

Tesis Doctoral

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS
RICA EN CARBOHIDRATOS ACOPLADA A LA
ELIMINACIÓN FOTOSINTÉTICA DE CO₂**

Rafael García Cubero



INSTITUTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y FOTOSÍNTESIS
Universidad de Sevilla
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS RICA EN CARBOHIDRATOS ACOPLADA A LA ELIMINACIÓN FOTOSINTÉTICA DE CO₂

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por el
licenciado RAFAEL GARCÍA CUBERO

Directora:

Dra. Mercedes García González
Profesora Titular de la Universidad de Sevilla



A mi familia

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	19
EL CARBONO Y SU CICLO BIOGEOQUÍMICO.....	21
EL EFECTO INVERNADERO.....	23
EL ANTROPOCENO: CALENTAMIENTO GLOBAL Y CAMBIO CLIMÁTICO.....	23
Efectos y consecuencias del cambio climático.....	26
Estrategias frente al cambio climático.....	27
MITIGACIÓN DEL CO ₂	28
Técnicas para la captura de CO ₂	28
Técnicas para el transporte de CO ₂	29
Secuestro y almacenamiento de carbono.....	30
Métodos abióticos.....	30
Métodos bióticos.....	31
VALORIZACIÓN DEL CO ₂	32
LAS MICROALGAS.....	33
Biotecnología de microalgas.....	34
Aplicaciones de las microalgas.....	35
Alimentación.....	36
Fertilización.....	37
Biorremediación.....	37
Generación de productos de interés.....	38
Pigmentos.....	38
Compuestos con actividad biológica.....	39
Biocombustibles.....	39
Nuevos desarrollos.....	41
El cultivo de microalgas.....	41
Factores que afectan al cultivo de microalgas.....	43
Fotobiorreactores.....	44
Procesos para cosechado y secado de la biomasa.....	48
OBJETIVOS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
Material biológico.....	57
Medios de cultivo.....	58

Cultivo estanco en cámara climatizada.....	58
Cultivo continuo en fotoquimioestado.....	59
Cultivo a la intemperie	61
<i>Estanque abierto</i>	61
<i>Reactor plano vertical (RPV)</i>	62
Métodos analíticos	63
<i>Determinación de la concentración de biomasa</i>	63
Determinación de biomasa por peso seco	63
Determinación de biomasa por carbono orgánico total (TOC)	63
Determinación de la biomasa por turbidez del cultivo	64
<i>Determinación del carbono orgánico total (TOC)</i>	64
<i>Determinación del calor de combustión</i>	65
<i>Determinación de viscosidad</i>	65
<i>Liofilización de la biomasa</i>	65
<i>Determinación de componentes celulares</i>	65
Obtención de extractos para la determinación de proteínas y carbohidratos	65
Determinación de proteínas	66
Determinación de carbohidratos.....	66
Determinación de almidón	67
Extracción y determinación de lípidos.....	67
<i>Determinación de la composición elemental</i>	68
Medidas de irradiancia.....	68
Medidas de demanda de CO ₂	69
Cálculos	69
<i>Velocidad específica de crecimiento</i>	69
<i>Productividad en cultivo continuo</i>	69
<i>Tasa de fijación de CO₂</i>	70
<i>Productividad de cultivo semicontinuo</i>	70
<i>Eficiencia fotosintética</i>	70
RESULTADOS.....	71
VERIFICACIÓN EN CULTIVO ESTANCO DEL POTENCIAL DE LAS ESPECIES PRESELECCIONADAS.....	73

VERIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS ESPECIES PRESELECCIONADAS EN CULTIVO CONTINUO.....	75
SELECCIÓN DE ESTIRPE.....	77
EL CASO DE <i>Scenedesmus vacuolatus</i>	78
Efecto del pH	79
Efecto de la temperatura.....	80
Efecto de la velocidad de dilución	81
Análisis del efecto conjunto de temperatura e irradiancia.....	82
Modelo de crecimiento y de fijación de CO ₂	84
Definición de un modelo de crecimiento en función de la velocidad de dilución e irradiancia.....	84
Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia de la temperatura.....	87
Simulación del comportamiento de <i>S.vacuolatus</i> en cultivo continuo.....	89
Simulación del comportamiento de <i>S.vacuolatus</i> en cultivo continuo (Productividad y Tasa de Fijación de CO ₂).....	90
Efecto de las mezclas gaseosas de origen industrial sobre la viabilidad y eficiencia de los cultivos.....	91
CULTIVO DE <i>Scenedesmus vacuolatus</i> AL EXTERIOR.....	95
Cultivo en estanque abierto	95
Cultivo en reactor plano vertical (RPV)	96
Contaminaciones presentes en los cultivos al exterior de <i>S.vacuolatus</i>	97
EL CASO DE <i>Chlorella vulgaris</i>	99
Efecto del pH	99
Efecto de la temperatura.....	101
Efecto de la velocidad de dilución	103
Efecto conjunto de temperatura e irradiancia.....	105
Efecto de la disponibilidad de NO ₃ ⁻ sobre el cultivo continuo de <i>Chlorella vulgaris</i>	109
Evolución de la acumulación de almidón a lo largo del periodo luminoso ...	111
Maximización de la productividad de almidón y evolución diaria de su nivel celular.....	112
Modelo de crecimiento y fijación de CO ₂ de <i>Chlorella vulgaris</i> en cultivo continuo.....	113

Definición de un modelo de crecimiento en función de la irradiancia promedio	114
Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia de la temperatura.....	115
Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia de la disponibilidad de nitrato.....	116
Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia del pH.....	117
Simulación del comportamiento de <i>C.vulgaris</i> en cultivo continuo	118
Modelo para la acumulación de almidón por <i>C.vulgaris</i> en cultivo continuo ..	119
Simulación del comportamiento de los cultivos de <i>C.vulgaris</i> en relación a la acumulación de almidón	121
Efecto del suministro de CO ₂ proveniente de diferentes fuentes sobre la viabilidad y eficiencia de cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i>	122
Efecto del suministro en continuo de aire suplementado con CO ₂	122
Efecto del suministro de mezclas de aire y gas de combustión	123
Eficiencia en el aprovechamiento de CO ₂	126
CULTIVO DE <i>Chlorella vulgaris</i> AL EXTERIOR.....	127
Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> en estanque abierto	127
Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> en reactor plano vertical (RPV)	129
DISCUSIÓN	131
Aproximación en cultivo estanco	133
Aproximación en cultivo continuo	135
Optimización de condiciones para crecimiento y eliminación de CO ₂ por <i>Scenedesmus vacuolatus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en cultivo continuo	137
Cultivos al exterior de <i>Scenedesmus vacuolatus</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	145
CONCLUSIONES	151
ÍNDICE DE FIGURAS	157
ÍNDICE DE TABLAS	163
ÍNDICE DE ECUACIONES	165
REFERENCIAS.....	167

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera dar las gracias a INABENSA S.A., al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Universidad de Sevilla por apoyar y financiar este proyecto dentro del marco CENITSOSTCO₂: Usos sostenibles del CO₂, permitiéndome realizar esta Tesis Doctoral.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a Miguel García Guerrero y Mercedes García González por la oportunidad que ambos me han dado, la confianza depositada en mí, su tiempo, su visión científica y todo lo que me han enseñado, tanto dentro como fuera del ámbito laboral. Siempre os estaré agradecido por todo.

Parte importante de este trabajo, no se hubiese realizado sin la ayuda, la paciencia, el tesón y las ganas de Pepe Moreno. Gracias Pepe, porque sé que he tenido la suerte de conocer a una gran persona.

