


Figura 5.3. Análisis mediante *western blot* de los transformantes de *C. sorokiniana* electroporados con el gen *APHVIII*. Los extractos crudos fueron preparados tal como se describe en el Capítulo 2 para el *western blot*. La proteína de 32 kDa *APHVIII* fue detectada mediante anticuerpos policlonales de conejo anti-*APHVIII* en base a la actividad de los anticuerpos secundarios utilizados. Se incluyó un control positivo con 10 mg de la proteína *APHVIII* purificada (C+) y un extracto crudo de *C. sorokiniana* no transformada (C-).

5.5. Criopreservación de los transformantes obtenidos

El mantenimiento de los transformantes mediante sub-cultivos sucesivos es costoso, con riesgo de contaminación y pérdida de estabilidad de los mismos; además, los transformantes pueden estar expuestos a fenómenos de silenciamiento postranscripcional (Teco-Bravo et al. 2019). Para evitar estos problemas se ha puesto a punto un método de criopreservación para *C. sorokiniana* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los criopreservantes utilizados fueron dimetilsulfóxido (DMSO) y etilenglicol (EG), que se adicionaron a concentraciones de entre el 5 y el 10% v/v. Los resultados (Tabla 5.3) mostraron que, en células conservadas con EG al 5%, la viabilidad fue de hasta 1 año a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mostrando tasas de supervivencia de en torno al 6% de las células iniciales y tiempo de recuperación de menos de 4 días. Sin embargo, las concentraciones de DMSO por encima del 5% fueron tóxicas para *C. sorokiniana*. Además, las otras combinaciones de DMSO y EG mostraron tiempos de supervivencia inferiores a los observados para una concentración de EG al 5%, pasando de 365 días de viabilidad a 180, 120 ó 60 (Tabla 5.3). Aunque $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no es una temperatura a la que se detiene el tiempo biológico de las microalgas (Krisop, 1984), es una alternativa que evita el aporte continuo de N_2 . Recientes estudios muestran que es posible el desarrollo de un método de criopreservación a esta temperatura para microalgas como *Tetrademus obliquus* (Garrido-Cárdenas et al. 2019), *C. vulgaris* (Kapoor et al. 2019), *Desmodesmus pinosus* o *Chlamydomonas biconvex* (Fernandes et al. 2019), durante periodos de tiempo de entre 4 meses y 3 años.

Tabla 5.3. Porcentaje de células viables y tiempo de recuperación de *C. sorokiniana* criopreservada, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, con diferentes concentraciones de DMSO y EG, entre 1 y 365 días.

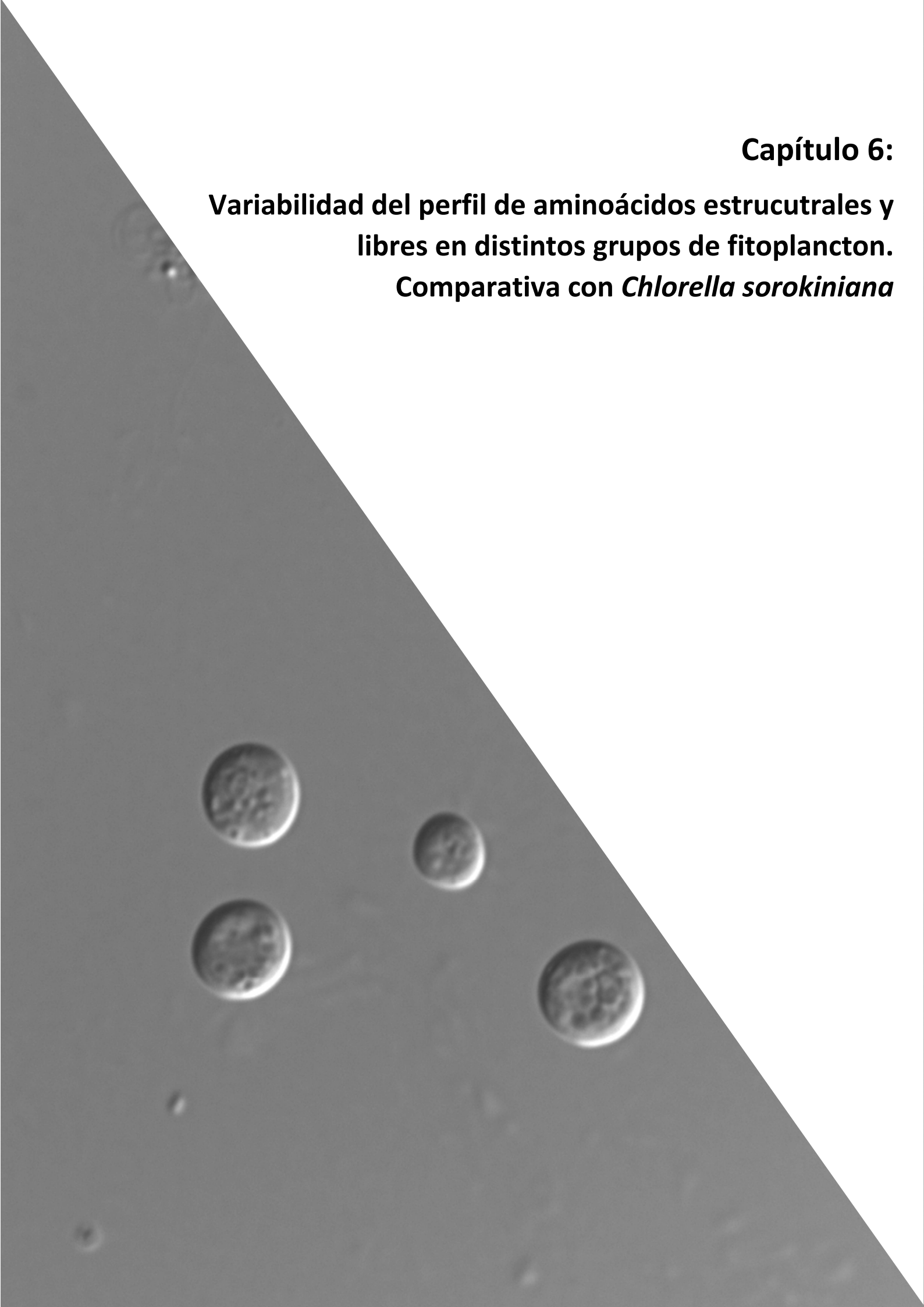
	5% DMSO+ 5% EG	5% DMSO	5% EG	5% DMSO + 10% EG	10% DMSO + 5% EG
% Células viables					
1 día	25,62±0,90	17,20±0,68	25,87±1,78	29,84±0,80	0
30 días	17,26±3,02	11,72±0,34	19,13±0,55	23,44±1,54	0
60 días	15,35±1,08	11,31±1,57	18,03±2,72	16,17±0,84	0
120 días	0	10,77±0,78	16,09±0,38	12,72±1,00	0
180 días	0	8,81±0,42	12,33±1,69	0	0
270 días	0	0	7,64±0,35	0	0
365 días	0	0	5,76±0,51	0	0
Tiempo de recuperación (días)					
1 día	4,58±0,04	6,01±0,10	2,77±0,08	3,90±0,17	0
30 días	4,64±0,06	6,85±0,11	3,70±0,25	3,78±0,27	0
60 días	4,87±0,13	6,53±0,03	3,78±0,19	4,73±0,17	0
120 días	0	6,45±0,06	4,59±0,10	4,01±0,11	0
180 días	0	7,22±0,23	3,76±0,12	0	0
270 días	0	0	4,01±0,47	0	0
365 días	0	0	3,62±0,21	0	0

El protocolo de criopreservación se llevó a cabo según lo descrito en el Capítulo 2. Los resultados son la media aritmética de 3 cultivos independientes.

Con estos resultados, se están llevando a cabo estudios de estabilidad de los transformantes de *C. sorokiniana* criopreservados con EG al 5% durante periodos de tiempo superiores a 365 días con el fin de corroborar que el gen mantiene el fenotipo.

Capítulo 6:

Variabilidad del perfil de aminoácidos estructurales y libres en distintos grupos de fitoplancton. Comparativa con *Chlorella sorokiniana*



Resumen

Las microalgas poseen un alto valor nutricional debido a su alto contenido en proteínas, que puede alcanzar hasta el 50-60% del total de su peso seco, en algunas especies. El género *Chlorella* es uno de los más utilizados para alimentación animal; sin embargo, otras especies son más utilizadas en acuicultura. Con todo esto, el número de estudios que se centran en el perfil aminoacídico de estos microorganismos y en su potencial como fuente de proteínas para acuicultura es mucho menor que los que existen en bacterias, hongos o plantas superiores. En este Capítulo, hemos estudiado mediante GC-MS el contenido en 17 aminoácidos en 57 especies de 8 *phyla* y 38 *genera* de microalgas. Para ello se determinaron los valores tanto de aminoácidos estructurales como de aminoácidos libres. Además, se ha realizado un estudio que relaciona la composición de aminoácidos con la clasificación taxonómica de cada microalga, demostrándose que el perfil de aminoácidos estructurales no está relacionado con la filogenia de las microalgas; mientras que el perfil de aminoácidos libres sí se relaciona con el desarrollo evolutivo de las mismas. Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio del porcentaje de aminoácidos esenciales, tanto de los diferentes *phyla* como de las especies de microalgas, siendo el *phylum miozoa* y las microalgas *Chroomonas salina* y *Ochromonas sp.* los de mayor valor nutricional en aminoácidos esenciales.

Abstract

Many microalgal species have a high nutritional value, with protein content between 50 and 60% of the dry weight in some microalgal species. The genus *Chlorella* is one of the most usual used for animal feed. However, other microalgae are more usual in aquaculture. In spite of this, the number of studies focused on the amino acids profile of microalgae is much more limited compared to other microorganisms such as bacteria, fungi or plants. In this chapter, the content of 17 amino acids, both structural and free amino acids, were determined by GC-MS in 57 species of microalgae, including 8 *phyla* and 38 *genera*. It has allowed to show that there is not a correlation between the profile of the structural amino acids and the microalgal phylogeny. On the other hand, the profile of the free amino acids shows a good correlation with taxonomic classification of microalgae. Finally, we have studied the percentage of essential amino acids in the different *phyla* and species concluding that the *phylum miozoa* and the species *Chroomonas salina* and *Ochromonas sp.* presented the highest nutritional value based on essential amino acids.

6.1. Introducción

Una de las principales características de las microalgas es su alto contenido en proteínas con alto valor nutricional gracias a su perfil aminoacídico, rico en aminoácidos esenciales (Lai et al. 2019). Durante décadas, estos microorganismos han sido utilizados en alimentación humana o animal. Además, el perfil proteico y aminoacídico de las microalgas juega un papel fundamental en la acuicultura, ya que las microalgas son imprescindibles en la alimentación acuícola. De hecho las microalgas son el principal alimento de moluscos, bivalvos y zooplacnton, que a su vez es esencial en la alimentación de larvas de peces. Las microalgas poseen altas concentraciones de proteínas de gran calidad y aparecen como una alternativa a las proteínas de baja calidad que actualmente se utilizan en alimentación acuícola (Shah et al. 2018). A pesar de estas ventajas, los estudios sobre el valor nutricional de las proteínas en microalgas son mucho menos frecuentes que los que se han realizado sobre otro tipo de componentes, como los ácidos grasos o los pigmentos. Además, la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con un número limitado de especies y casi sin diversificar grupos taxonómicos (Brown, 1991; Chau et al. 1967).

También, existen muy pocos datos sobre el perfil aminoacídico de las microalgas y su posible correlación con su diversidad taxonómica, que sería un primer paso para facilitar la selección de las mejores especies para su uso como suplemento proteico (Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2018). Los primeros trabajos sobre el perfil aminoacídico en microalgas describían poca variabilidad entre grupos taxonómicos (Brown, 1991; Brown y Jeffrey, 1992; Boyd, 1973; Chau et al. 1967). Sin embargo, estudios posteriores mostraron diferencias en el perfil de aminoácidos entre distintas especies (Dawczynskiet et al. 2007; Lourenço et al. 2004). No obstante, la mayor parte de los estudios realizados hasta ahora incluyen entre 12 y 20 géneros (Brown, 1991; Chau et al. 1967; Lourenço et al. 2004); y revelan una amplia variabilidad de datos según el estadio del cultivo, lo que complica aún más el establecimiento de una correlación clara entre el perfil aminoacídico y los grupos taxonómicos. Este problema es extrapolable también a los aminoácidos libres, sobre los que existen aún menos estudios (Derrien et al. 1998; Martin-Jezequel et al. 1988). Los aminoácidos libres tienen gran importancia en la nutrición acuática ya que son más accesibles para la alimentación y, por lo tanto, más fácilmente digeribles, lo que hace de ellos un parámetro sobre el que hay que profundizar (Ronnestad et al. 2000).

Por todo esto, en este Capítulo se ha llevado a cabo un estudio del perfil de aminoácidos de 57 especies de microalgas, de las cuales en 24 no se ha descrito aún su composición aminoacídica y entre las que se encuentra la microalga estudiada en esta tesis *C. sorokiniana*, con el fin de poder establecer una relación entre este perfil y la clasificación taxonómica de las microalgas, y seleccionar las que posean mejor perfil de aminoácidos esenciales (EAA), para su posterior uso como suplemento alimenticio en acuicultura.

6.2. Descripción del contenido de aminoácidos en las microalgas estudiadas

La descripción del contenido de aminoácidos, tanto estructurales como libres, se llevó a cabo en las 57 especies de microalgas recogidas en la Tabla 2.1, entre las cuales se pueden encontrar especies de agua dulce o especies marinas y, además, se pueden diferenciar 8 *phyla* y 38 *genera*, pudiendo ser clasificadas como 20 *chlorophytae*, 8 *haptophytae*, 8 *bacillariophytae*, 4 *ochrophytae*, 4 *cryptophytae*, 5 *miozoa*, 7 *cyanophytae* y 1 *rodophyta*, que al ser la única, será incluida en los estudios realizados dentro de las *chlorophytae*, que es el *phylum*

taxonómicamente más cercano. En todas estas especies se determinaron cuantitativamente un total de 17 aminoácidos. El glutamato y la glutamina, así como el aspartato y la asparragina se eluyen al mismo tiempo de retención debido a que el proceso de hidrólisis rompe el grupo amida de la glutamina y la asparragina, generando el mismo producto derivatizado que glutamato y aspartato. El aminoácido no determinado fue la arginina, debido a que el grupo guanidino no reacciona con los etil cloroformiatos y sus derivados no pueden ser eluidos en una columna de un GC (Walsh et al. 2014). Los datos del porcentaje en peso de cada aminoácido estructural y el contenido total de aminoácidos vienen descritos en la Tabla 6.1.

En la mayor parte de las especies, los aminoácidos estructurales mayoritarios son la combinación de glutamato y glutamina (Glx), aspartato y asparragina (Asx), además de los aminoácidos Leu, Ala y Lys. Por otra parte, los minoritarios en la mayor parte de las especies son Cys, His y Trp. Estos resultados son similares a los descritos previamente en bibliografía con diferentes especies de algas verdes (Brown y Jeffrey, 1992), o con especies de diferentes *phyla* combinadas (Brown, 1991; Lourenço et al. 2004; Teuling et al. 2017). Además, estos trabajos previos describen una alta variabilidad en el aminoácido Pro entre especies, que se ve reflejada también en los resultados presentados en este estudio. Cabe destacar que el porcentaje de EAA en este trabajo varía entre el 35,5% de las microalgas *Trebouxionophyceae sp.* y *Nannochloropsis gaditana CCMP256* y el 41,7% de las microalgas *Amphora sp.* y *Ostreopsis cf. ovata*, que son valores similares a los reportados por Lourenço y colaboradores (2004) o Teuling y colaboradores (2017), aunque inferiores a los reportados en otros estudios anteriores (Brown, 1991; Brown y Jeffrey, 1992). El porcentaje de EAA de *C. sorokiniana* se encuentra en el 37,4%, encontrándose en la posición 37 de 57 especies. Finalmente, el porcentaje de proteínas con respecto al peso seco es muy variable en función de la especie y va desde el 9,7% de la microalga *Unucellular Ulvophyceae sp.* o el 13,9 de la microalga *Chlorococccum sp.*, hasta el 45,2% de *Chroomonas salina* o el 46,3% de *Ochromonas sp.* En este caso, la microalga *C. sorokiniana* se encuentra en la posición 11 de 57 con un porcentaje del 38,6%, siendo un valor bastante destacable. Esta variabilidad en el contenido proteico ha sido descrita por varios autores, ya que la cantidad de proteína en el peso seco depende tanto de la especie, como del medio de cultivo utilizado y la fase de cultivo en el que se recoja la biomasa (Lourenço et al. 2004; Amorim et al. 2020). Aunque los datos de proteínas totales reportados mediante la medición de aminoácidos mediante GC-MS son algo menores que los de la bibliografía, hay que tener en cuenta que en nuestro caso no se contabiliza el total de la Arg, que puede representar entre el 7 y el 10% del total de los aminoácidos (Brown,1991), así como el de algunos aminoácidos minoritarios como la taurina o la ornitina que no aparecen en este trabajo.

Tabla 6.1. Perfil de aminoácidos estructurales determinado por GC-MS, en % del total; y % de proteínas en peso seco obtenido a partir de los valores cuantitativos del GC-MS de las microalgas estudiadas. Los valores de SD son menores del 5% en todos los casos.