A mis compañeros de laboratorio por haberme soportado durante estos cinco años. En especial a Rebeca, por darme tan buenos consejos cuando los necesitaba. A Juan Carlos, por siempre, siempre ayudarme para lo que fuese y aportar tanto. Sin ti, Juanca, hubiese sido todo un poco más tedioso y difícil. A Marta, Pitiña, por haber estado siempre ahí, pá lo bueno y pá lo malo. Gracias amiga. A Esperanza, Ana y Cristina. También a ti, Elena, por tanto, durante tantos años y por tu llamada que me cambiaría la vida (“Hay una oferta en el IBVF”).

A la gente del Laboratorio 2-3... Sin ustedes habría sido bastante complicado todo... Sabéis que me habéis ayudado en momentos difíciles, y eso, lo llevaré siempre conmigo. Por tantas cosas... Gracias Miguel, Luis (habéis ayudado más de lo que pensáis), María José, Maribel, Rocío, Anita y Lore... Y sobre todo a Ale y Sandra y a Joaquín e Isa... Habéis sabido estar siempre al pie del cañón, apoyarme, escucharme y animarme... Gracias amigos.

Al Dr. Gabriel Acién, por haber tenido la suficiente paciencia de enseñarme a modelar, y ser tan comprensivo ante las mil dudas con las que le he bombardeado. A todas esas personas del IBVF y CicCartuja que de alguna manera u otra me han echado un cable. En especial a Tere (L13) por tantísima paciencia y comprensión, y tener siempre tiempo para mí y para mi almidón. A José Enrique del servicio de cultivos, Alicia de microscopía, Bienvenido y Rafael del almacén, Juan Antonio, Rafael y Manolo de mantenimiento, y a toda la gente de seguridad, Luis, Ana, Javi y Eduardo.

Gracias a aquellos que de alguna manera u otra me han aguantado y apoyado, y sé que están muy orgullosos de mí. A Leslie, Jessica, Lily, Livio, Alfredo, Flora, Alfonso.

Gracias a Kurt, Krist y Dave... Muchas horas sonando y muchas horas acompañándome en el laboratorio. También va por ti, Juan. Por tantos años y tantas cosas vividas. Eres como un hermano...Nunca has fallado.

A mi familia, sin ustedes, jamás hubiese llegado hasta aquí. A mi abuelo Luis, sé que estarás orgulloso de tu nieto. A ti, Astérix, que aunque no hables, lo dices todo con tu mirada. Desde que empecé la Universidad, jamás has faltado a una sola noche de estudio en mi regazo. Gracias por acompañarme tantas horas. A Paco, por ser como un padre, y siempre, siempre, dar sin pedir nada a cambio. A ti, Javi. Eres el mejor hermano y amigo que se podría tener. Gracias por confiar siempre en mí, desde que tengo uso de razón y quererme tanto. Y a ti, Mamá... Por todo, por luchar y sacrificarte tanto... haciendo que esto sea posible. Os quiero.

Y por último te dejo a ti... Ana... Mi Principessa... por hacerme sentir tanto, apoyarme, ayudarme y comprenderme... por iluminar todo... Te quiero.

“Sé valiente y la fuerza acudirá en tu ayuda”

J.W. von Goethe (1749-1832)

Parte de la investigación desarrollada durante este trabajo de tesis ha sido presentada como publicaciones y comunicaciones en los siguientes congresos:

- **Publicaciones**

- "Production of carbohydrate-rich microalgal biomass coupled to photosynthetic CO₂ abatement" R.García-Cubero, E. Del Río, C. Hoys, M. García-González (2012).FEBS Special Issue, J 279: 554-554

- **Comunicaciones a congresos:**

- 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress. Seville, Spain.Poster 27-55: "Production of carbohydrate-rich microalgal biomass coupled to photosynthetic CO₂ abatement" R. García-Cubero, E. Del Rio, C. Hoys, M. García-González. September 2012
- 4th Congress of the International Society for Applied Phycology. Halifax, Canada. International Society for Applied Phycology. Póster P047: "Screening of microalgae for CO₂ abatement." M. García-González, R. García-Cubero, A. Armendáriz, J. Moreno, M.G. Guerrero. June 2011