	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Pro	Asx	Met	Glx	Phe	Cys	Lys	His	Tyr	Trp	% Prot
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8,26	6,29	4,25	9,27	4,13	5,10	2,43	6,81	10,80	2,83	20,57	5,11	0,43	6,32	1,30	3,70	2,40	40,3
<i>Chlamydomonas sp.</i>	10,53	6,91	3,39	7,31	4,74	5,77	3,07	5,23	9,54	3,60	17,10	5,92	0,72	8,77	1,43	4,28	1,70	21,4
<i>Chlorococcum sp.</i>	9,97	9,88	3,55	7,55	3,81	5,05	2,15	7,68	10,03	3,20	18,23	3,82	0,96	8,57	0,96	3,47	1,11	14,0
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	9,72	8,46	4,91	6,31	4,72	5,31	2,01	4,24	10,83	4,98	21,36	3,89	0,67	6,85	1,04	2,31	2,37	34,2
<i>Dunaliella bardawil</i>	9,34	6,95	2,56	9,49	5,47	5,49	1,84	6,17	10,54	2,56	20,67	4,59	0,92	7,78	1,08	2,92	1,63	33,8
<i>Dunaliella salina</i>	8,27	5,54	3,47	9,03	4,21	4,07	2,57	8,35	10,12	3,57	21,47	3,30	0,55	7,20	1,78	3,84	2,67	40,0
<i>Dunaliella sp.</i>	9,57	6,63	3,11	7,60	5,84	5,53	2,22	5,12	9,06	3,73	20,44	5,92	0,90	8,80	1,57	1,89	2,06	28,5
<i>Chlorella sorokiniana</i>	8,48	6,13	4,34	8,27	4,67	4,05	2,63	5,50	12,01	2,18	22,04	4,60	0,70	8,67	1,54	3,03	1,17	38,6
<i>Chlorella zofingiensis</i>	8,25	9,03	3,16	10,39	5,23	5,29	2,20	5,97	9,04	2,11	22,60	4,04	0,63	6,23	0,99	3,45	1,40	26,1
<i>Trebouxiophyceae sp. Shy 53</i>	8,34	7,04	2,98	8,42	5,14	4,96	2,76	7,33	10,33	2,33	22,70	3,11	0,78	7,81	2,06	2,71	1,19	29,8
<i>Picochlorum sp.</i>	8,53	6,36	3,14	5,15	5,42	5,38	2,06	8,64	12,19	3,60	19,78	6,81	0,86	7,41	0,90	2,16	1,61	36,0
<i>Picochlorum oklahomensis</i>	9,62	7,42	3,42	9,00	3,20	4,96	2,95	6,74	9,12	2,39	22,02	4,14	1,19	8,37	0,75	3,05	1,66	32,1
<i>Picochlorum maculatum</i>	9,24	6,53	4,21	7,93	4,28	4,82	2,65	7,40	10,41	3,23	18,14	4,35	0,82	9,75	1,44	3,01	1,80	23,4
<i>Picochlorum oklahomense Xmm 5W5</i>	8,78	7,22	3,05	8,24	3,45	5,63	2,52	7,39	14,78	2,95	19,03	5,44	0,52	6,10	1,06	2,31	1,52	34,2
<i>Tetraselmis suecica</i>	8,19	7,62	2,62	6,99	5,10	5,34	2,89	5,96	11,13	3,12	21,77	5,37	0,99	7,60	1,51	2,34	1,45	27,5
<i>Tetraselmis sp.</i>	9,05	7,71	3,19	8,04	5,61	5,31	3,00	6,67	8,49	3,35	18,02	7,56	0,99	7,54	1,14	2,81	1,50	30,0
<i>Tetraselmis rubens</i>	10,44	8,60	2,44	8,47	5,50	2,89	3,45	5,82	10,97	3,26	16,51	6,93	1,38	8,71	0,70	1,60	2,33	22,1
<i>Tetraselmis striata</i>	9,27	7,81	3,34	8,73	5,36	4,98	3,90	7,61	11,45	2,34	15,35	4,59	0,96	8,54	0,68	3,17	1,93	19,8

<i>Tabla 6.1 Continuación</i>	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Pro	Asx	Met	Glx	Phe	Cys	Lys	His	Tyr	Trp	% Prot
<i>Tetraselmis sp. CCMP881</i>	9,53	7,71	2,17	8,14	4,08	5,43	2,26	6,21	11,11	3,81	18,99	6,04	0,88	8,96	0,67	2,53	1,48	16,7
<i>Ulvophyceae sp.</i>	8,91	8,56	3,09	9,10	5,15	2,23	4,50	5,30	11,56	3,78	17,15	4,72	0,65	8,03	1,16	3,22	2,89	9,7
<i>Porphyridium cruentum</i>	9,93	7,33	3,85	6,94	4,70	3,97	2,41	6,24	12,97	3,51	15,85	5,97	0,50	9,51	1,84	2,79	1,68	37,7
<i>Exanemachrysis gayraliae</i>	9,08	9,32	3,38	7,41	5,34	4,18	2,38	4,81	11,30	3,74	19,35	5,77	0,99	8,77	1,09	1,94	1,14	35,1
<i>Diacronema vlkianum</i>	9,13	8,15	3,40	9,43	5,11	3,30	2,08	8,74	12,66	2,65	16,56	3,39	0,52	8,55	1,30	3,03	2,00	33,4
<i>Rebecca salina</i>	11,78	8,53	2,37	7,78	4,81	5,47	2,67	4,86	11,00	3,12	17,54	7,29	1,06	6,66	0,91	2,14	2,01	20,3
<i>Pavlova lutheri</i>	8,63	6,47	3,21	8,98	3,33	4,44	0,89	7,83	14,90	2,80	18,59	3,36	1,46	8,52	1,11	3,31	2,17	39,4
<i>Pleurochrysis cf. roscoffensis</i>	9,30	8,17	3,68	8,03	4,38	3,78	3,09	4,82	11,17	2,73	21,14	5,66	1,12	7,71	1,02	2,45	1,74	17,0
<i>Isochrysis galbana (Huelva)</i>	9,80	9,39	3,95	9,69	4,37	4,42	1,55	7,39	11,61	2,56	16,24	4,21	0,90	6,12	1,19	3,44	3,16	33,2
<i>Isochrysis galbana (Cádiz)</i>	11,61	8,74	2,03	8,64	6,24	4,24	2,44	6,11	10,69	1,95	16,14	5,72	1,12	7,10	1,70	2,82	2,71	25,5
<i>Dicarteria sp.</i>	9,53	8,67	3,30	7,76	5,77	5,30	1,93	6,45	13,24	3,59	15,55	6,03	1,04	6,80	0,39	3,35	1,30	33,1
<i>Phaelodactylum tricornutum</i>	9,52	7,51	3,25	7,66	5,68	5,28	3,21	6,48	11,99	3,68	18,06	4,66	0,58	7,31	1,45	2,39	1,29	33,6
<i>Thalassiosira sp.</i>	8,10	6,36	3,54	8,81	5,43	4,24	2,72	6,51	10,08	2,89	19,87	7,23	0,81	7,35	1,43	3,20	1,45	42,6
<i>Pleurosigma sp.</i>	9,49	6,53	2,97	10,64	5,02	3,13	4,43	5,79	14,20	2,16	13,48	7,14	1,27	8,77	1,39	2,27	1,31	17,0
<i>Amphora sp.</i>	9,44	7,51	4,23	7,79	3,96	3,05	4,37	4,20	12,90	4,34	17,15	7,58	0,68	7,87	0,68	2,48	1,79	21,8
<i>Cylindroteca closterium</i>	9,70	7,40	2,00	8,30	3,76	3,18	2,85	5,59	12,23	4,09	19,92	4,55	0,87	9,96	1,14	3,24	1,21	24,4
<i>Nitzschia auequorea</i>	10,82	7,67	3,00	7,72	5,22	6,12	2,72	6,23	13,44	3,93	13,71	6,06	0,55	9,11	0,38	1,11	2,23	23,9
<i>Chaetoceros gracilis</i>	9,52	7,50	3,08	8,57	5,77	5,12	1,77	5,07	12,32	3,10	20,24	3,52	1,20	7,58	1,34	3,20	1,09	30,6
<i>Nitzschia sp.</i>	10,49	9,21	3,47	7,57	4,34	3,91	2,75	4,29	9,50	1,68	20,92	5,34	1,07	8,97	1,34	3,95	1,20	15,3
<i>Ochromonas sp.</i>	8,88	7,10	3,46	9,38	5,40	4,44	2,01	5,77	11,34	3,84	18,88	4,38	0,49	7,59	1,57	4,05	1,41	46,3

<i>Tabla 6.1 Continuación</i>	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Pro	Asx	Met	Glx	Phe	Cys	Lys	His	Tyr	Trp	% Prot
<i>Nannochloropsis gaditana</i> <i>CCMP256</i>	9,48	7,45	2,53	7,73	4,06	4,82	2,41	8,59	11,63	2,04	19,82	4,53	0,45	8,63	0,66	3,09	2,06	29,6
<i>Chroomonas salina</i>	11,47	8,96	2,94	8,73	4,30	2,61	3,44	4,94	13,57	3,13	16,71	4,88	0,65	7,34	1,70	3,12	1,50	45,2
<i>Nannochloropsis gaditana</i> CAL4	9,71	8,70	3,30	8,16	4,65	3,81	3,69	6,26	14,06	2,35	14,11	6,97	1,38	7,92	0,94	2,48	1,52	25,4
<i>Nannochloropsis gaditana</i> IFB	9,05	8,32	2,97	7,13	5,48	5,12	3,35	6,45	13,92	2,63	15,96	6,07	0,66	7,59	0,85	2,42	2,04	42,4
<i>Cryptomonas</i> sp.	10,55	7,02	3,32	8,15	4,61	3,67	3,02	5,26	10,23	4,43	18,30	5,99	0,77	8,77	0,86	3,71	1,34	32,6
<i>Rhodomonas salina</i>	11,08	8,23	2,87	8,62	4,98	5,02	3,69	6,09	11,65	3,32	16,69	5,86	0,63	5,73	1,31	3,15	1,08	42,0
<i>Cryptoperidinosoid</i> sp. NOAA	10,07	8,13	2,09	8,63	5,72	2,51	3,42	5,57	10,79	4,60	18,08	6,17	0,52	8,41	0,81	2,85	1,61	33,2
<i>Gyrodinium dorsum</i>	10,19	7,57	3,25	6,80	4,51	4,61	3,97	3,94	11,23	3,34	18,75	7,35	0,71	7,49	1,11	3,65	1,53	37,5
<i>Ostreopsis cf ovata</i>	10,33	7,35	3,90	9,46	5,84	4,64	2,28	4,26	8,41	3,33	18,78	5,94	0,74	7,80	2,22	2,63	2,09	19,3
<i>Heterocapsa cf. pygmaea</i>	8,78	8,70	3,52	6,95	4,56	5,72	2,66	6,91	11,19	4,51	15,79	5,38	0,78	8,34	1,28	2,45	2,50	33,9
<i>Amphidinium carterae</i>	8,20	6,57	4,13	6,90	5,09	6,23	3,21	7,68	12,30	4,29	16,42	5,24	0,73	6,45	1,60	2,11	2,86	22,1
<i>Synechococcus</i> sp (red)	10,47	7,44	3,81	8,39	3,33	4,04	2,03	8,36	10,21	2,29	19,31	5,11	1,29	6,57	1,54	3,39	2,41	33,1
<i>Synechococcus</i> sp (green)	10,71	8,51	2,99	7,60	5,43	3,73	4,78	5,88	11,15	3,01	15,91	6,01	0,94	7,50	1,33	2,69	1,82	44,6
<i>Synechococcus</i> sp (brown)	10,42	8,58	1,65	6,17	6,13	2,72	4,49	3,25	13,96	3,88	17,83	6,97	0,69	9,87	0,59	1,94	0,86	30,1
<i>Cyanobacterium enrichment</i> <i>culture clone</i>	10,78	8,10	3,15	7,84	5,36	4,11	3,75	4,13	14,24	3,51	16,94	4,95	0,45	6,37	1,74	2,21	2,38	35,2
<i>Synechocystis</i> sp.	8,92	8,57	3,01	9,08	5,16	5,03	2,82	4,12	12,44	3,28	18,79	3,61	0,91	7,30	1,21	4,03	1,73	43,0
<i>Oscillatoria</i> sp.	10,46	6,73	3,10	7,65	4,31	3,93	2,68	4,48	13,12	3,40	17,29	7,12	0,79	7,63	1,81	3,88	1,63	41,1
<i>Anabaena flos aquae</i>	9,20	8,73	4,94	8,42	5,47	5,98	2,20	4,54	10,49	3,01	20,63	3,70	0,55	5,38	2,09	2,89	1,79	37,0

Por otra parte, el perfil de aminoácidos libres de las distintas especies estudiadas presenta una gran variabilidad (Tabla 6.2). Mientras que, en la mayor parte de los *phyla*, como en el caso de *chlorophyta*, *rhodophyta*, *cyanophyta*, *cryptophyta*, *bacillariophyta* o *miozoa* el aminoácido mayoritario es Glx, en el caso del *phylum haptophyta* el aminoácido que representa mayor porcentaje de peso es la Tyr (a excepción de la *Diacronema vlkianium*) y en el caso del *phylum ochrophyta* es la prolina. Aunque en los *phyla chlorophyta*, *rhodophyta*, *cyanophyta*, *cryptophyta*, *bacillariophyta* y *miozoa* el aminoácido mayoritario es Glx, existen grandes diferencias en el porcentaje, que van desde el 30-35% de Glx que poseen las *miozoae*, hasta el 85-90% que poseen las cianobacterias. Como consecuencia, algunos de estos *phyla* poseen también porcentajes importantes otros aminoácidos tales como Asx, Ala, Phe o Pro. Aunque no existen muchos estudios previos para el caso de los aminoácidos libres en microalgas, algunos describen que los aminoácidos mayoritarios para microalgas *chlorophyta* como *Chlamydomonas reinhardtii* o *C. pyrenoidosa* son Ala, Leu, Glu o Lys, coincidiendo con la mayor parte de los datos reportados en la Tabla 6.2 para microalgas del mismo género, entre ellas la microalga *C. sorokiniana* (Betancort-Rodríguez et al. 1997). Por otra parte, el estudio de Derrien y colaboradores (1998), que abarcó un mayor número de *phyla*, concluyó que los aminoácidos mayoritarios en la mayoría de las especies fueron Glu, Asp, Arg y Tyr, siendo secundarios Ala, Val, Phe y Lys. Además, este estudio mostró diferencias entre *phyla* (aunque no concluyentes debido al bajo número de especies estudiadas), puesto que mientras que la microalga haptofita *Isochrysis galbana* poseía mayoritariamente Tyr, la microalga clorofita *Tetraselmis suecica* y las diatomeas *Thalassiosira sp.*, *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros calcitrans* tuvieron mayor cantidad de otros aminoácidos como Glu, Ser o Asp. Por otra parte, el estudio de Martin-Jezequel y colaboradores (1988) concluyó que los aminoácidos mayoritarios en la mayor parte de las especies fueron Glu, Gln, Ser, Gly, Leu o Lys. Finalmente, estos estudios reportaron también diferencias significativas en el perfil de aminoácidos esenciales entre especies, sin embargo, estos resultados no pueden ser extrapolados a *genera* o *phyla* debido al bajo número de especies estudiadas (5 y 11, respectivamente).

Tabla 6.2. Perfil de aminoácidos libres determinado por GC-MS, en % del total en peso seco obtenido a partir de los valores cuantitativos del GC-MS de las microalgas estudiadas. Los valores de SD son menores del 5% en todos los casos.

	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Pro	Asx	Met	Glx	Phe	Cys	Lys	His	Tyr	Trp
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4,70	0,80	0,93	1,08	0,43	0,79	1,09	1,70	27,33	0,74	51,01	1,47	0,71	2,73	0,42	3,56	0,49
<i>Chlamydomonas sp.</i>	6,40	0,77	0,42	0,51	2,77	0,90	0,34	0,54	25,16	0,04	51,94	1,97	0,00	4,84	0,00	3,32	0,06
<i>Chlorococcum sp.</i>	7,82	1,03	0,85	0,40	1,95	0,77	0,68	2,42	13,66	0,53	65,15	0,50	0,01	2,62	0,03	1,41	0,18
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	6,59	0,74	0,83	0,79	1,04	0,90	0,99	3,73	34,95	0,41	40,60	2,84	0,32	2,82	0,00	2,21	0,22
<i>Dunaliella bardawil</i>	11,95	0,37	0,62	0,50	0,36	0,55	0,60	1,91	14,99	0,44	59,30	1,17	0,00	5,28	0,00	1,78	0,17
<i>Dunaliella salina</i>	9,03	0,53	0,39	0,29	0,54	0,40	0,26	1,15	24,73	0,34	53,54	0,76	0,00	7,08	0,07	0,61	0,26
<i>Dunaliella sp.</i>	7,74	1,19	0,49	0,42	0,78	0,31	0,50	2,22	32,03	0,00	47,77	0,70	0,00	3,14	0,00	2,31	0,40
<i>Chlorella sorokiniana</i>	6,49	0,47	0,72	1,03	1,70	1,42	1,09	9,52	22,48	1,24	43,00	3,74	0,08	4,12	0,20	2,45	0,24
<i>Chlorella zofingiensis</i>	5,17	0,49	0,65	0,44	0,81	0,66	0,72	8,38	25,69	1,18	46,09	5,14	0,12	1,73	0,08	2,20	0,45
<i>Trebouxiophyceae sp. Shy 53</i>	4,59	0,27	0,17	0,12	0,65	0,29	0,11	14,38	32,14	0,14	40,40	5,48	0,00	0,96	0,00	0,27	0,04
<i>Picochlorum sp.</i>	6,70	0,31	0,97	0,23	1,82	0,92	0,38	16,03	32,25	0,28	38,10	0,90	0,01	0,73	0,07	0,24	0,07
<i>Picochlorum oklahomensis</i>	6,28	0,16	0,82	0,28	0,49	0,38	0,27	18,70	30,35	0,06	37,07	3,75	0,01	0,77	0,02	0,55	0,04
<i>Picochlorum maculatum</i>	4,60	1,34	0,24	0,11	0,94	0,50	0,16	18,42	25,82	0,41	45,63	0,45	0,02	0,79	0,05	0,49	0,03
<i>Picochlorum oklahomense Xmm 5W5</i>	5,20	1,13	0,20	0,08	0,45	0,31	0,10	15,45	25,10	0,06	50,83	0,22	0,00	0,48	0,02	0,35	0,01
<i>Tetraselmis suecica</i>	4,28	0,89	0,59	0,41	0,34	0,93	0,41	14,18	29,60	1,18	41,06	1,25	0,00	2,20	0,00	2,52	0,16
<i>Tetraselmis sp.</i>	4,40	0,55	0,66	0,50	0,39	0,45	0,69	13,14	24,62	0,16	47,84	0,60	0,01	5,35	0,00	0,53	0,09
<i>Tetraselmis rubens</i>	5,54	1,31	1,06	0,80	0,93	0,95	1,17	15,10	15,09	0,99	41,44	1,41	0,04	9,30	0,30	4,18	0,40
<i>Tetraselmis striata</i>	4,52	0,28	0,21	0,10	0,34	0,19	0,13	15,69	31,06	0,10	43,47	0,26	0,01	3,12	0,02	0,42	0,07
<i>Tetraselmis CCMP881</i>	5,54	0,27	0,39	0,20	0,25	0,26	0,24	18,10	19,36	0,23	50,28	0,27	0,21	3,35	0,36	0,56	0,14

<i>Tabla 6.2 Continuación</i>	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Pro	Asx	Met	Glx	Phe	Cys	Lys	His	Tyr	Trp
<i>Ulvophyceae sp.</i>	5,57	0,95	0,53	0,34	1,45	0,69	0,45	14,48	27,16	0,38	43,37	0,47	0,01	2,26	0,11	1,42	0,39
<i>Porphyridium cruentum</i>	21,63	0,58	0,83	0,49	0,48	0,34	0,60	7,93	2,09	0,25	60,29	0,52	0,06	1,95	0,37	1,47	0,12
<i>Exanemachrysis gayraliae</i>	7,17	1,55	1,40	1,38	0,94	0,99	1,65	2,82	7,34	0,47	27,00	7,91	0,00	6,34	0,00	32,52	0,50
<i>Diacronema vlkianum</i>	6,22	0,20	0,42	0,26	0,47	0,52	0,26	33,19	1,35	0,41	39,02	0,34	0,04	2,24	0,20	14,78	0,07
<i>Rebecca salina</i>	7,15	1,24	2,24	2,84	0,43	0,40	2,94	2,56	10,02	1,13	20,31	6,47	0,00	7,08	0,00	34,59	0,61
<i>Pavlova lutheri</i>	6,16	2,08	1,19	1,04	0,00	0,49	0,71	1,10	10,52	0,00	25,69	5,91	0,00	6,53	0,00	38,11	0,46
<i>Pleurochrysis cf. roscoffensis</i>	8,20	1,41	2,09	2,71	1,14	0,86	2,62	6,95	12,07	0,43	11,43	7,20	0,00	8,98	0,00	33,49	0,44
<i>Isochrysis galbana (Huelva)</i>	6,95	2,91	3,24	3,23	2,41	3,05	3,67	8,79	11,95	2,24	3,06	7,19	0,10	13,25	0,10	27,11	0,75
<i>Isochrysis galbana (Cádiz)</i>	7,34	2,09	2,30	2,00	2,11	2,75	2,50	8,87	11,51	2,99	5,69	7,04	0,06	17,50	0,29	24,26	0,69
<i>Dicarteria sp.</i>	7,25	2,58	1,97	2,40	1,26	1,08	1,85	7,04	13,34	3,30	13,09	7,94	0,00	7,71	0,00	28,20	0,97
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2,55	0,29	0,25	0,27	0,21	0,18	0,27	4,88	9,12	0,06	79,27	0,56	0,00	1,54	0,00	0,48	0,08
<i>Thalassiosira sp.</i>	2,22	0,86	0,44	0,36	0,00	0,00	0,43	4,10	8,70	0,00	79,58	0,50	0,00	1,40	0,00	1,30	0,10
<i>Pleurosigma sp.</i>	2,65	0,72	0,34	0,35	0,33	0,27	0,36	3,96	8,36	0,45	74,71	1,07	0,00	2,43	0,00	3,77	0,23
<i>Amphora sp.</i>	1,80	0,87	0,57	0,95	0,56	0,33	1,97	4,18	10,31	1,07	68,47	2,40	0,00	2,83	0,00	3,38	0,32
<i>Cylindroteca closterium</i>	2,98	0,11	0,14	0,17	0,20	0,15	0,18	3,22	10,81	0,27	79,35	0,32	0,00	1,39	0,00	0,64	0,05
<i>Nitzschia aequorea</i>	2,56	0,89	0,22	0,33	0,14	0,09	0,27	5,55	13,67	1,09	68,66	1,27	0,00	1,76	0,00	2,60	0,89
<i>Chaetoceros gracilis</i>	2,48	0,59	0,39	0,43	0,37	0,12	0,38	6,58	9,17	0,30	74,15	0,83	0,00	2,44	0,00	1,60	0,17
<i>Nitzschia sp.</i>	3,86	0,50	0,40	0,68	0,32	0,24	0,53	5,55	10,92	0,60	67,08	1,19	0,00	3,73	0,00	2,98	1,44
<i>Ochromonas sp.</i>	4,42	1,67	1,18	1,69	1,18	1,27	1,59	52,77	4,68	2,06	8,10	5,33	0,00	6,77	0,00	6,81	0,47
<i>Nannochloropsis gaditana CCMP256</i>	7,50	0,24	0,96	0,66	1,67	1,02	0,86	62,30	10,43	0,91	4,06	2,40	0,00	4,00	0,00	2,69	0,31

<i>Tabla 6.2 Continuación</i>	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Pro	Asx	Met	Glx	Phe	Cys	Lys	His	Tyr	Trp
<i>Nannochloropsis gaditana CAL4</i>	10,05	0,98	1,19	0,80	0,35	0,16	1,23	66,91	7,07	0,43	3,41	1,01	0,00	4,20	0,00	1,87	0,27
<i>Nannochloropsis gaditana IFB</i>	7,24	0,41	0,78	0,49	1,76	0,96	0,58	71,47	5,10	0,63	3,72	1,78	0,00	2,92	0,00	1,88	0,28
<i>Chroomonas salina</i>	7,27	0,94	0,53	0,49	0,61	0,32	0,38	5,19	15,13	0,78	56,05	1,38	0,03	3,23	0,78	6,69	0,20
<i>Hemiselmis cyclopaea</i>	7,04	1,48	1,13	0,97	0,83	0,30	0,89	2,07	16,59	2,58	54,71	1,53	0,03	2,55	0,34	6,69	0,29
<i>Cryptomonas sp.</i>	8,88	0,82	0,68	0,94	0,38	0,32	0,70	2,98	12,26	1,31	63,17	1,51	0,04	1,83	0,20	3,62	0,36
<i>Rhodomonas salina</i>	9,79	0,33	0,37	0,30	0,28	0,26	0,32	4,42	16,87	1,47	59,36	0,38	0,00	1,28	0,00	4,48	0,10
<i>Cryptoperidinosoid sp. NOAA</i>	2,51	0,82	2,32	3,05	0,19	1,90	2,79	1,54	14,59	0,43	34,32	10,49	0,00	9,57	0,00	14,44	1,06
<i>Gyrodinium dorsum</i>	4,04	1,61	1,98	1,96	0,00	1,96	1,05	2,40	20,38	0,58	29,60	12,30	0,00	6,55	0,00	14,01	1,59
<i>Ostreopsis cf ovata</i>	4,64	1,23	1,58	2,82	0,24	2,65	1,28	1,44	13,73	4,48	31,83	9,38	0,00	9,75	0,00	13,68	1,29
<i>Heterocapsa cf. pygmaea</i>	3,63	2,61	2,23	3,12	0,00	1,13	2,29	3,03	7,32	4,64	34,44	13,07	0,50	10,02	0,00	10,90	1,07
<i>Amphidinium carterae</i>	8,34	4,64	2,61	3,82	0,00	0,70	3,32	3,25	8,76	3,53	30,95	11,36	0,00	9,18	0,00	8,79	0,75
<i>Synechococcus sp (red)</i>	0,68	0,70	0,19	0,12	0,00	0,21	0,11	0,70	5,03	0,00	89,30	0,00	0,08	2,10	0,00	0,78	0,00
<i>Synechococcus sp (green)</i>	0,64	0,69	0,26	0,33	0,34	0,20	0,31	0,26	5,87	0,56	86,15	1,41	0,04	1,28	0,00	1,66	0,00
<i>Synechococcus sp (brown)</i>	1,01	0,30	0,35	0,45	0,65	0,27	0,63	0,37	3,05	0,77	86,02	2,17	0,01	1,99	0,04	1,83	0,07
<i>Cyanobacterium enrichment culture clone</i>	0,49	0,15	0,21	0,29	0,19	0,23	0,34	0,20	2,69	0,23	92,99	0,31	0,01	0,72	0,00	0,90	0,06
<i>Synechocystis sp.</i>	0,47	0,32	0,08	0,09	0,07	0,05	0,12	0,11	4,69	0,09	92,65	0,35	0,02	0,25	0,05	0,57	0,02
<i>Oscillatoria sp.</i>	0,89	0,45	0,14	0,16	0,00	0,05	0,22	0,21	4,40	0,16	91,76	0,30	0,00	0,21	0,00	1,00	0,05
<i>Anabaena flos aquae</i>	3,77	1,89	2,37	0,24	1,34	1,28	3,01	2,27	7,54	0,00	69,61	1,10	0,05	1,19	0,11	4,17	0,06

6.3. Determinación del perfil aminacídico asociado a la variabilidad taxonómica de las microalgas estudiadas

Con el fin de comprobar si existe una relación entre el perfil de aminoácidos y en la clasificación taxonómica de las 57 microalgas estudiadas, se llevó a cabo un análisis estadístico de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés *Principal Component Analysis*) del perfil de aminoácidos estructurales y aminoácidos libres que se muestran en las Tablas 6.1 y 6.2. Así, en el caso de los aminoácidos estructurales, se puede observar que la distribución de los *phyla* no se corresponde con ningún cluster claramente diferenciado (Figura 6.1), por lo que se podría concluir que no existe agrupación de las diferentes especies mediante *phylum* y, como consecuencia, la variabilidad taxonómica no implica una variabilidad en el perfil de aminoácidos estructurales. También cabe destacar que la variabilidad representada en estas dos componentes principales seleccionadas es del 20,55 y 11,26% del total de los datos, respectivamente, lo que indica que gran parte de la variabilidad del perfil aminoacídico de las especies no se debe a su clasificación taxonómica. Además, los aminoácidos que contribuyeron en mayor medida a estas componentes fueron Glx y Asx para la componente 1 (PC1), y Pro, Cys y Ala para la componente 2 (PC2), lo que parece estar en concordancia con los trabajos publicados previamente, que muestran que los aminoácidos Glu y Asp son los que podrían favorecer la variabilidad taxonómica del perfil aminoacídico en microalgas (Templeton y Laurens, 2015). Por ello, se puede concluir que no existe una tendencia significativa que explique una correlación entre los diferentes *phyla* en el perfil aminoacídico de las microalgas, de acuerdo con los datos de publicaciones previas como Chau et al. 1967, o Brown, 1991; y en contra de lo que afirman otros estudios realizados con un menor número de taxones y especies (Dawczynskiet et al. 2007; Lourenço et al. 2004).

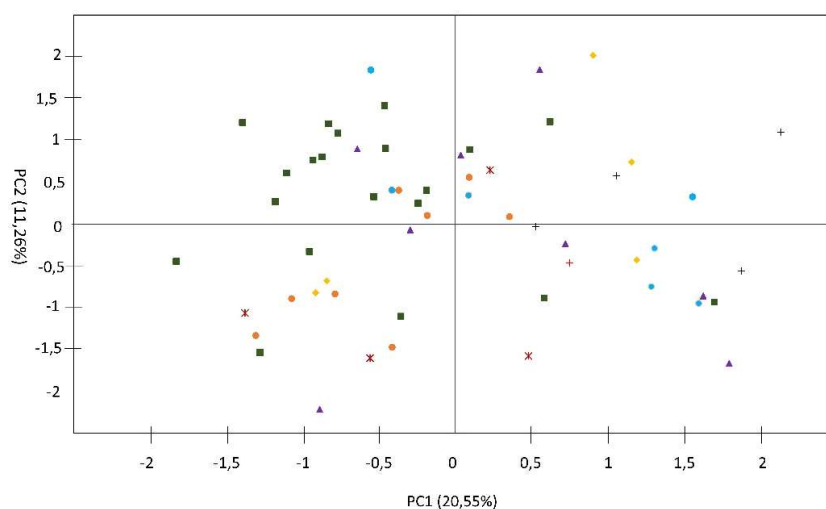


Figura 6.1. Análisis de componentes principales (PCA) y distribución según las componentes que explican mayormente la variabilidad, denominadas PC1 y PC2, del perfil de aminoácidos estructurales de las 57 especies de microalgas estudiadas en este trabajo. Los diferentes marcadores se refieren a los *phyla* presentes en el estudio: ■ *Chlorophytae*, ● *Cyanophytae*, ● *Haptophytae*, ▲ *Bacillariophytae*, ◆ *Miozoa*, + *Cryptophytae*, X *Ochrophytae* y + *Rhodophytae*.

Por otra parte, con respecto al perfil de aminoácidos libres, el análisis PCA muestra una relación más clara entre el perfil de aminoácidos y la clasificación taxonómica de las especies. En los resultados del análisis se puede comprobar, en primer lugar, que las dos componentes seleccionadas pueden explicar la mayor parte de la variabilidad existente (58,77% la PC1 y 15,93% la PC2), por lo que se puede considerar un análisis bastante eficiente. Además, los

aminoácidos que contribuyeron en mayor medida fueron Val, Leu, Phe y Lys para la PC1, y Glx, Tyr y Ser para la PC2. Cabe destacar también que en este análisis se eliminaron las variables Cys e His debido a sus valores cercanos al ruido en la medición del GC-MS y que podrían dar lugar a sesgos irreales en el análisis. Por todo ello, en la Figura 6.2A se pueden apreciar tres claros clústeres, englobando el primero de ellos a las microalgas *ochrophytae*, un segundo a las *chlorophytae*, *cyanophytae*, *bacillariophytae*, *cryptophytae*, *rhodophytae* y la microalga haptofita *Diacronema vlkianum*; y un tercer clúster que engloba a las microalgas *haptophytae* y *miozoa*. No obstante, al ampliar las imágenes del segundo y tercer clúster (Figura 6.2 B y C), se puede comprobar que existen agrupaciones más concretas que engloban a cada *phylum*, mostrando la Figura 6.2B un clúster con las *cyanophytae*, otro con las *bacillariophytae* (a excepción de la microalga *Amphora sp.*) y un tercero que engloba a las *chlorophytae* (a excepción de la microalga *Tetraselmis rubens*), *rhodophytae* y *cryptophytae*; mientras que la Figura 6.2C muestra dos clústeres, cada uno englobando uno de los otros dos *phyla*. La presencia de la microalga *rhodophyta* dentro del clúster de las *chlorophytae* se debe de producir puesto que es el *phylum* taxonómicamente más cercano que tiene y, al no haber suficientes muestras, no puede formar uno propio. Por otra parte, la presencia de las *cryptophytae* es este grupo es más complejo de explicar, puesto que no se han encontrado datos previos del perfil de aminoácidos libres de este *phylum* en la bibliografía. Estos resultados indican que el perfil de aminoácidos libres de las microalgas va a depender del *phylum* en el cual se encuentre la especie en casi el 90% de los casos, pudiendo ser utilizado como indicador taxonómico del mismo modo que el perfil lipídico (Cañavate, 2019) o el perfil de carotenoides (Ianora et al. 2017). Otros estudios obtuvieron resultados similares previamente (Derrien et al. 1998; Martin-Jezequel et al. 1988), sin embargo, debido al limitado número de especies utilizadas no se pudo llegar a esta conclusión de forma tan clara. Frente a eso, nuestro estudio utiliza 57 especies agrupadas en 8 *phyla* y 38 *genera*, lo que permite establecer resultados más consistentes.

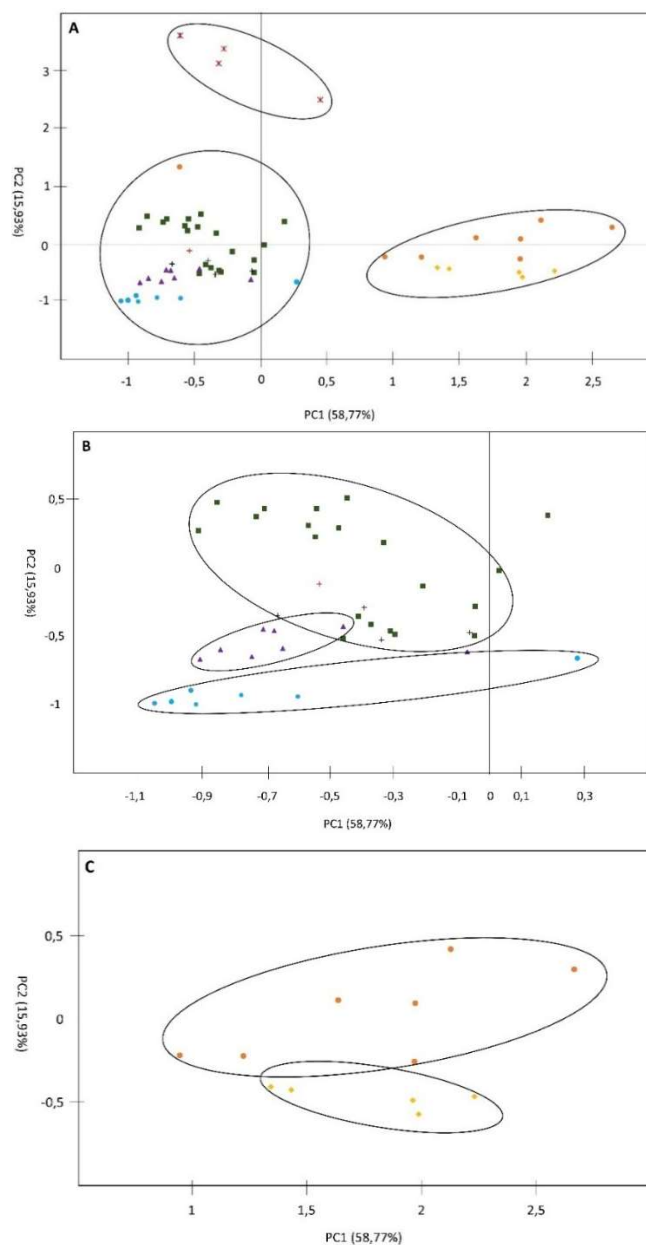


Figura 6.2. Análisis de componentes principales (PCA) y distribución según las componentes que explican mayormente la variabilidad, denominadas PC1 y PC2, del perfil de aminoácidos libres de las 57 especies de microalgas estudiadas en este trabajo (A) y las diferentes ampliaciones de la imagen en los clústeres con mayor número de muestras (B y C). Los diferentes marcadores se refieren a los *phyla* presentes en el estudio: ■ *Chlorophyta*, ● *Cyanophyta*, ● *Haptophyta*, ▲ *Bacillariophyta*, ◆ *Miozoa*, + *Cryptophyta*, X *Ochrophyta* y + *Rhodophyta*.