INTRODUCCIÓN

EL CARBONO Y SU CICLO BIOGEOQUÍMICO

Las moléculas componentes de los seres vivos están basadas en el carbono, elemento sólido no metálico formado en el núcleo de las estrellas hace millones de años (Castelvecchi, 2009). A pesar de formar parte de una inmensa variedad de compuestos, el carbono es un elemento más bien escaso en la corteza terrestre, estimándose que representa tan solo el 0,1% de la misma, encontrándose en su mayor parte en forma de carbonato cálcico (creta, caliza y mármol) y magnésico (dolomitas) (Losada et al., 1998).

El C puede formar parte de diferentes reservorios o componentes, entre los que fluye, constituyendo el llamado ciclo del C (Figura 1), de carácter complejo y con gran importancia dentro del sistema Tierra. Entre los reservorios existen dos tipos de movimientos, uno de carácter lento, con un tiempo de residencia alto (ciclo geoquímico) y otro con un tiempo de residencia menor (ciclo biológico) (<http://earthobservatory.nasa.gov/>). La permanencia en cada reservorio oscila de días a milenios.

El ciclo geoquímico tiene tres componentes principales: litosfera, hidrosfera y atmósfera. Se estima que más de $7,5 \cdot 10^7$ Pg de C ($1 \text{Pg} = 10^{15} \text{g}$) se encuentran dentro de alguno de estos reservorios, mientras que en el ciclo biológico (biosfera) se encuentran implicados sólo unos $2\text{-}3 \cdot 10^3$ Pg de C (Dhillon y Wuehlisch, 2013).

En la atmósfera se encuentra aproximadamente 750-800Pg de C. Casi la totalidad corresponde a CO_2 , existiendo pequeñas trazas de CO , CH_4 y otros compuestos hidrocarbonados distintos del metano (Siegenthaler et al., 2005). La cantidad total de C en los océanos es de aproximadamente $3,8 \cdot 10^4$ Pg, esto es, unas 50 veces mayor que en la atmósfera (Houghton, 2007). El océano puede actuar así mismo como sumidero de C. En la superficie oceánica, el CO_2 atmosférico se disuelve en agua acidificándola (Sarmiento et al., 2010). Por otro lado, en la atmósfera, el CO_2 reacciona con el vapor de H_2O formando un ácido débil, el ácido carbónico, que vehiculizado por la lluvia, disuelve las rocas, liberando Ca, Mg, K y Na. Los ríos y torrentes se encargan de transportar estos iones a los océanos. El Ca^{2+} reacciona con el bicarbonato formando sales, CaCO_3 , esenciales para organismos como corales, cocolitoforos, o para la formación de conchas y caparazones (Castanier et al., 1999). Una vez muerto el organismo, las estructuras carbonatadas pasan a formar parte del sedimento marino, cimentándose y transformándose en rocas, tipo arcillas. Aproximadamente el 80% de las rocas que contienen carbono se forman así, mientras que en el 20% restante el C se embebe en capas de barro y limo, formando esquistos (Craig et al., 2013). Las rocas carbonatadas sedimentarias constituyen el mayor reservorio de C, estimándose que pueden existir más de $6 \cdot 10^7$ Pg de C así almacenados (Dhillon y Wuehlisch, 2013). En algunos casos especiales, bajo las condiciones idóneas de presión y temperatura, el carbono orgánico puede convertirse en carbón, petróleo o gas natural (Gao, 2013). Se

estima que la cantidad de C contenido en combustibles fósiles oscila entre $4 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ Pg (Falkowski et al., 2000). Además, a esta cantidad hay que sumarle la del C sedimentario contenido en querógenos (pizarras bituminosas), unos $1,5 \cdot 10^7$ Pg (Dhillon y Wuehlisch, 2013). El C vuelve a la atmósfera a través de las erupciones volcánicas que arrojan a la atmósfera entre 0,13 y 0,38Pg de CO_2 al año, una centésima parte de las emitidas por las actividades antropogénicas (<http://science.energy.gov/ber/>).