6.4. Contenido de aminoácidos esenciales de los diferentes grupos de microalgas e influencia en el valor nutricional

Una de las principales aplicaciones de las microalgas es su uso como suplemento alimenticio en acuicultura. Los niveles de ácidos grasos (Cañavate, 2019), o de pigmentos (Koller et al. 2014) en microalgas, además de tener un valor taxonómico, se han utilizado como indicadores del valor nutricional de las diferentes especies. El nivel de aminoácidos esenciales (EAA), sin embargo, ha sido mucho menos estudiado y prácticamente no se ha investigado la variación del

perfil de aminoácidos entre los diferentes grupos o familias de microalgas. Por todo esto, se ha realizado un estudio del porcentaje de EAA estructurales, EAA libres, y de la proteína total de las microalgas, calculada mediante la suma de los valores obtenidos en el GC-MS y confirmada mediante el análisis del N elemental.

Estos resultados representados en la Figura 6.3 muestran que el *phylum miozoa* presenta los mayores porcentajes de EAA, tanto estructurales como libres, y un porcentaje de proteínas muy variable. Tras este *phylum* los siguientes son *ochrophyta* y *cryptophyta*, que presentan mayores porcentajes de proteínas totales y EAA estructurales, así como de EEA libres. Por el contrario, el grupo de menor valor nutricional en función del perfil aminoacídico es el de *bacillariophyta* que posee el porcentaje de proteínas menor y uno de los menores de EAA libres.

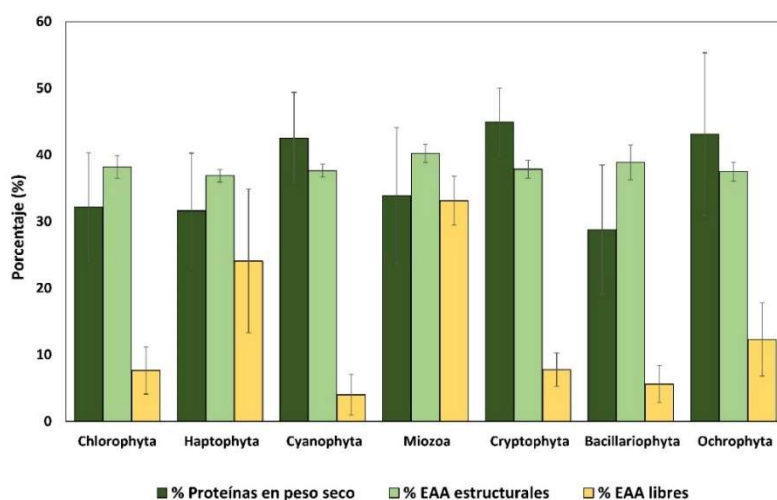


Figura 6.3. Valor nutricional de los diferentes *phyla* referido a los parámetros de proteínas en peso seco, EAA estructurales y EAA libres, según los datos de las Tablas 6.1 y 6.2.

A pesar de estos resultados, para conseguir un alimento eficiente en acuicultura es necesario tener en cuenta varios parámetros nutricionales. Además del perfil de aminoácidos, el perfil de ácidos grasos es también otro parámetro nutricional importante a considerar en las microalgas. Con respecto a este perfil, las microalgas que poseen mayor valor añadido son las *dinophyceae*, seguidas por las *haptophytae* y *cryptophytae*, con un 60% del valor nutricional de las *dinophyceae* tal y como describe Cañavate (2019). Además, las microalgas *haptophytae* destacan por su proporción de diferentes carbohidratos o esteroides frente a otros *phyla* (Brown et al. 1997; Ahmed et al. 2015), o las *bacillariophytae* por su contenido en vitaminas (Brown et al. 1999; Yang et al. 2020). Por todo esto, se hace imprescindible la combinación de varias especies de microalgas para conseguir el aporte nutricional necesario para su implantación en dietas acuícolas.

No obstante, aunque los *phyla* puedan marcar una tendencia, la selección de microalgas para su potencial uso en acuicultura como fuente de proteínas se ha realizar en función de la especie. Según los criterios utilizados en este estudio, las microalgas que destacan por su valor nutricional dentro de cada *phylum* son: *C. sorokiniana* y *Dunaliella salina* en el caso de las *chlorophytae* y *rhodophyta*; *Isochrysis galbana* (Huelva) en el caso de las *haptophytae*; *Synechococcus sp.* (Green) en el caso de las *cyanophytae*; *Heterocapsa cf pygmaea* en el caso de las *miozoa*; *Chroomonas salina* en el caso de las *cryptophytae*; *Phaeodactylum tricornutum* en el caso de las *bacillariophytae*, y *Ochromonas sp.* en el caso de las *ochrophytae*. De entre las tres variables seleccionadas cobra mayor importancia a la hora de decidir el valor nutricional el porcentaje de proteínas, ya que es la de mayor importancia cuantitativa, de ahí la selección de estas 7 especies.

Esta variable depende principalmente de la especie estudiada, puesto que todas las microalgas seleccionadas han crecido en medios de cultivo con una concentración de nutrientes similar, y han sido recogidas durante la parte final de su fase exponencial, por lo que las condiciones de cultivo, que es una de las variables que afecta a la proteína total y a la composición de aminoácidos (Lourenço et al. 2004), han sido similares en todas. Dentro de las otras dos variables, el porcentaje de EAA estructurales es bastante similar en la mayor parte de las especies, rondando el 35-45% del total de aminoácidos, por lo que no es una variable determinante en la selección. Por último, el porcentaje de EAA libres presenta una mayor variabilidad, entre un 1-2% de algunas especies de *Picochlorum* o algunas *cyanophyceae*, hasta un 35-40% de las *Isochrydaceae* o algunas *miozoa*. Además, entre los distintos *phyla* existen también diferencias entre clases o familias, destacando en las *chlorophytae* las de las clases *Trebouxyophyceae* y *Chlorophyceae*, sobre las *Chlorodendrophyceae*; en las *haptophyceae* las *Isochrydaceae* sobre las otras *Coccolithophyceae* y sobre las *Pavlovophyceae*; y en el caso de las *ochrophyceae* la *Crysophyceae* sobre las *Eustigmatophyceae*. Estos resultados contradicen los obtenidos por Derrien y colaboradores (1998), que en su estudio observaron que las 3 especies *bacillariophytae* estudiadas tuvieron un mayor porcentaje de EAA libres que las microalgas *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*. No obstante, este estudio no tiene en cuenta 5 de los 9 aminoácidos esenciales y su número de especies se limita a esas 5, por lo que sus resultados no pueden considerarse comparables ni concluyentes. Sin embargo, tiene mayor concordancia con el estudio realizado por Martin-Jezequel y colaboradores (1988) con 11 especies de microalgas, cuyo porcentaje de EAA libres se encontró entre el 5 y el 40% según especies.

Las 7 especies seleccionadas fueron de nuevo comparadas entre sí mediante los 3 parámetros utilizados con el fin de seleccionar las especies con mayor valor nutricional. Los resultados que aparecen en la Figura 6.4 muestran que la clasificación de estas microalgas según su valor nutricional de EAA son *Ochromonas sp.* > *Chroomonas salina* > *Synechococcus sp. (green)* > *Heterocapsa cf pygmaea* > *C. sorokiniana* > *Isochrysis galbana (Huelva)* > *Dunaliella salina* > *Phaeodactylum tricornutum*, descartado las dos primeras (*Ochromonas sp.* y *Chroomonas salina*), pertenecientes a los *phyla ochrophyceae* y *cryptophyceae*, respectivamente.

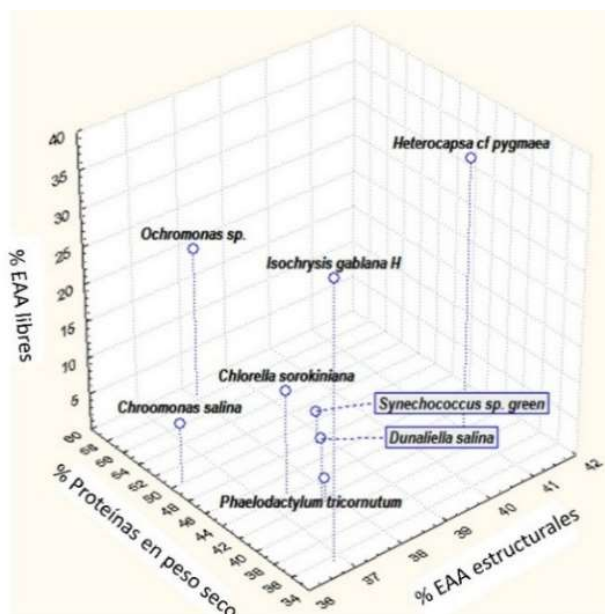
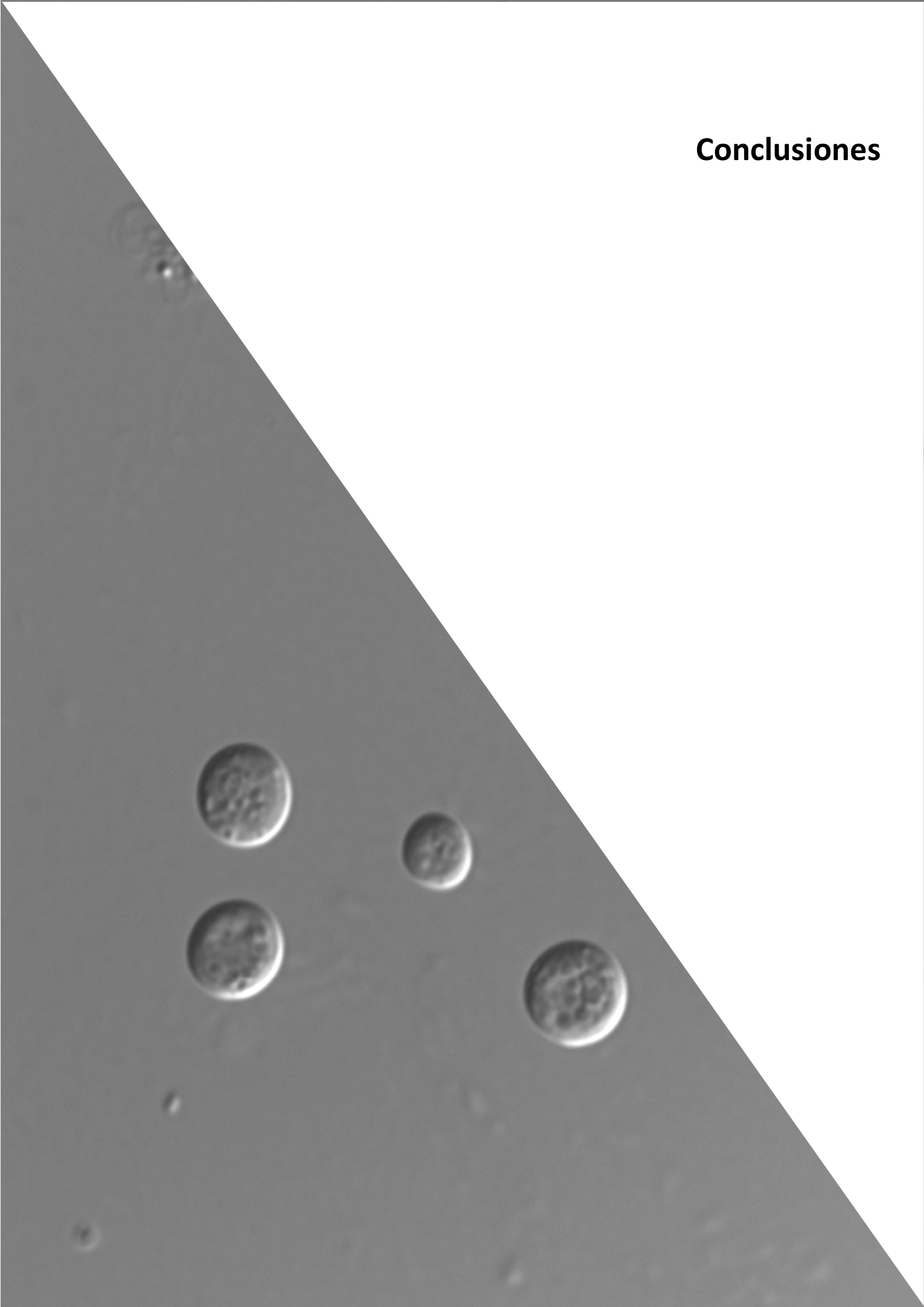


Figura 6.4. Valor nutricional de las microalgas seleccionadas referido a los parámetros de proteína en peso seco, EAA estructurales y EAA libres, según los datos de las Tablas 6.1 y 6.2.

Estas dos microalgas no han sido muy utilizadas en acuicultura como suplemento alimenticio. No obstante, la microalga *Chroomonas salina* destaca también por su contenido en ácido ascórbico (Brown y Miller, 1992), aloxantina (Cheng et al. 1974) y triglicéridos (Henderson y Mackinlay, 1989), pudiendo ser una prometedora especie al tener un alto contenido en EAA. Por otra parte, la microalga *Ochromonas sp.* no ha despertado tanto interés según sus parámetros nutricionales. Algunos datos de nuestro grupo de investigación no publicados muestran que esta microalga posee altas cantidades de fucoxantina, así como otros estudios muestran sus propiedades antibacterianas y antibióticas (Blom y Pernthaler, 2010; Schuelter et al. 2019), por lo que ambas microalgas podrían tener un alto potencial para su utilización como suplemento alimenticio en acuicultura.

Conclusiones



Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos para esta tesis doctoral y los resultados obtenidos, se exponen las siguientes conclusiones:

Capítulo 3:

1. La evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* bajo diferentes condiciones tróficas muestra que el cultivo mixotrófico de la microalga con acetato permite obtener la mayor velocidad de crecimiento ($0,072 \text{ h}^{-1}$ en 48 h) y la mejor cantidad de biomasa final ($1,47 \text{ g L}^{-1}$). Además, la microalga es capaz de crecer en presencia de residuos industriales, tales como el extracto de algarroba, el glicerol o las lias oxidadas procedentes de la industria vinícola, siendo este último el residuo en el que *Chlorella sorokiniana* crece a mayor velocidad ($0,036 \text{ h}^{-1}$), entre todos los testados.
2. Las condiciones óptimas de crecimiento de *Chlorella sorokiniana*, en condiciones mixotróficas, requieren una concentración de acetato procedente de las lias oxidadas de 100 mM, como fuente de carbono, y una concentración de cloruro de amonio de 30 mM, como fuente de nitrógeno. Por otra parte, las condiciones óptimas de producción de lípidos neutros en la microalga se consiguen con una concentración de acetato 100 mM y en ausencia de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.
3. Teniendo en cuenta las condiciones óptimas de crecimiento en cultivos mixotróficos, la microalga *Chlorella sorokiniana* puede cultivarse en modo semicontinuo en reactores de 2 L, obteniéndose una alta productividad de biomasa microalgal ($11,0 \text{ g L}^{-1}$) y de lípidos neutros (38% DW), al utilizar los residuos de lias oxidadas como fuente de carbono.

Capítulo 4:

4. La microalga *Chlorella sorokiniana* es capaz de crecer en medios de cultivo con altas concentraciones de metales pesados o metaloides, hasta concentraciones de 500 μM de cobre, 250 μM de cadmio, 750 μM de arsenito, y 10 mM de arseniato. Por su parte, el consumo de amonio sólo se ve inhibido a concentraciones de 5 mM de cobre, 1 mM de arsenito y 5 mM de arseniato, no viéndose afectado en el caso del cadmio para las concentraciones testadas.
5. La presencia de cobre (500 μM), cadmio (250 μM), arsenito (750 μM) o arseniato (5 mM) en el medio de cultivo de *Chlorella sorokiniana* provoca un aumento significativo en la expresión génica, medida mediante qPCR, y en la actividad de las enzimas antioxidantes ascorbato peroxidasa y catalasa, así como de enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno y del azufre, como la glutamato deshidrogenasa, la O-acetilserina (tiol)lisis y

- la NAD-isocitrato deshidrogenasa. Por su parte, para la enzima glutamina sintetasa, implicada en la asimilación de amonio, se produce una disminución tanto de la expresión génica, como de la actividad enzimática cuando la microalga se somete a estrés metálico.
6. *Chlorella sorokiniana* es capaz de acumular grandes concentraciones intracelulares de cobre y cadmio, obteniendo factores de bioconcentración de 105 y 566, respectivamente; lo que la hace una microalga con un gran potencial biorremediador, especialmente de cadmio.
 7. La exposición de la microalga *Chlorella sorokiniana* al cadmio (250 μM Cd^{+2}) provoca alteraciones en el crecimiento, disminuyendo su velocidad, y la morfología celular de la microalga, observándose un aumento del tamaño celular y del número de vacuolas, así como una distorsión de la pared celular y una disminución de la fluorescencia producida por las clorofilas.
 8. El estudio proteómico mediante SWATH-MS sobre el efecto que el cadmio (250 μM) provoca en *Chlorella sorokiniana* demuestra que existe una inducción de la fotorrespiración, las enzimas antioxidantes (incluidas las *Heat Shock Proteins*), la gluconeogénesis, el catabolismo del almidón y la biosíntesis de glutamato, cisteína, glicina y serina. Asimismo, otras rutas como la fotosíntesis, la fosforilación oxidativa, la glucólisis, el ciclo de Krebs o la biosíntesis de proteínas ribosomales se encuentran reprimidas en las mismas condiciones de estrés.

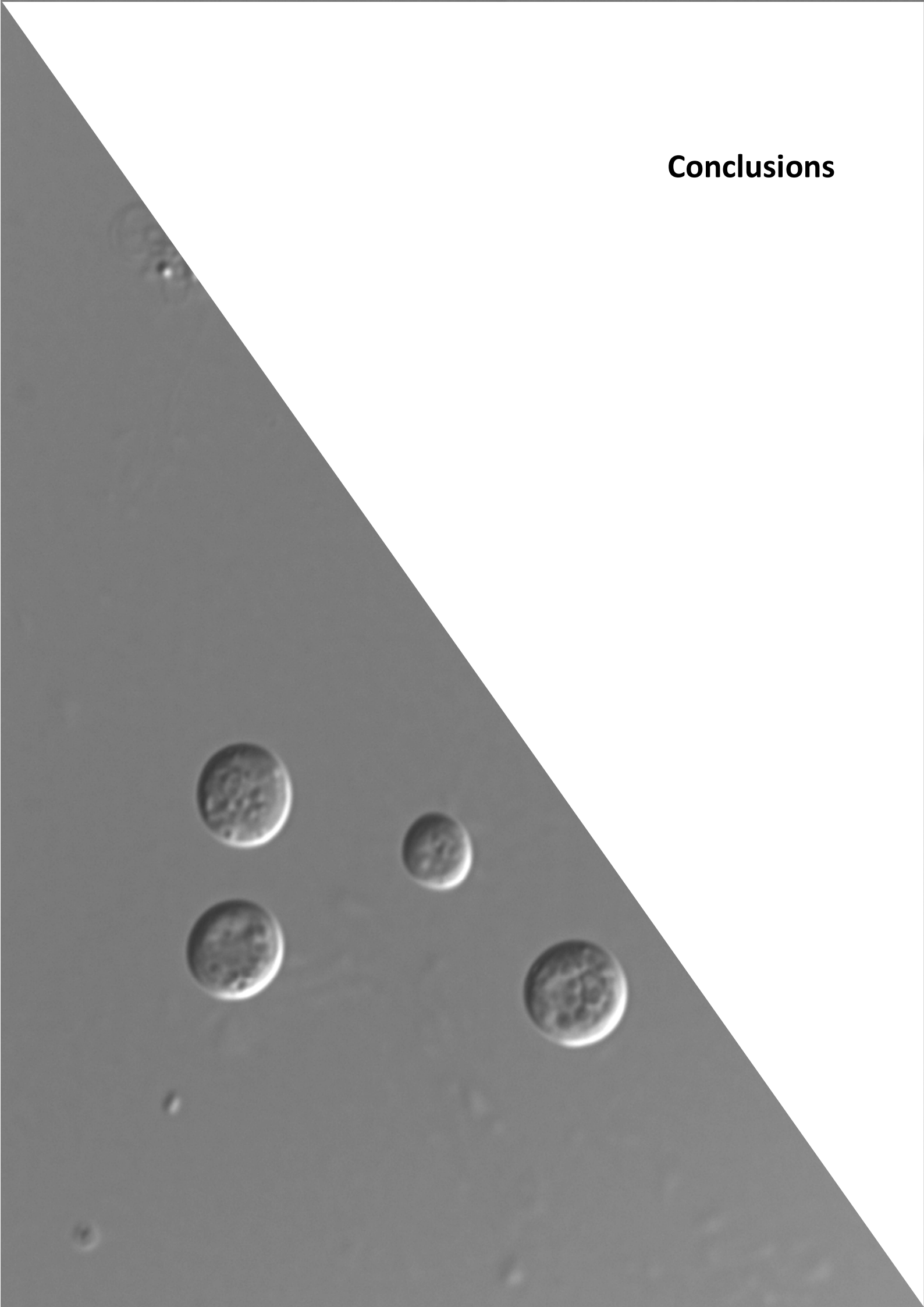
Capítulo 5

9. El sistema de electroporación es un método que permite la transformación genética de *Chlorella sorokiniana*, aplicando como parámetros óptimos 2,5 kV de intensidad de campo eléctrico y 3 pulsos eléctricos.
10. En la electroporación de *Chlorella sorokiniana*, el promotor heterólogo *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor permite obtener valores superiores de eficiencia de transformación y de expresión del gen de resistencia a paromomicina, *APHVIII*, que los promotores heterólogos de la nopalina sintasa (*NOS*) de *Agrobacterium tumefaciens* y el promotor híbrido *HSP70/RBCS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*.
11. Se ha puesto a punto un sistema de criopreservación a -80 °C para *Chlorella sorokiniana* capaz de mantener su viabilidad celular durante al menos 365 días, utilizando como criopreservante etilenglicol al 5% v/v, lo que ha permitido conservar los transformantes obtenidos durante largos periodos de tiempo, sin que se produzca la reversión de sus fenotipos.

Capítulo 6

12. El estudio del perfil aminoacídico de 57 especies de microalgas pertenecientes a 8 *phyla* y 38 *genera*, mediante GC-MS, pone de manifiesto que los aminoácidos estructurales mayoritarios en las microalgas son la combinación de glutamato/glutamina (15-22% del total de aminoácidos), aspartato/asparragina (9-14%), o la alanina (8-11%), la leucina (5-10%) y la lisina (5-9%). En el caso de *Chlorella sorokiniana* los mayoritarios son glutamato/glutamina (22%), aspartato/asparragina (12%) lisina (8,7%) y alanina (8,5%).
13. Al contrario que en los aminoácidos estructurales, el perfil de aminoácidos libres varía en función del *phylum* de la microalga. Los aminoácidos libres mayoritarios son glutamato/glutamina para los *phyla chlorophyta* (40-60%), *cyanobacteria* (70-90%), *miozoa* (30-35%), *cryptophyta* (55-65%) y *bacillariophyta* (70-80%), la tirosina para el *phylum haptophyta* (25-35%) o la prolina para el *phylum ochrophyta* (50-70%). Para la microalga *Chlorella sorokiniana* los aminoácidos libres mayoritarios son glutamato/glutamina (43%), aspartato/asparragina (22%) y prolina (9,5%).
14. El análisis estadístico de componentes principales demuestra que existe una relación entre el perfil de aminoácidos libres y el grupo taxonómico para la mayoría de las especies de microalgas (87,72% de las especies), pudiéndose agrupar en *clústeres* los diferentes *phyla* a excepción del *phylum cryptophyta*, y las especies *Diacronema vlkianum*, *Tetraselmis rubens* y *Amphora sp.*
15. En función del perfil de aminoácidos esenciales, el *phylum* y las especies con mejor valor nutricional son *miozoa*, con porcentajes de proteínas y aminoácidos esenciales del 30-40%; y *Ochromonas sp.* y *Chroomonas salina*, con porcentajes de proteínas del 50-60% y de aminoácidos esenciales estructurales del 37% y libres del 10-25%. La microalga *Chlorella sorokiniana* se encuentra entre las especies con valores más altos de proteínas (40%), aminoácidos esenciales estructurales (37%) y libres (15%), lo que la convierte, junto a las especies mencionadas, en un potencial suplemento proteico para acuicultura.

Conclusions



Conclusions

According to the objectives proposed for the present doctoral thesis and the results obtained, the following conclusions can be documented:

Chapter 3:

1. The evaluation of *Chlorella sorokiniana* growth under different trophic conditions shows that the highest growth rate ($0,072 \text{ h}^{-1}$ in 48 h) and final biomass ($1,47 \text{ g L}^{-1}$) is observed for mixotrophic cultures, using acetate as carbon source. Moreover, the microalga is able to growth with different industrial wastes, such as carob pod extract, glycerol or oxidized wine waste lees, being the last one in which *Chlorella sorokiniana* shows the highest growth rate ($0,036 \text{ h}^{-1}$).
2. The optimal mixotrophic growth conditions for this microalga include 100 mM of acetate providing from oxidized lees, as carbon source; and 30 mM of ammonium chloride, as a nitrogen source. On the other hand, the optimal conditions for the production of neutral lipids in *Chlorella sorokiniana* are an acetate concentration of 100 mM and nitrogen starvation.
3. Using the optimal growth conditions stablished, *Chlorella sorokiniana* can be mixotrophically cultured in fed-batch 2 L bioreactors, obtaining high amounts of microalgal biomass ($11,0 \text{ g L}^{-1}$) and neutral lipids (38% DW), using oxidized lees as carbon source.

Chapter 4

4. The microalga *Chlorella sorokiniana* is able to grow in the presence of high amounts of various heavy metals or metalloids, up to concentrations of $500 \mu\text{M}$ for copper, $250 \mu\text{M}$ for cadmium, $750 \mu\text{M}$ for arsenite, and 10 mM for arseniate. On the other hand, nitrogen consumption appears to be inhibited at 5 mM of copper, 1 mM of arsenite and 5 mM of arseniate, and is not affected by cadmium at the concentrations tested.
5. The presence of copper ($500 \mu\text{M}$), cadmium ($250 \mu\text{M}$), arsenite ($750 \mu\text{M}$) or arseniate (5 mM) in *Chlorella sorokiniana*'s culture medium provokes a significant gene expression upregulation, measured by qPCR, and an important increase in enzymatic activity of antioxidant enzymes ascorbate peroxidase and catalase. Furthermore, the enzymes that takes part in nitrogen and sulphur metabolism glutamate dehydrogenase, O-acetylserine (thiol)lyase and NAD-isocitrate dehydrogenase, which takes part in nitrogen and sulphur metabolism, are also upregulated in these conditions. On the other hand, the enzyme glutamine synthetase, involved in nitrogen assimilation, suffers a

downregulation both at gene expression and enzymatic activity levels, when *Chlorella sorokiniana* is cultured under metallic stress.

6. *Chlorella sorokiniana* can accumulate high intracellular concentrations of copper and cadmium, with bioconcentration factors of 105 and 566, respectively; indicating that *Chlorella sorokiniana* is a microalga with a high potential for the bioremediation of cadmium.
7. The exposure of *Chlorella sorokiniana* to cadmium (250 $\mu\text{M Cd}^{+2}$) provokes a decrease in its growth, with a lower growth rate; and alterations in its cell morphology, such as higher size and number of vacuoles, just like a distortion of cell wall and reduction in fluorescence of the chlorophylls.
8. The proteomic study, carry out by SWATH-MS technology, about the effect of cadmium over *Chlorella sorokiniana* metabolism, demonstrates that different pathways, such as photorespiration, antioxidant enzymes (including Heat Shock Proteins), gluconeogenesis, starch catabolism or the biosynthesis of glutamate, cysteine, glycine and serine were upregulated in *Chlorella sorokiniana* under cadmium stress. However, other pathways such as photosynthesis, oxidative phosphorylation, glycolysis, TCA cycle or biosynthesis of ribosomal proteins were downregulated in the same conditions.

Chapter 5

9. The electroporation system is a feasible method which allows to obtain the genetic transformation of *Chlorella sorokiniana*, using 2.5 kV of electric field strength and 3 electric pulses as optimal parameters.
10. In *Chlorella sorokiniana* electroporation, the heterologous promoter cauliflower mosaic virus *CaMV 35S* led to obtain the highest transformation efficient and the highest level of the paromomycin resistant, *APHVIII*, gene expression. This promoter is more effective than the *NOS* promoter of *Agrobacterium tumefaciens*, and the hybrid promoter *Hsp70A/RbcS2* of *Chlamydomonas reinhardtii*.
11. A -80 °C cryopreservation method, able to preserved cellular viability for at least 365 days, is developed in *Chlorella sorokiniana* using ethylene glycol 5% v/v, as cryopreservant, and allows the preservation of obtained transformants for long periods of time without phenotype reversion.

Chapter 6

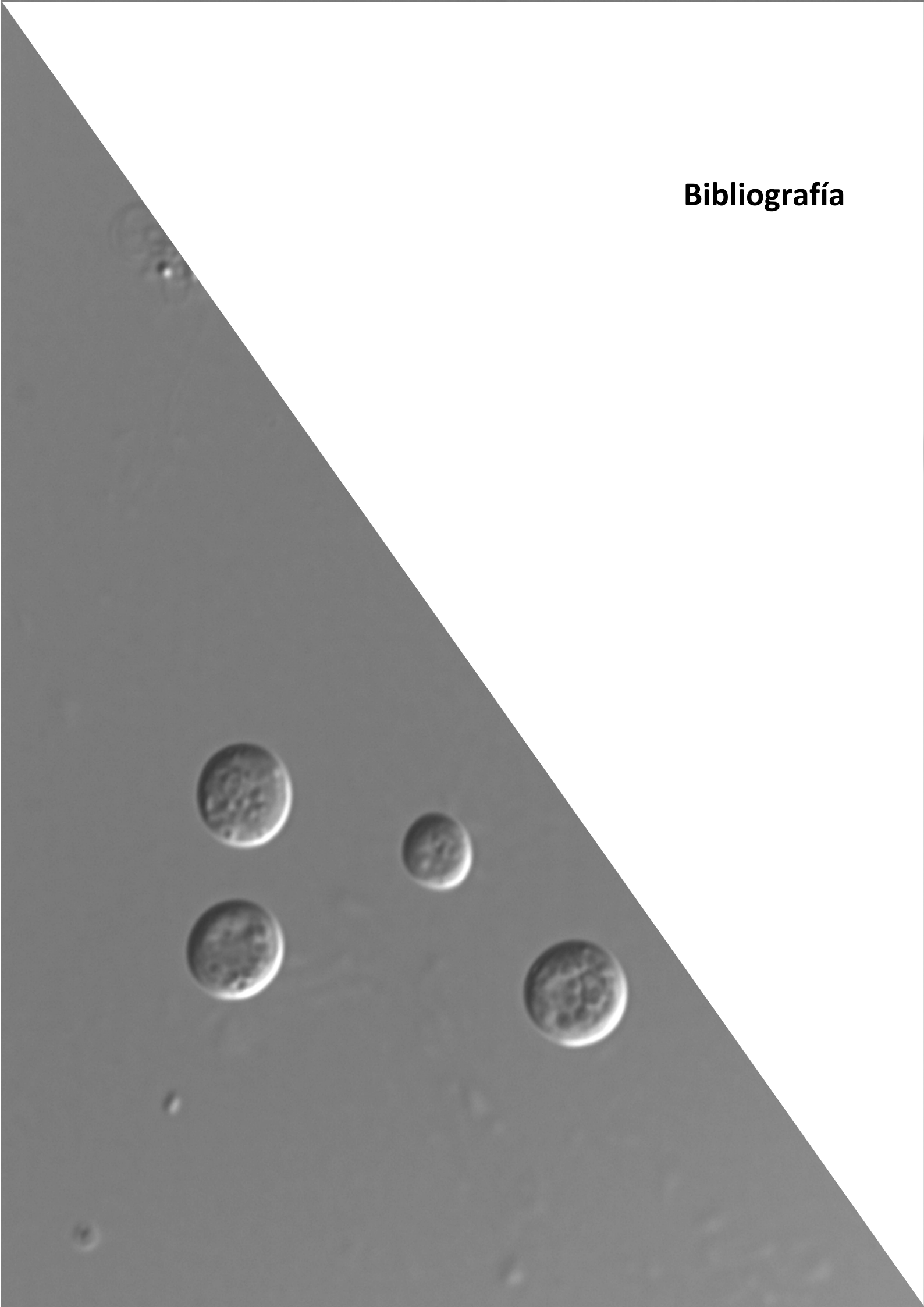
12. The aminoacidic profile identified by GC-MS of 57 microalgae, included 8 *phyla* and 38 *genera*, shows that the main structural amino acids are the combinations of glutamate/glutamine (15-22% of total amino acids), aspartate/asparagine (9-14%), or alanine (8-11%), leucine (5-10%) and lysine (5-9%). For *Chlorella sorokiniana*, the main structural amino acids are glutamate/glutamine (22%), aspartate/asparagine (12%), lysine (8.7%) and alanine (8.5%).

13. On the contrary to structural amino acids, which do not show a taxonomic pattern, free amino acids profiles vary through the *phylum*. The main free amino acids are the combination of glutamate/glutamine for the *phyla chlorophyte* (40-60%), *cyanobacteria* (70-90%), *miozoa* (30-35%), *cryptophyta* (55-65%) and *bacillariophyta* (70-80%), tyrosine in *haptophyte phylum* (25-35%), and proline in *ochrophyte phylum* (50-70%). For *Chlorella sorokiniana*, the main free amino acids are glutamate/glutamine (43%), aspartate/asparagine (22%) and proline (9.5%).

14. The statistical principal components analysis demonstrates that there is a correspondence between free amino acids profile and taxonomic classification in most species of microalgae (87.72% of species), making a cluster group of the different *phyla*, excepting *phylum cryptophyta* and species *Diacronema vlkianum*, *Tetraselmis rubens* y *Amphora sp.*

15. Through essential amino acids profile, the best values *phylum* is *miozoa*, with values above 30-40% of proteins and essential aminoacids; and as species, *Ochromonas sp.* and *Chroomonas salina*, with the highest percentage of proteins (50-60%), structural (37%) and free (10-25%) essential amino acids. The microalga *Chlorella sorokiniana* have also one of the best values, being high levels of total proteins (40%), structural essential amino acids (37%) and free essential amino acids (15%), within these three species a great potential as proteins supplement in aquaculture is demonstrated.

Bibliografía



A

Abinandan, S., Subashchandrabose, S.R., Venkateswarlu, K., Perera, I.A., Megharaj, M., 2019. Acid-tolerant microalgae can withstand higher concentrations of invasive cadmium and produce sustainable biomass and biodiesel at pH 3.5. *Bioresource Technology* 281, 469-473.

Abad, S., Turon, X., 2012. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances* 30, 733-741.

Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology* 118, 61-66.

Ación, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances* 30, 1344-1353.

Ación, F.G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M.M., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2016. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 9013-9022.

Ación-Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., Fernández-Sevilla, J.M., 2018. Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2.

Ahmed, F., Zhou, W., Schenk, P.M., 2015. *Pavlova lutheri* is a high-level producer of phytosterols. *Algal Research* 10, 210-217.

Ajjawi, I., Verruto, J., Aquí, M., Soriaga, L.B., Coppersmith, J., et al., 2017. Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. *Nature Biotechnology* 35, 647-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.3865>.

Alhazzaa, R., Nichols, P.D., Carter, C.G., 2018. Sustainable alternatives to dietary fish oil in tropical fish aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 11, 1195-1218.

Ali, H., Khan, E., 2018. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 25, 1353-1376.

Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., Morones-Ramírez, J.R., 2019. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories* 18.

Amako, K., Chen, G., Asada, K., 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* 35, 497-504.

Amorim, M.L., Soares, J., Coimbra, J.S.R., Leite, M.O., Albino, L.F.T., et al., 2020. Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-27.

Anand, V., Singh, P.K., Banerjee, C., Shukla, P., 2017. Proteomic approaches in microalgae: perspectives and applications. *3 Biotech* 7.

Anu, P.R., Bijoy Nandan, S., Jayachandran, P.R., Don Xavier, N.D., Midhun, A.M., et al., 2018. Toxicity effects of zinc on two marine diatoms, under varying macronutrient environment. *Marine Environmental Research* 142, 275-285

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.

Aroca, A., Benito, J.M., Gotor, C., Romero, L.C., 2017. Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 68, 4915-4927.

Arriola, M.B., Velmurugan, N., Zhang, Y., Plunkett, M.H., Hondzo, H., et al., 2018. Genome sequences of *Chlorella sorokiniana* UTEX 1602 and *Micractinium conductrix* SAG 241.80: implications to maltose excretion by a green alga. *The Plant Journal* 93, 566-586.