El C entra en el ciclo biológico a través de la fotosíntesis realizada por organismos fotoautótrofos. La mayor parte del C se encuentra en los ecosistemas terrestres, formando parte de materia orgánica no viva como restos leñosos, turba o detritos (unos 1580Pg de C). Los vegetales contienen 610Pg de C, mientras que el C que forma parte de heterótrofos puede considerarse insignificante. El C es devuelto a la atmósfera mediante la respiración. La biota marina, aunque contiene poca cantidad de carbono (3Pg de C), juega un papel fundamental en el ciclo, ya que actúa como bomba biológica recirculando el CO_2 de la superficie oceánica (Dhillon y Wuehlisch, 2013).

Este equilibrio entre hidrosfera, litosfera, biosfera y atmósfera se ha mantenido durante millones de años, haciendo que no todo el C se encuentre almacenado exclusivamente en la atmósfera (como el caso de Venus) o en la litosfera (<http://earthobservatory.nasa.gov>).

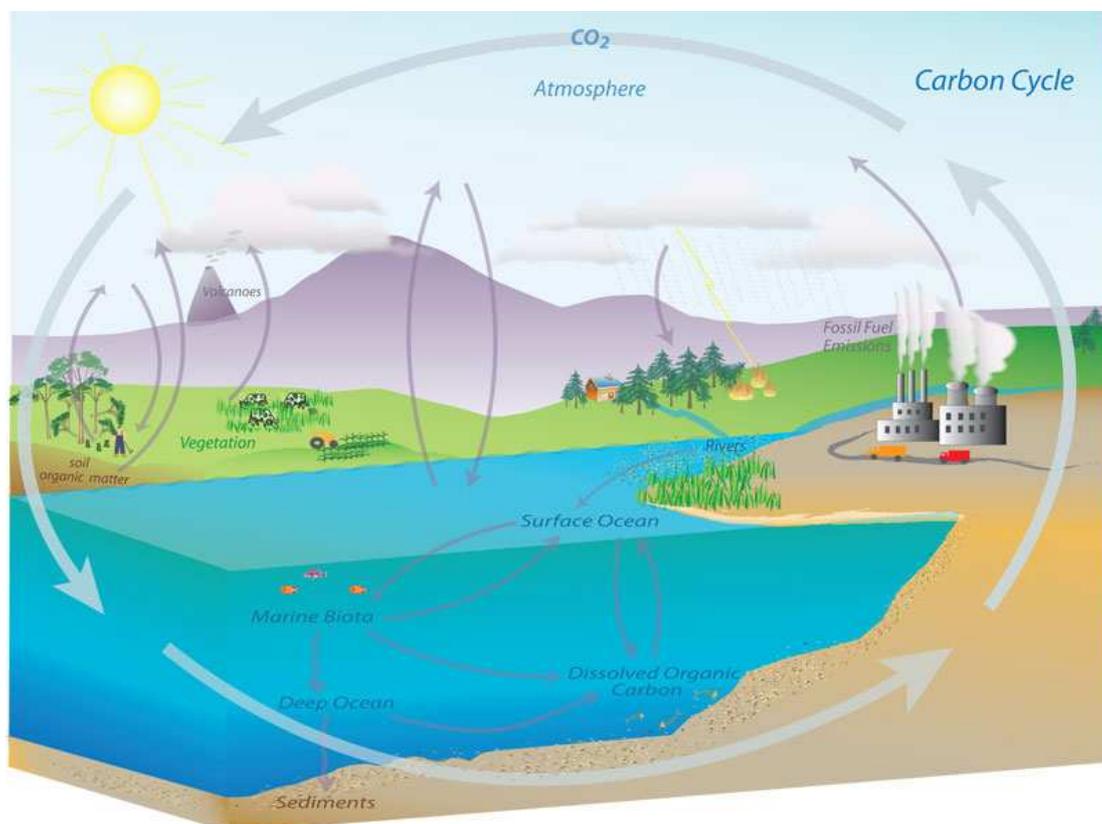


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del C (<http://www.esrl.noaa.gov/>)