Atay, S., Özkoç, H.B., Uslu, V.R., 2013. Sediment toxicity for evaluation of sediment quality guidelines and bioavailability of copper and zinc. *Fresenius Environmental Bulletin* 22(4), 1031-1042.

Azhar, M., Zia ur Rehman, M., Ali, S., Qayyum, M.F., Naeem, A., et al., 2019. Comparative effectiveness of different biochars and conventional organic materials on growth, photosynthesis and cadmium accumulation in cereals. *Chemosphere* 227, 72-81.

B

Ballesteros-Torres, J.M., Samaniego-Moreno, L., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, R.S., Rodríguez-Padilla, C., et al., 2019. Amino acids and acylcarnitine production by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* microalgae from wastewater culture. *PeerJ* 7, e7977.

Barcytė, D., Hodač, L., Nedbalová, L., 2019. Overlooked diversity with terrestrial lifestyle in the predominantly freshwater and snow phylogroup *Chloromonadinia* (Volvocales, Chlorophyceae). *European Journal of Phycology* 55, 207-222.

Baxter, A., Mittler, R., Suzuki, N., 2013. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65, 1229-1240.

Betancort-Rodriguez, J., García-Reina, G., Santana-Rodriguez, J., 1997. Determination of free amino acids in microalgae by High-performance Liquid Chromatography using pre-column fluorescence derivatization. *Biomedical Chromatography* 11, 335-336.

Blake, R.C., Choate, D.M., Bardhan, S., Revis, N., Bartons, L.L., et al., 1993. Chemical transformation of toxic heavy metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1365-1376.

Blom, J.F., Pernthaler, J., 2010. Antibiotic effects of three strains of chrysophytes (*Ochromonas*, *Poterioochromonas*) on freshwater bacterial isolates. *FEMS Microbiology Ecology* 71, 281-290.

Boyd, C., 1973. Amino acid composition of freshwater microalgae. *Archives in Hydrobiology*, 72(1), 1-9

Brown, M., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145, 79-99.

Brown, M., Jeffrey, S., 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J Exp Mar Biol Ecol* 161, 91-113.

Brown, M., Miller, K., 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology* 4, 205-215.

Brown, M., Jeffrey, S., Volkmann, J., Dustan, G., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315-331.

Brown, M., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., Trenerry, C., 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 11, 247-255.

C

- Cañavate, J.P., 2019. Advancing assessment of marine phytoplankton community structure and nutritional value from fatty acid profiles of cultured microalgae. *Reviews in Aquaculture* 11, 527-549.
- Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., et al., 2013. Physiological and morphological responses of lead or cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *Springer Plus* 2, 1-7.
- Cerutti, H., Ma, X., Msanne, J., Repas, T., 2011. RNA-mediated silencing in algae: Biological roles and tools for analysis of gene function. *Eukaryotic Cell* 10, 1164-72.
- Cha, T.S., Chen, C.F., Yee, W., Aziz, A., Loh, S.H., 2011. Cinnamic acid, coumarin and vanillin: Alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis sp.* *Journal of Microbiological Methods* 84, 430-4.
- Chau, Y., Chuecas, L., Riley, J., 1967. The component combined amino acids of some marine phytoplankton species. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 47(3), 543-554
- Chen, B., Huang, Q., Lin, X., Shi, Q., Wu, S., 1998. Accumulation of Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Ni and Pb in *Pavlova viridis* Tseng (Haptophyceae). *Journal of Applied Phycology*. 10, 371-6.
- Chen, C.-Y., Jiesca, Hsieh, C., Lee, D.-J., Chang, C.-H., Chang, J.-S., 2016. Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresource Technology* 200, 500-505.
- Chen, F., Wang, F., Wu, F., Mao, W., Zhang, G., et al., 2010. Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 663-672.
- Chen H-C, Melis A 2004. Location and function of SulP, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 220:198-210
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods* 77(1):41-47.
- Chen, Y., Hu, H., 2019. High efficiency transformation by electroporation of the freshwater alga *Nannochloropsis limnetica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35.
- Cheng, J., Don-Paul, M., Antia, N., 1974. Isolation of an unusually stable cis-isomer of alloxanthin from a bleached autolysed culture of *Chroomonas salina* grown photoheterotrophically on glycerol. Observations on cis-trans isomerization of alloxanthin. *Journal of Protozoology* 21, 761-768.
- Chevalier, P., de la Noüe, J., 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microbiol Technol* 7, 621-624.
- Chia, S.R., Chew, K.W., Show, P.L., Yap, Y.J., Ong, H.C., et al., 2018. Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: A review. *Biotechnology Journal* 13, 1-10.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306.
- Chisti, Y., 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology* 167, 201-214.
- Cobbet, C., 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123, 825-832.
- Couso, I., Vila, M., Vígara, J., Cordero, B.F., Vargas, M.Á., et al., 2012. Synthesis of carotenoids and regulation of the carotenoid biosynthesis pathway in response to high light stress in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Phycology* 47, 223-232.

Cuaresma, M., Janssen, M., Vílchez, C., Wijffles, R., 2009. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a Short Light-Path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(2), 352-359.

Cuevas-Castillo, G.A., Navarro-Pineda, F.S., Baz Rodríguez, S.A., Sacramento Rivero, J.C., 2020. Advances on the processing of microalgal biomass for energy-driven biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 125, 109606.

Cui, H., Ma, H., Chen, S., Yu, J., Xu, W., et al., 2020. Mitigating excessive ammonia nitrogen in chicken farm flushing wastewater by mixing strategy for nutrient removal and lipid accumulation in the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology* 303, 122940.

D

D'Alessandro, A., Taamalli, M., Gevi, F., Timperio, A.M., Zolla, L., et al., 2013. Cadmium stress responses in *Brassica juncea*: Hints from proteomics and metabolomics. *Journal of Proteome Research* 12, 4979-97.

da Silva, A.A., Fonseca, G.G., 2018. Influence of luminosity, carbon source and concentration of salts in the physiology of *Chlorella sorokiniana*. *Environmental Technology* 41, 719-729.

Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., Wu, G., 2014. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 964, 116-127.

Daud, M.K., Mei, L., Najeeb, U., Khan, M.A., Deeba, F., et al., 2014. In vitro cadmium-induced alterations in growth and oxidative metabolism of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *The Scientific World Journal* 2014, 1-10.

Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G., 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry* 103, 891-899.

Dawson, H.N., Burlingame, R., Cannons, A.C., 1997. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Current Microbiology* 35, 356-62.

Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, Á., Lubián, L.M., 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1503-1513.

Derrien, A., Coiffard, J.M., Coiffard, C., de Roeck-Holtzhauer, Y., 1998. Free amino acid analysis of five microalgae. *Journal of Applied Phycology* 10, 131-134.

Devriese, M., Tsakaloudi, V., Garbayo, I., León, R., Vílchez, C., et al., 2001. Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 443-448.

Díaz-Santos, E., de la Vega, M., Vila, M., Vígara, J., León, R., 2013. Efficiency of different heterologous promoters in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology Progress* 29, 319-328.

Díaz-Santos, E., Vila, M., Vígara, J., León, R., 2015. A new approach to express transgenes in microalgae and its use to increase the flocculation ability of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology* 28, 1611-1621.

Diner, R.E., Schwenck, S.M., McCrow, J.P., Zheng, H., Allen, A.E., 2016. Genetic manipulation of competition for nitrate between heterotrophic bacteria and diatoms. *Frontiers in Microbiology* 7.

Ding, G.T., Mohd Yasin, N.H., Takriff, M.S., Kamarudin, K.F., Salihon, J., et al., 2020. Phycoremediation of palm oil mill effluent (POME) and CO₂ fixation by locally isolated microalgae: *Chlorella sorokiniana* UKM2, *Coelastrella* sp. UKM4 and *Chlorella pyrenoidosa* UKM7. *Journal of Water Process Engineering* 35, 101202.

Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., et al., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7, 2189-2212.

Domínguez, M., 2008. Estrés abiótico en *Chlamydomonas reinhardtii*: Toxicidad y mecanismos de defensa, In Department of Chemistry "Prof JC Vilchez Martín", Department of Chemistry "Prof JC Vilchez Martín". University of Huelva, p. 137.

Domínguez, MJ., Gutiérrez, F., León, R., Vilchez, C., Vega, JM., et al., 2003. Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:828–832

Doron, L., Segal, N.a., Shapira, M., 2016. Transgene expression in microalgae-From tools to applications. *Frontiers in Plant Science* 7.

Doshi, H., Ray, A., Kothari, A., 2007. Bioremediation potential of live and dead Spirulina: Spectroscopic, kinetics and SEM studies. *Biotechnol Bioengin* 96(6), 1051-1063.

Du, H., Liang, H., Jiang, Y., Qu, X., Yan, H., et al., 2018. Proteome responses of *Gracilaria lemaneiformis* exposed to lead stress. *Marine Pollution Bulletin* 135, 311-317.

E

Einicker-Lamas, M., Soares, MJ., Soares, MS., Oliveira, MM. 1996. Effects of cadmium on *Euglena gracilis* membrane lipids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29(8), 941-948

Ellison, M.B., de Nys, R., Paul, N.A., Roberts, D.A., 2014. Growth and metal bioconcentration by conspecific freshwater macroalgae cultured in industrial waste water. *Peer Journal* 2, e401.

Erdal, S., Turk, H., 2016. Cysteine-induced upregulation of nitrogen metabolism-related genes and enzyme activities enhance tolerance of maize seedlings to cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany* 132, 92-99.

F

Fabris, M., Abbriano, R.M., Pernice, M., Sutherland, D.L., Commault, A.S., et al., 2020. Emerging technologies in algal biotechnology: Toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Frontiers in Plant Science* 11.

Fajardo, C., Donato, M., Carrasco, R., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M., et al., 2019. Advances and challenges in genetic engineering of microalgae. *Reviews in Aquaculture* 12, 365-381.

Feng, S., Li, X., Xu, Z., Qi, J., 2014. *Dunaliella salina* as a novel host for the production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 4293–300.

Fernandes, MS., Calsing, LG., Nascimento, RC., Santana, H., Morais, PB., et al., 2019. Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. *Algal Research* 38, 101402

Ferreira, A.F., Ferreira, A., Dias, A.P.S., Gouveia, L., 2020. Pyrolysis of *Scenedesmus obliquus* biomass following the treatment of different wastewaters. *BioEnergy Research* 13, 896-906.

Fontaine, J.-X., Tercé-Laforgue, T., Armengaud, P., Clément, G., Renou, J.-P., et al., 2012. Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of *Arabidopsis* demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. *The Plant Cell* 24, 4044-4065.

Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management* 92, 407-418.

G

- Gadd, G., 1993. Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 11, 297-316.
- Gamboa-Delgado, J., Márquez-Reyes, J.M., 2018. Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture* 10, 224-246.
- Gantar, M., Obrecht, Z., Dalmacija, B., 1991. Nutrient removal and algal succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Bioresource Technology* 36, 167-171.
- García-Balboa, C., Baselga-Cervera, B., García-Sánchez, A., Igual, J.M., Lopez-Rodas, V., et al., 2013. Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology* 144-145, 116-123
- Garrido-Cardenas, JA., Han, X., Alonso, DL., García-Maroto, F., 2019. Evaluation and optimization of a methodology for the long-term cryogenic storage of *Tetradismus obliquus* at -80°C. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 2381-90.
- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N.M.P., Hultink, E.J., 2017. The circular economy-A new sustainability paradigm? *Journal of Cleaner Production* 143, 757-768.
- Geng, D., Wang, Y., Wang, P., Li, W., Sun, Y., 2003. Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 15, 451-6.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- Giovanardi, M., Ferroni, L., Baldisserotto, C., Tedeschi, P., Maietti, A., et al., 2012. Morphophysiological analyses of *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) grown mixotrophically in a carbon-rich waste product. *Protoplasma* 250, 161-174.
- González-Ballester, D., Camargo, A., Fernández, E., 2004. Ammonium transporter genes in *Chlamydomonas*: the nitrate-specific regulatory gene *Nit2* is involved in *Amt1;1* expression. *Plant Molecular Biology* 56, 863-878.
- Gris, B., Morosinotto, T., Giacometti, G.M., Bertucco, A., Sforza, E., 2013. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: Effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172, 2377-2389.
- Gronostajski, R., Yeung, A., Schmit, R., 1978. Purification and properties of the inducible nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Bacteriology* 134, 621-628.
- Grossman, A.R., Lohr, M., Im, C.H., 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* the landscape of pigments. *Annual Reviews Genetics* 38, 119-173.
- Gupta, K.J., Zabalza, A., van Dongen, J.T., 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiolia Plantarum* 137, 383-391.
- Gutsch, A., Keunen, E., Guerriero, G., Renaut, J., Cuypers, A., et al., 2018. Long-term cadmium exposure influences the abundance of proteins that impact the cell wall structure in *Medicago sativa* stems. *Plant Biology* 20, 1023-1035.

H

Hamed, I., 2016. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15, 1104-1123.

Hamed, S.M., Selim, S., Klöck, G., AbdElgawad, H., 2017. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144, 19-25.

Hanumante, N.C., Shastri, Y., Hoadley, A., 2019. Assessment of circular economy for global sustainability using an integrated model. *Resources, Conservation and Recycling* 151, 104460.

Harris, E., 2009. *The Chlamydomonas sourcebook*. 2nd ed.

Hasan, M.K., Cheng, Y., Kanwar, M.K., Chu, X.-Y., Ahammed, G.J., Qi, Z.-Y., 2017. Responses of plant proteins to heavy metal stress: A review. *Frontiers in Plant Science* 8, 1492, 1-16.

He, L., Jing, Y., Shen, J., Li, X., Liu, H., et al., 2019. Mitochondrial pyruvate carriers prevent cadmium toxicity by sustaining the TCA cycle and glutathione synthesis. *Plant Physiology* 180, 198-211.

He, N., Sun, X., Zhong, Y., Sun, K., Liu, W., et al., 2016. Removal and biodegradation of nonylphenol by four freshwater microalgae. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13, 1239.

Henderson, R., Mackinlay, E., 1989. Effect of temperature in lipid composition of the marine cryptomonad *Chroomonas salina*. *Phytochemistry* 28, 2943-2948.

Henley, W.J., 2019. The past, present and future of algal continuous cultures in basic research and commercial applications. *Algal Research* 43, 101636.

Heureux, A.M.C., Young, J.N., Whitney, S.M., Eason-Hubbard, M.R., Lee, R.B.Y., et al., 2017. The role of Rubisco kinetics and pyrenoid morphology in shaping the CCM of haptophyte microalgae. *Journal of Experimental Botany* 68, 3959-3969.

Hillebrand, H., Sommer, U., 1999. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnology and Oceanography* 44(2):440-446.

Hopes, A., Mock, T., 2015. Evolution of microalgae and their adaptations in different marine ecosystems. 1-9.

Hossain, N., Bhuiyan, M.A., Pramanik, B.K., Nizamuddin, S., Griffin, G., 2020. Waste materials for wastewater treatment and waste adsorbents for biofuel and cement supplement applications: A critical review. *Journal of Cleaner Production* 255, 120261.

Hu, Z., Qi, Y., Zhao, L., Chen, G., 2018. Interactions between microalgae and microorganisms for wastewater remediation and biofuel production. *Waste and Biomass Valorization* 10, 3907-3919.

Huss, V., Frank, C., Hartmann, E., Hirmer, M., Klobucek, A., et al., 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (chlorophyta). *Journal of Phycology* 35, 587-598.

I

Ianora, A., Serive, B., Nicolau, E., Bérard, J.-B., Kaas, R., et al., 2017. Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *Plos One* 12, e0171872.

Ishiguro, S., Robben, N., Burghart, R., Cote, P., Greenway, S., et al., 2020. Cell wall membrane fraction of *Chlorella sorokiniana* enhances host antitumor immunity and inhibits colon carcinoma growth in mice. *Integrative Cancer Therapies* 19, 153473541990055.

Ismail, M.M.S., Said, A.A., 2018. Tolerance of *Pseudochlorella pringsheimii* to Cd and Pb stress: Role of antioxidants and biochemical contents in metal detoxification. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164, 704-712.

J

Jain, M.K., Das, A., 2017. Impact of mine waste leachates on aquatic environment: A review. *Current Pollution Reports* 3, 31-37.

Jazzar, S., Berrejeb, N., Messaoud, C., Marzouki, M.N., Smaali, I., 2016. Growth parameters, photosynthetic performance, and biochemical characterization of newly isolated green microalgae in response to culture condition variations. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 179, 1290-1308.

Jiang, Y., Purchase, D., Jones, H., Garelick, H., 2011. Technical note: Effects of arsenate (As⁵⁺) on growth and production of glutathione (GSH) and phytochelatins (PCS) in *Chlorella Vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation* 13, 834-844.

K

Kania, K., Zienkiewicz, M., Drożak, A., 2019. Stable transformation of unicellular green alga *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 via electroporation. *Protoplasma* 257, 607-611.

Kapoor, RV., Huete-Ortega, M., Day, J.G., Okurowska, K., Slocombe, SP., et al., 2019. Effects of cryopreservation on viability and functional stability of an industrially relevant alga. *Science Reports* 9, 1-12.

Kato, S., Tanno, Y., Takaichi, S., Shinomura, T., 2019. Low temperature stress alters the expression of phytoene desaturase genes (*crtP1* and *crtP2*) and the ζ-carotene desaturase gene (*crtQ*) together with the cellular carotenoid content of *Euglena gracilis*. *Plant Cell Physiology* 60, 274-284.

Khan, S.A., Rashmi, Hussain, M.Z., Prasad, S., Banerjee, U.C., 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 2361-2372.

Kim, J., Kim, M., Lee, S., Jin, E., 2020a. Development of a *Chlorella vulgaris* mutant by chemical mutagenesis as a producer for natural violaxanthin. *Algal Research* 46, 101790.

Kim, J., Lee, S., Baek, K., Jin, E., 2020b. Site-Specific Gene knock-out and on-site heterologous gene overexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* via a CRISPR-Cas9-mediated knock-in method. *Frontiers in Plant Science* 11.

Kim, J.H., Choi, W., Jeon, S.M., Kim, T., Park, A., et al., 2015. Isolation and characterization of *Leptolyngbya* sp. KIOST-1, a basophilic and euryhaline filamentous cyanobacterium from an open paddle-wheel raceway *Arthrospira* culture pond in Korea. *Journal of Applied Microbiology* 119, 1597-1612.

Kim, S., Park, J.E., Cho, Y.B., Hwang, S.J., 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology* 144, 8-13.

Kliphuis, A.M.J., Martens, D.E., Janssen, M., Wijffels, R.H., 2011. Effect of O₂:CO₂ ratio on the primary metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology and Bioengineering* 108, 2390-2402.

Kohli, I., Joshi, N.C., Mohapatra, S., Varma, A., 2020. Extremophile-An adaptive strategy for extreme conditions and applications. *Current Genomics* 21, 96-110

Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G., 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 6, 52-63.

Krasny, L., Bland, P., Kogata, N., Wai, P., Howard, B.A., et al., 2018. SWATH mass spectrometry as a tool for quantitative profiling of the matrisome. *Journal of Proteomics* 189, 11-22.

- Kirsop, B., 1984. Maintenance of microorganisms: a manual of laboratory methods. Bases Bireme Br.
- Kumar, M., Jeon, J., Choi, J., Kim, S.R., 2018. Rapid and efficient genetic transformation of the green microalga *Chlorella vulgaris*. Journal of Applied Phycology 30, 1735–45
- Kumar, N., Gautam, A., Dubey, A.K., Ranjan, R., Pandey, A., et al., 2019. GABA mediated reduction of arsenite toxicity in rice seedling through modulation of fatty acids, stress responsive amino acids and polyamines biosynthesis. Ecotoxicology and Environmental Safety 173, 15-27.
- Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Das, D., 2016. Synchronized growth and neutral lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* FC6 IITG under continuous mode of operation. Bioresource Technology 200, 770-779.
- Kumar, V., Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Ghoshal, A.K., Das, D., 2014. High cell density lipid rich cultivation of a novel microalgal isolate *Chlorella sorokiniana* FC6 IITG in a single-stage fed-batch mode under mixotrophic condition. Bioresource Technology 170, 115-124.
- L**
- Lai, Y.-C., Chang, C.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., Ng, I.S., 2019. Towards protein production and application by using *Chlorella* species as circular economy. Bioresource Technology 289, 121625.
- León, J., Romero, L., Galván, F., Vega, J., 1987. Purification and physicochemical characterization of O-Acetyl-L-Serine sulfhydrylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Science 53, 93-99.
- León, R., Galván, F., 1999. Analysis of effective light in different photobioreactors: Its influence on growth, photosynthetic activity and glycerol production by the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 13, 237-239.
- León, R., Galván, A., Fernández, E., 2007. Transgenic microalgae as green cell factories. 2nd ed: Springer.
- León-Bañares, R., González-Ballester, D., Galván, A., Fernández, E., 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. Trends in Biotechnology 22, 45–52.
- Leong, Y.K., Chang, J.-S., 2020. Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. Bioresource Technology 303, 122886.
- Levy, J.L., Stauber, J.L., Adams, M.S., Maher, W.A., Kirby, J.A., et al., 2005. Toxicity, biotransformation and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella sp.* and *Monoraphidium arcuatum*). Environmental Toxicology and Chemistry 24, 2630-2639.
- Li, A., Zhang, L., Zhao, Z., Ma, S., Wang, M., et al., 2016. Prescreening, identification and harvesting of microalgae with antibacterial activity. Biologia 71.
- Li, H., Watson, J., Zhang, Y., Lu, H., Liu, Z., 2020. Environment-enhancing process for algal wastewater treatment, heavy metal control and hydrothermal biofuel production: A critical review. Bioresource Technology 298, 122421
- Li, H., Nguyen, H., Loo, R., Campuzano, I., Loo, J., 2018. An integrated native mass spectrometry and top-down proteomics method that connects sequence to structure and function of macromolecular complexes. Nature Chemistry 10, 139-148.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., Chen, S., 2013. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. Bioresource Technology 131, 60-67.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., Chen, S., 2014. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. Biomass and Bioenergy 66, 204-213.
- Li, T., Gargouri, M., Feng, J., Park, J.-J., Gao, D., et al., 2015. Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. Bioresource Technology 180, 250-257.

Li, T., Yang, F., Xu, J., Wu, H., Mo, J., et al., 2020. Evaluating differences in growth, photosynthetic efficiency, and transcriptome of *Asterarcys* sp. SCS-1881 under autotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culturing conditions. *Algal Research* 45, 101753.

Liang, S., Kang, Y., Zeng, L., Qin, Y., Wang, L., et al., 2017. How *Chlorella sorokiniana* and its high tolerance to Pb might be a potential Pb biosorbent. *Polish Journal of Environmental Studies* 26, 1139-1146.

Lima-Costa, M.E., Tavares, C., Raposo, S., Rodrigues, B., Peinado, J.M., 2012. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39, 789-797.

Lim, S.-L., Chu, W.-L., Phang, S.-M., 2010. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology* 101, 7314-7322.

Lin, Q., Liang, J.-R., Huang, Q.-Q., Luo, C.-S., Anderson, et al., 2017. Differential cellular responses associated with oxidative stress and cell fate decision under nitrate and phosphate limitations in *Thalassiosira pseudonana*: Comparative proteomics. *Plos One* 12, e0184849.

Lin, S., Litaker, R.W., Sunda, W.G., Wood, M., 2016. Phosphorus physiological ecology and molecular mechanisms in marine phytoplankton. *Journal of Phycology* 52, 10-36.

Lin, W., Li, P., Liao, Z., Luo, J., 2017. Detoxification of ammonium to *Nannochloropsis oculata* and enhancement of lipid production by mixotrophic growth with acetate. *Bioresource Technology* 227, 404-407.

Lin, W.R., Ng, I.S., 2020. Development of CRISPR/Cas9 system in *Chlorella vulgaris* FSP-E to enhance lipid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology* 133, 109458.

Liu, J., Sun, Z., Gerken, H., Huang, J., Jiang, Y., et al., 2014. Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 5069-79.

Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Chen, X., Zhang, P., et al., 2013. Development of a new method for genetic transformation of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Molecular Biotechnology* 54, 211-9.

Lizzul, A.M., Hellier, P., Purton, S., Baganz, F., Ladommatos, N., et al., 2014. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. *Bioresource Technology* 151, 12-18.

Lohman, E.J., Gardner, R.D., Pedersen, T., Peyton, B.M., Cooksey, K.E., et al., 2015. Optimized inorganic carbon regime for enhanced growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology for Biofuels* 8.

Lourenço, S.O., Barbarino, E., Lavín, P.L., Lanfer Marquez, U.M., Aidar, E., 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology* 39, 17-32.

M

Ma, H., Zou, D., Wen, J., Ji, Z., Gong, J., Liu, C., 2018. The impact of elevated atmospheric CO₂ on cadmium toxicity in *Pyropiahaitanensis* (Rhodophyta). *Environmental Science and Pollution Research* 25, 33361-33369.

Mano, J., 2002. Early events in environmental stresses in plants-induction mechanisms of oxidative stress. *Oxidative Stress in Plants. Induction Mechanisms of oxidative Stress*. pp 217-246. London, UK.

Marchello, A.E., Lombardi, A.T., Dellamano-Oliveira, M.J., Souza, C.W., 2015. Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 75-84.

Marchello, A.E., Oliveira, N.L., Lombardi, A.T., Polpo, A., 2018. An investigation onto Cd toxicity to freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* in mixotrophy and photoautotrophy: A Bayesian approach. *Chemosphere* 211, 794-803

Markou, G., Depraetere, O., Muylaert, K., 2016. Effect of ammonia on the photosynthetic activity of *Arthrospira* and *Chlorella*: A study on chlorophyll fluorescence and electron transport. *Algal Research* 16, 449-457.

Martin-Jézéquel, V., Poulet, S.A., Harris, R.P., Moal, J., Samain, J.F., 1988. Interspecific and intraspecific composition and variation of free amino acids in marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 44, 303-313.

Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., 2012. World aquaculture: Environmental impacts and troubleshooting alternatives. *The Scientific World Journal* 2012, 1-9.

Martínez-Rivas, J., Vega, J., 1998. Purification and characterization of NAD-Isocitrate Dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 118, 249-255.

Martins, D., English, A.M., 2014. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biology* 2, 308-313

Miflin, B.J., Habash, D.Z., 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* 53(370), 979-987.

Mini, P., Demurtas, O.C., Valentini, S., Pallara, P., Aprea, G., et al., 2018. *Agrobacterium*-mediated and electroporation-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*: a comparative study. *BMC Biotechnology* 18.

Molazadeh, M., Ahmadzadeh, H., Pourianfar, H.R., Lyon, S., Rampelotto, P.H., 2019. The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO₂ biofixation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7.

Morelli, E., Scarano, G., 2004. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Science* 167, 289-296.

Mu, C., Zhang, S., Yu, G., Chen, N., Li, X., et al., 2013. Overexpression of small heat shock protein LimHSP16.45 in *Arabidopsis* enhances the tolerance to abiotic stress. *Plos One* 8, e82264.

Muthuraj, M., Palabhanvi, B., Misra, S., Kumar, V., Sivalingavasu, K., et al., 2013. Flux balance analysis of *Chlorella sp.* FC2 IITG under photoautotrophic and heterotrophic growth conditions. *Photosynthesis Research* 118, 167-179.

N

Nagarajan, D., Lee, D.-J., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2020. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource Technology* 302, 122817.

Nakanishi, K., Deuchi, K., Kuwano, K., 2012. Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage. *Journal of Applied Phycology* 24, 1381-5.

Nanda, M., Kumar, V., Fatima, N., Pruthi, V., Verma, M., et al., 2019. Detoxification mechanism of organophosphorus pesticide via carboxylestrase pathway that triggers de novo TAG biosynthesis in oleaginous microalgae. *Aquatic Toxicology* 209, 49-55.

Newton, R.J., McClary, J.S., 2019. The flux and impact of wastewater infrastructure microorganisms on human and ecosystem health. *Current Opinion in Biotechnology* 57, 145-150.

Nirmalakhandan, N., Selvaratnam, T., Henkanatte-Gedera, S.M., Tchinda, D., Abeysiriwardana-Arachchige, I.S.A., et al., 2019. Algal wastewater treatment: Photoautotrophic vs. mixotrophic processes. *Algal Research* 41, 101569.

Norashikin, MN., Loh, SH., Aziz, A., Cha, TS., 2018. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* using an endogenous omega-3 fatty acid desaturase gene with its promoter. *Algal Research* 31, 262–75.

Nowicka, B., Pluciński, B., Kuczyńska, P., Kruk, J., 2016. Prenyl lipid antioxidants participate in response to acute stress induced by heavy metals in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental and Experimental Botany* 123, 98-107.

O

Ouyang, W., Wang, Y., Lin, C., He, M., Hao, F., et al., 2018. Heavy metal loss from agricultural watershed to aquatic system: A scientometrics review. *Science of the Total Environment* 637-638, 208-220.

P

Pacheco, D., Rocha, A.C., Pereira, L., Verdelhos, T., 2020. Microalgae water bioremediation: Trends and hot topics. *Applied Sciences* 10, 1886.

Paranjape, K., Leite, G.B., Hallenbeck, P.C., 2016. Effect of nitrogen regime on microalgal lipid production during mixotrophic growth with glycerol. *Bioresource Technology* 214, 778-786.

Patel, A., Matsakas, L., Rova, U., Christakopoulos, P., 2019. A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* 278, 424-434.

Patel, A.K., Choi, Y.Y., Sim, S.J., 2020. Emerging prospects of mixotrophic microalgae: Way forward to sustainable bioprocess for environmental remediation and cost-effective biofuels. *Bioresource Technology* 300, 122741.

Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45, 11-36.

Pfaffl, M., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2002-2007.

Pires, J.M., 2015. Mass production of microalgae. In: Kim S (ed). *Handbook of marine microalgae biotechnology advances*, pp. 55-65. Elsevier, London.

Poirier, I., Pallud, M., Kuhn, L., Hammann, P., Demortière, A., et al., 2018. Toxicological effects of CdSe nanocrystals on the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*: The first mass spectrometry-based proteomic approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 152, 78-90.

Prasad, B., Lein, W., Lindenberger, CP., Buchholz, R., Vadakedath, N., 2019a. An optimized method and a dominant selectable marker for genetic engineering of an industrially promising microalga *Pavlova lutheri*. *Journal of Applied Phycology* 31, 1163–74.

Prasad, B., Lein, W., Thiyam, G., Lindenberger, CP., Buchholz, R., et al., 2019b. Stable nuclear transformation of rhodophyte species *Porphyridium purpureum*: Advanced molecular tools and an optimized method. *Photosynthesis Research* 140, 173–88.

Praveen, A., Pandey, A., Gupta, M., 2019. Nitric oxide alters nitrogen metabolism and PIN gene expressions by playing protective role in arsenic challenged *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 176, 95-107.

Pundir, S., Martin, M.J., O'Donovan, C., UniProt, C. 2016. UniProt Tools. *Current Protocols in Bioinformatics* 53: 1 29 21-15.

R

- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Fuerstenberg, S.I., Tae, H., Settlage, R.E., et al., 2012. Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature Communications* 3.
- Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., Bux, F., 2014. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource Technology* 168, 127-135.
- Randall, D., Tsui, T., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution bulletin* 45, 17-23.
- Rani, S., Chowdhury, R., Tao, W., Srinivasan, A., 2019. Tertiary treatment of municipal wastewater using isolated algal strains: treatment efficiency and value-added products recovery. *Chemistry and Ecology* 36, 48-65.
- Raposo, S., Constantino, A., Rodrigues, F., Rodrigues, B., Lima-Costa, M.E., 2017. Nitrogen sources screening for ethanol production using carob industrial wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181, 827-843.
- Ravindran, B., Gupta, S., Cho, W.-M., Kim, J., Lee, S., et al., 2016. Microalgae potential and multiple roles. Current progress and future prospects-An overview. *Sustainability* 8, 1215.
- Rengel, R., Smith, R.T., Haslam, R.P., Sayanova, O., Vila, M., et al., 2018. Overexpression of acetyl-CoA synthetase (ACS) enhances the biosynthesis of neutral lipids and starch in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 31, 183-193.
- Riaño, B., Blanco, S., Becares, E., García-González, M.C., 2016. Bioremediation and biomass harvesting of anaerobic digested cheese whey in microalgal-based systems for lipid production. *Ecological Engineering* 97, 40-45.
- Rodrigues, B., Lima-Costa, M.E., Constantino, A., Raposo, S., Felizardo, C., et al., 2016. Growth kinetics and physiological behavior of co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, fermenting carob sugars extracted with whey. *Enzyme and Microbial Technology* 92, 41-48.
- Rodríguez-Ruiz, M., Aparicio-Chacón, M.V., Palma, J.M., Corpas, F.J., 2019. Arsenate disrupts ion balance, sulfur and nitric oxide metabolisms in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Environmental and Experimental Botany* 161, 143-156.
- Romero-Cruz, M., 2017. Estrés abiótico en el metabolismo del nitrógeno y en el sistema antioxidante de la microalga acidófila *Coccomyxa onubensis*, In Department of Chemistry "Prof JC Vílchez Martín". University of Huelva, p. 227.
- Ronnestad, I., Conceição, L., Aragao, C., Dinis, M., 2000. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). *The Journal of Nutrition* 130, 2809-2812.
- Roostaei, J., Zhang, Y., 2017. Spatially explicit life cycle assessment: Opportunities and challenges of wastewater-based algal biofuels in the United States. *Algal Research* 24, 395-402.
- Ruiz-Domínguez, MC., Vaquero, I., Obregón, V., de la Morena, B., Vílchez, C., et al., 2015. Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp. (strain *onubensis*) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology* 27, 1099-1108.
- Ruiz-Domínguez, MC., Vaquero, I., Rivas, M., Zapata, M., Mogedas, B., et al., 2016. Biomass production and fatty acid accumulation in *Chlorella* sp. (strain DEC1B) isolated from a pretol refinery in Huelva (Spain). *Phycological Research* 64, 72-78.

Run, C., Fang, L., Fan, J., Fan, C., Luo, Y., et al., 2016. Stable nuclear transformation of the industrial alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Research* 17, 196–201.

S

Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., Vega, M., Bolado, S., 2018. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology* 263, 49-57.

Salama, E.-S., Roh, H.-S., Dev, S., Khan, M.A., Abou-Shanab, R.A., et al., 2019. Algae as a green technology for heavy metals removal from various wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35.

Sambrook, J.F., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Santiago-Martínez, M.G., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J.C., et al., 2015. Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Material* 288, 104-112.

Sanz-Luque, E., Chamizo-Ampudia, A., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E., 2015. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science* 6.

Schuelter, A.R., Kroumov, A.D., Hinterholz, C.L., Fiorini, A., Trigueros, D.E.G., et al., 2019. Isolation and identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites. *Biochemical Engineering Journal* 144, 28-39.

Sewelam, N., Kazan, K., Hüdig, M., Maurino, V.G., Schenk, P.M., 2019. The *AtHSP17.4C1* gene expression is mediated by diverse signals that link biotic and abiotic stress factors with ROS and can be a useful molecular marker for oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 3201.

Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M.A., et al., 2017. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* 30, 197-213.

Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M.Z., et al., 2020. Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of the Total Environment* 704, 135303.

Shapiro, B., Stadtman, E., 1970. [130] Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods in Enzymology* 17, 910-922.

Sharma, PK., Saharia, M., Srivastava, R., Kumar, S., Sahoo, L., 2018. Tailoring microalgae for efficient biofuel production. *Frontiers in Marine Sciences* 5, 1–19.

Shi, J., Podola, B., Melkonian, M., 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *Journal of Applied Phycology* 19, 417-423.

Shihira, I., Krauss, R.W., 1965. *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. pp. 1-97. Maryland: University of Maryland, College Park.

Singh, J., Dhar, D.W., 2019. Overview of carbon capture technology: Microalgal biorefinery concept and state-of-the-art. *Frontiers in Marine Science* 6.

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2016. Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science* 6.

Sizova, I., Fuhrmann, M., Hegemann, P., 2001. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 277, 221-229.

Sobczuk, T.M., Camacho, F.G., Grima, E.M., Chisti, Y., 2005. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28, 243-250.

Stabili, L., Cecere, E., Licciano, M., Petrocelli, A., Sicuro, B., et al., 2019. Integrated multitrophic aquaculture by-products with added value: The polychaete *Sabella spallanzanii* and the seaweed *Chaetomorpha linum* as potential dietary ingredients. *Marine Drugs* 17, 677.