EL EFECTO INVERNADERO

A las capas altas de la atmósfera terrestre llegan constantemente unos 1350 kW m^{-2} de radiaciones energéticas provenientes del Sol. Gran parte de esta energía no alcanza la superficie terrestre, sino que es devuelta al espacio exterior o absorbida selectivamente por gases como el ozono (UV), vapor de agua o CO_2 (infrarrojo) en su tránsito vertical por la atmósfera. De la energía que alcanza la superficie, el 42% se consume en la evaporación del agua, el 9% en el calentamiento de la atmósfera y el resto, un 49%, se pierde por irradiación calórica (De la Rosa et al., 1990).

Parte de la irradiancia que llega a la superficie de la Tierra y que se reemite durante la noche, queda retenida por el vapor de H_2O y el CO_2 de la atmósfera, evitándose así un enfriamiento rápido y excesivo de la superficie, permitiendo mantener la temperatura media de la tierra a 15°C en vez de a -18°C , como ocurriría si no se diese este fenómeno (Dow y Dowing, 2006), generando las condiciones que han permitido la vida en la Tierra (Figura 2).

Sólo 1 kW m^{-2} de toda la radiación solar incide sobre la superficie terrestre.

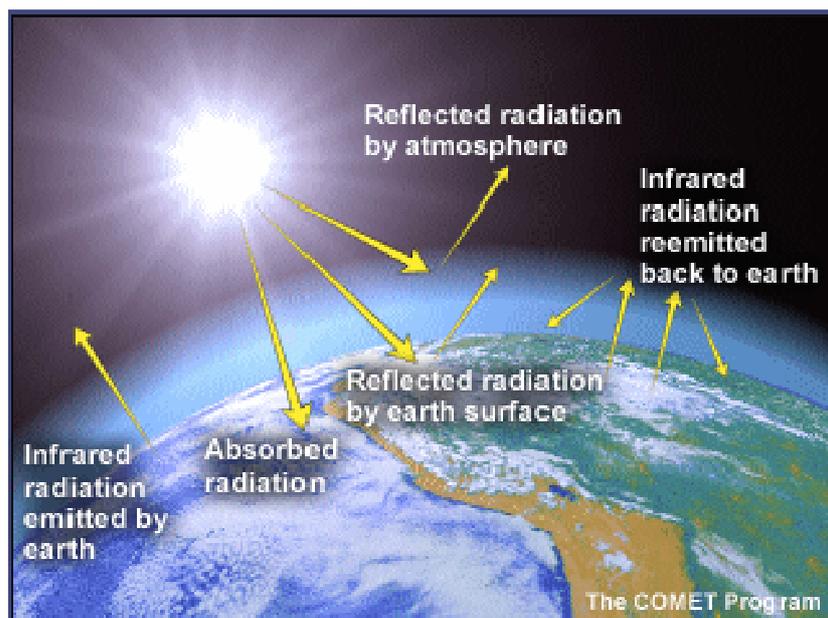


Figura 2. El efecto invernadero. Parte de la radiación que llega a la superficie terrestre es reflejada al espacio exterior por las capas altas de la atmósfera, el albedo de nubes y glaciares. Parte de la energía solar que llega a la superficie de la Tierra y se emite en forma de calor, se retiene por la atmósfera debido a los GEI, devolviéndose de nuevo a la superficie terrestre (www.ucar.edu).

EL ANTROPOCENO: CALENTAMIENTO GLOBAL Y CAMBIO CLIMÁTICO

Algunos autores se han referido como “antropoceno” a la reciente época geológica en la que el hombre tiene una acción directa sobre los ciclos biogeoquímicos del planeta (Ellis et al., 2013). Desde que, hace aproximadamente 250 años, se iniciara la revolución industrial, la actividad humana ha provocado una ingente liberación de

gases de efecto invernadero (GEI), que ha contribuido al incremento en la concentración de estos gases en la atmósfera (Dow y Dowing, 2006) (Figura 3), siendo para el caso del CO_2 de 280 ppm a 380 ppm, e incrementándose la temperatura global del planeta en $0,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (IPCC, 2007) durante el último siglo. Algunos autores han propuesto valores superiores para este incremento térmico, de $0,74^\circ\text{C}$ (Pandey et al., 2011) o $0,9^\circ\text{C}$ (Nema et al., 2012). En concreto la quema de combustibles fósiles para transporte, la producción de energía y la actividad industrial, el uso de clorofluorocarbonos, hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos (en general, CFCs) y fluoruros de azufre (SF_x), el metano proveniente de ganadería intensiva, los cambios de uso de la tierra y la deforestación, así como la aviación son algunas de las actividades humanas que tienen relación directa con la emisión de GEI (Nema et al., 2012). Los principales GEI antropogénicos son: CO_2 , CO , CH_4 , NO_x , SO_x , CFCs, SF_x y el O_3 troposférico (IPCC, 2007). El tiempo de residencia de cada uno de ellos depende de sus características químicas. Así, el CO_2 tiene un tiempo de residencia de entre 5 y 200 años, el NO_2 de hasta 114 años, CH_4 de 12 años, y CFCs hasta 85 años (Dow y Dowing, 2006).

Como se observa en la Figura 3, el CO_2 es el GEI que más contribuye al calentamiento de la atmósfera y el que más ha incrementado su proporción. La tasa de incremento se estima en $1,7 \text{ ppm año}^{-1}$. De ahí el interés y necesidad de desarrollar estrategias para su mitigación (Lal, 2008).