Sueoka, N., 1960. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA* 46(1):83-91.

Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., Shin, K.-H., 2015. Microalgae-A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113, 329-352.

Sydney, E.B., da Silva, T.E., Tokarski, A., Novak, A.C., de Carvalho, J., et al., 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy* 88, 3291-3294.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., et al., 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research* 43, D447-D452.

T

Tan, C.H., Show, P.L., Lam, M.K., Fu, X., Ling, T.C., et al., 2020. Examination of indigenous microalgal species for maximal protein synthesis. *Biochemical Engineering Journal* 154, 107425.

Tan, K.W.M., Lee, Y.K., 2016. The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. *Biotechnology for Biofuels* 9.

Tanaka, R., Kikutani, S., Mahardika, A., Matsuda, Y., 2014. Localization of enzymes relating to C4 organic acid metabolisms in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*. *Photosynthesis Research* 121, 251-263.

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metals toxicity and the environment. *EXS* 101, 133-164.

Teco-Bravo, JI., Barahona-Pérez, LF., Reyes-Sosa, CF., Ku-González, ÁF., Herrera-Valencia, VA., et al., 2019. Enhanced production of triacylglycerols and polyunsaturated fatty acids in novel acid-tolerant mutants of the green microalga *Chlorella saccharophila*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42, 1561-71.

Templeton, D.W., Laurens, L.M.L., 2015. Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. *Algal Research* 11, 359-367.

Teuling, E., Wierenga, P.A., Schrama, J.W., Gruppen, H., 2017. Comparison of protein extracts from various unicellular green sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 7989-8002.

Thangaraj, S., Shang, X., Sun, J., Liu, H., 2019. Quantitative proteomic analysis reveals novel insights into intracellular silicate stress-responsive mechanisms in the diatom *Skeletonema dohrnii*. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2540.

Tičina, V., Katavić, I., Grubišić, L., 2020. Marine aquaculture impacts on marine biota in oligotrophic environments of the Mediterranean sea – A review. *Frontiers in Marine Science* 7.

Torres, M.A., Barros, M.P., Campos, S.C.G., Pinto, E., Rajamani, S., et al., 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 1-15.

U

Úbeda-Mínguez, P., García-Maroto, F., Alonso, DL., 2017. Heterologous expression of DGAT genes in the marine microalga *Tetraselmis chui* leads to an increase in TAG content. *Journal of Applied Phycology* 29, 1913–26.

Upadhyay, A.K., Mandotra, S.K., Kumar, N., Singh, N.K., Singh, L., et al., 2016. Augmentation of arsenic enhances lipid yield and defense responses in alga *Nannochloropsis sp.* *Bioresource Technology* 221, 430-437.

V

Varela, J.C., Pereira, H., Vila, M., León, R., 2015. Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis Research* 125, 423-436.

Vargas e Silva, F., Monteggia, L.O., 2015. Pyrolysis of algal biomass obtained from high-rate algae ponds applied to wastewater treatment. *Frontiers in Energy Research* 3.

Varshney, P., Beardall, J., Bhattacharya, S., Wangikar, P.P., 2018. Isolation and biochemical characterisation of two thermophilic green algal species- *Asterarcys quadricellulare* and *Chlorella sorokiniana*, which are tolerant to high levels of carbon dioxide and nitric oxide. *Algal Research* 30, 28-37.

Vega, J.M., Garbayo, I., Domínguez, M.J., Vígara, J., 2006. Effect of abiotic stress on photosynthesis and respiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Enzyme Microbiology and Technology* 40, 163-167.

Vega JM., 2019. Nitrogen and sulfur metabolism in microalgae and plants: 50 years of research *Progress in Botany* 81. Ed: Springer 1st Edition. 1-40

Vígara, J., Vega, JM., 2020. Alimentos del futuro: alternativos, transgénicos y editados. 2nd ed: Universidad de Sevilla.

Vizcaino, J.A., Csordas, A., del-Toro, N., Dianas, J.A., Griss, J., et al., 2016. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Research* 44: D447-456.

W

Walsh, R.G., He, S., Yarnes, C.T., 2014. Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of amino acids: a rapid, chloroformate-based method for ecological studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28, 96-108.

Wahyu, SN., Do-A, K., Dong-Woo, K., Bon-Won K., Young, HJK., 2016. Current advances in cryopreservation of microalgae. *Journal of Marine Life Science* 1, 70–8.

Wan, M., Wang, R., Xia, J., Rosenberg, J., Nie, Z., et al., 2012. Physiological evaluation of a new *Chlorella sorokiniana* isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 109, 1958-1964.

Wan, M., Jin, X., Xia, J., Rosenberg, J.N., Yu, G., et al., 2014. The effect of iron on growth, lipid accumulation, and gene expression profile of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 9473-9481.

Wang, J., Yang, H., Wang, F., 2014. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172, 3307-3329.

Wang, L., Kang, Y., Liang, S., Chen, D., Zhang, Q., et al., 2018. Synergistic effect of co-exposure to cadmium (II) and 4-n-nonylphenol on growth inhibition and oxidative stress of *Chlorella sorokiniana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 154, 145-153.

- Wang, L., Yang, L., Wen, X., Chen, Z., Liang, Q., et al., 2019 Rapid and high efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation. *Bioscience Reports* 39, 1–8.
- Wang, S.K., Stiles, A.R., Guo, C., Liu, C.-Z., 2014. Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Engineering in Life Sciences* 14, 550-559.
- Wang, W., 2002. Interactions of trace metals and different marine food chains. *Marine Ecology Progress* 243, 295-309.
- Wang, Y., Rischer, H., Eriksen, N.T., Wiebe, M.G., 2013. Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids. *Bioresource Technology* 144, 608-614.
- Wang, Y., Wang, S., Xu, P., Liu, C., Liu, M., et al., 2015. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14, 427-451.
- Wang, Y., Chiu, S.-Y., Ho, S.-H., Liu, Z., Hasunuma, T., et al., 2016a. Improving carbohydrate production of *Chlorella sorokiniana* NIES-2168 through semi-continuous process coupled with mixotrophic cultivation. *Biotechnology Journal* 11, 1072-1081.
- Wang, Y., Hallenbeck, P.C., Leite, G.B., Paranjape, K., Huo, D.-Q., 2016b. Growth and lipid accumulation of indigenous algal strains under photoautotrophic and mixotrophic modes at low temperature. *Algal Research* 16, 195-200.
- Wijffels, R.H., Barbosa, M., 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329, 796-799.

X

- Xian, L., Zhang, Y., Cao, Y., Wan, T., Gong, Y., et al., 2020. Glutamate dehydrogenase plays an important role in ammonium detoxification by submerged macrophytes. *Science of The Total Environment* 722, 137859.
- Xiong, J.-Q., Kurade, M.B., Abou-Shanab, R.A.I., Ji, M.-K., Choi, J., et al., 2016. Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresource Technology* 205, 183-190.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology* 126, 499-507.

Y

- Yadav, G., Dash, S.K., Sen, R., 2019. A biorefinery for valorization of industrial waste-water and flue gas by microalgae for waste mitigation, carbon-dioxide sequestration and algal biomass production. *Science of The Total Environment* 688, 129-135.
- Yamasaki, T., Miyasaka, H., Ohama, T., 2008. Unstable RNAi effects through epigenetic silencing of an inverted repeat transgene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 180, 1927–44.
- Yan H, Pan G. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*. 2002;40(471-476).
- Yang, J., Cao, J., Xing, G., Yuan, H., 2015. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology* 175, 537-544.
- Yang, R., Wei, D., Xie, J., 2020. Diatoms as cell factories for high-value products: chrysolaminarin, eicosapentaenoic acid, and fucoxanthin. *Critical Reviews in Biotechnology* 40, 993-1009.

Yeh, K.-L., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2012. pH-stat photoheterotrophic cultivation of indigenous *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biomass and lipid production using acetic acid as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal* 64, 1-7.

Yoshida, N., Ikeda, R., Okuno, T., 2006. Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation. *Bioresource Technology* 97, 1843-1849.

Yun, J.-H., Cho, D.-H., Heo, J., Lee, Y.J., Lee, B., et al., 2019. Evaluation of the potential of *Chlorella sp.* HS2, an algal isolate from a tidal rock pool, as an industrial algal crop under a wide range of abiotic conditions. *Journal of Applied Phycology* 31, 2245-2258.

Z

Zhang, L., Lyu, K., Wang, N., Gu, L., Sun, Y., et al., 2018. Transcriptomic analysis reveals the pathways associated with resisting and degrading microcystin in *Ochromonas*. *Environmental Science & Technology* 52, 11102-11113.

Zhao, B., Su, Y., 2014. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 31, 121-132.

Zheng, S., He, M., Sui, Y., Gebreluel, T., Zou, S., et al., 2017. Kelp waste extracts combined with acetate enhances the biofuel characteristics of *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology* 225, 142-150.

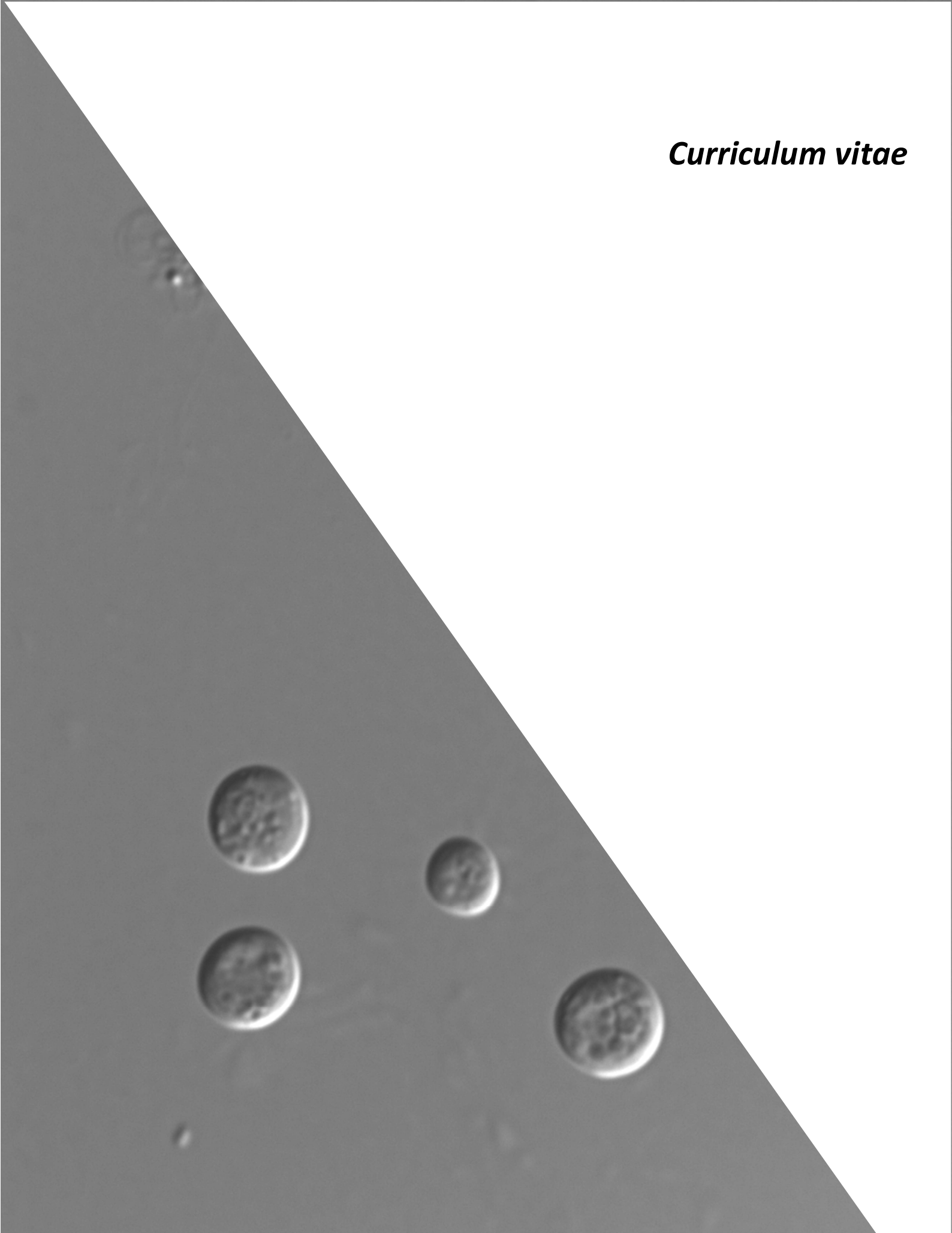
Zhou, X., He, L., Wu, C., Zhang, Y., Wu, X., et al., 2017. Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Molecular Nutrition & Food Research* 61, 1700262.

Zhou, X., Jin, W., Han, S.-f., Li, X., Gao, S.-H., et al., 2019. The mutation of *Scenedesmus obliquus* grown in municipal wastewater by laser combined with ultraviolet. *Korean Journal of Chemical Engineering* 36, 880-885.

Zhu, H., Ai, H., Cao, L., Sui, R., Ye, H., et al., 2018. Transcriptome analysis providing novel insights for Cd-resistant tall fescue responses to Cd stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 160, 349-356.

Zhu, Q.L., Guo, S.N., Wen, F., Zhang, X.L., Wang, C.C., et al., 2019. Transcriptional and physiological responses of *Dunaliella salina* to cadmium reveals time-dependent turnover of ribosome, photosystem, and ROS-scavenging pathways. *Aquatic Toxicology* 207, 153-162.

Curriculum vitae



Artículos científicos:

León-Vaz, A, Romero LC, Gotor C, León R, Vigarra J. Dataset for proteomic analysis of *Chlorella sorokiniana* under cadmium stress. **Data in Brief**. 33; 107554 (2020). Q2 Citescore (2019):1,5

León-Vaz, A, Romero LC, Gotor C, León R, Vigarra J. Effect of cadmium in the microalga *Chlorella sorokiniana*: a proteomic study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 207; 111301 (2021). Q1 IF(2019):4,872

León-Vaz, A, León R, Díaz-Santos E, Vigarra J, Raposo S. Using agro-industrial wastes for mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. **New Biotechnology**. 51; 31-38 (2019). Q1 IF(2019):4,674

Trabajos presentados en congresos:

León-Vaz A, Giráldez I, León R, Vigarra J. Response to abiotic stress produced by heavy metals in the microalga *Chlorella sorokiniana*. II Congreso Jóvenes Investigadores del Mar. Málaga. **2019**. Comunicación oral

Gómez-Villegas P, **León-Vaz A**, Vigarra, J, León R. Description of the eukaryotic microbial population in a solar saltern pond of the Odiel marshlands (SW Spain). 12th International Conference on Halophilic Microorganisms- Halophiles 2019. Cluj-Napoca. **2019**. Póster

Vila M, **León-Vaz A**, Vigarra, J, León R. New molecular tools for the expression of foreign genes in microalgal nucleus. Congreso Biotec 2019. Vigo. **2019**. Póster

León-Vaz A, Moreno-Garrido I, González-García C, García-Fuentes A, Cañavate JP, Varela J, Vigarra, J, León R, Giráldez I. Nutritional value of different microalgae isolated in the south of Spain and Portugal on the basis of their amino acidic profile. Congreso Biotec 2019. Vigo. **2019**. Comunicación oral

Romero-Cruz MC, **León-Vaz A**, Sánchez-Rodas, D, Morales E, Giráldez I, Vigarra J. Estrés abiótico en el crecimiento celular y la capacidad acumuladora de metales y metaloides de la microalga extremófila *Coccomyxa onubensis*. I Congreso Jóvenes Investigadores del Mar. Cádiz. **2018**. Póster

León-Vaz A, García-Lorenzo E, Moreno-Garrido I, Cañavate JP, Vigarra, J, León R, Morales E, Giráldez I. Perfil aminoacídico de microalgas localizadas en la costa suratlántica. I Congreso Jóvenes Investigadores del Mar Cádiz. **2018**. Póster

León-Vaz A, Morales E, León R, Giráldez I, Vigarra J. Tolerancia de la microalga *Chlorella sorokiniana* a metales pesados y potencialidad en procesos de fitorremediación. I Congreso Jóvenes Investigadores del Mar. Cádiz. **2018**. Póster

León-Vaz A, Moreno-Garrido I, Cañavate JP, Vigarra, J, León R, Morales E, Giráldez I. Determinación del perfil de aminoácidos de 25 microalgas y su potencialidad como alimento base en la cadena trófica. IX Jornadas de Acuicultura del Litoral Suratlántico. Cartaya (Huelva). **2018**. Póster

León-Vaz A, Raposo S, Vígara J, León R. Aprovechamiento de residuos agro-industriales para el crecimiento mixotrófico y la producción de lípidos de la microalga clorofita *Chlorella sorokinana*. Congreso Biotec2017. Murcia (Murcia). **2017** Comunicación oral.

León-Vaz A, Díaz-Santos E, Vila M, Vígara J, Vega JM, León R. Desarrollo de un método de criopreservación para garantizar la estabilidad de las cepas transgénicas de la microalga *Chlorella sorokinana* obtenidas mediante electrotransformación usando diferentes promotores heterólogos. Congreso Biotec2017. Murcia (Murcia). **2017** Póster.

León-Vaz A, Romero MC, Vígara J, León R. Desarrollo y optimización de un proceso para la criopreservación de microalgas clorofitas a -80°C. VIII Jornadas de Acuicultura del Litoral Suratlántico. Cartaya (Huelva). **2016** Póster.

León R, Vila M, Molina AM, **León-Vaz A**, Gómez P, Rengel R, Vígara J. Las microalgas: de cultivo auxiliar a fuente de compuestos de alto valor añadido. VIII Jornadas de Acuicultura del Litoral Suratlántico. Cartaya (Huelva). **2016** Comunicación oral.

León-Vaz A, Molina-Márquez AM, Vígara J, León R. Desarrollo de un procedimiento para la criopreservación de microalgas clorofitas a -80°C. XIII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Badajoz. **2016** Póster.

León-Vaz A, Rengel R, Romero MC, Vígara J. Caracterización de la enzima ascorbato peroxidasa en extractos crudos de *Dunaliella salina*. XXXVII Congreso SEBBM. Granada. **2014** Póster.

Estancias en Centros de Extranjeros:

Estancia de 3 meses en la Universidade do Algarve de Faro (Portugal), por medio de la Beca Erasmus+ KA-103, bajo la dirección de la proferosa Dra. Sara Raposo (2016).