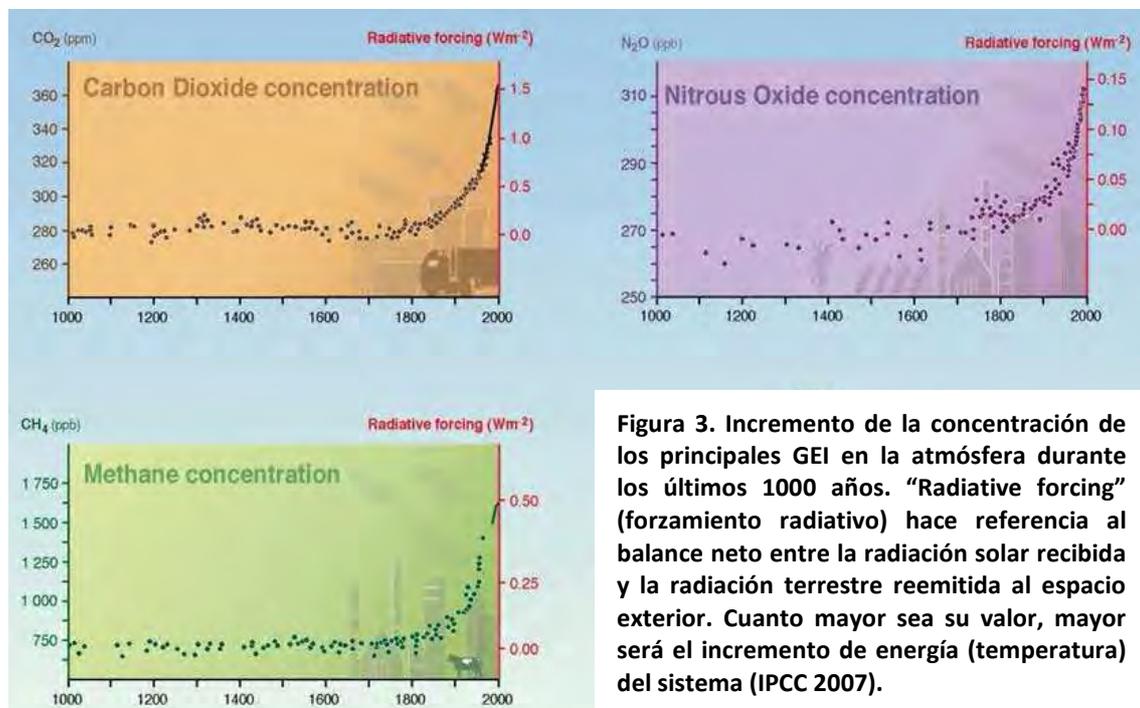


Figura 3. Incremento de la concentración de los principales GEI en la atmósfera durante los últimos 1000 años. “Radiative forcing” (forzamiento radiativo) hace referencia al balance neto entre la radiación solar recibida y la radiación terrestre reemitida al espacio exterior. Cuanto mayor sea su valor, mayor será el incremento de energía (temperatura) del sistema (IPCC 2007).

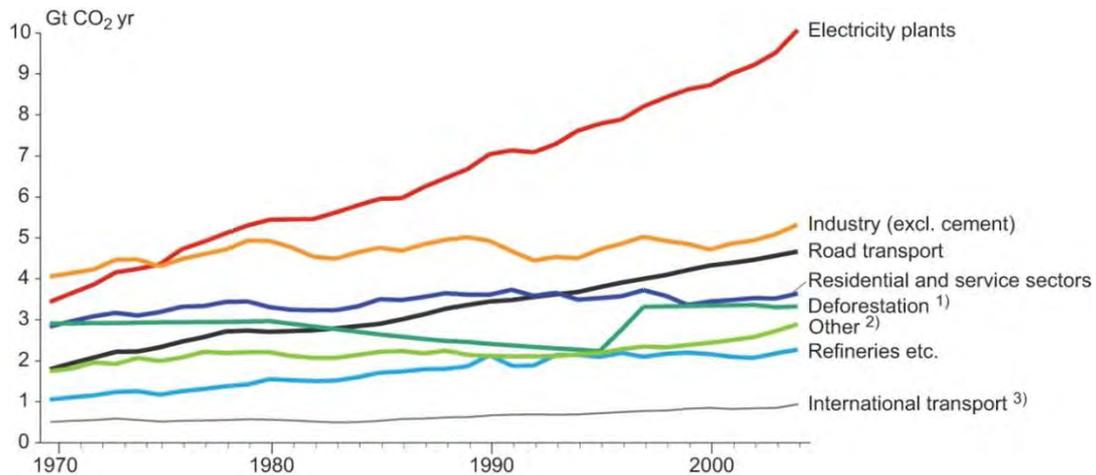


Figura 4. Evolución de las emisiones de CO₂ (Gt año⁻¹) según sectores en los últimos 35 años. ¹⁾ La deforestación incluye la quema de madera. ²⁾ Se incluye la industria cementera, el uso no energético de combustibles y la producción de lubricantes y aceites industriales. ³⁾ Incluida aviación y transporte marítimo (IPCC 2007)

Durante los últimos 35 años, las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera se han visto incrementadas debido a diferentes actividades humanas (Figura 4). Entre éstas, las más contaminantes proceden de la generación de energía, industrias (especialmente la cementera) y el transporte (DOE, 1999; Barker et al., 2009; Volkart et al., 2013). En el año 2011 se alcanzó el record de emisiones, con 36,1 Gt de CO₂ año⁻¹, siendo China, USA, UE e India los principales emisores (<http://edgar.jrc.ec.europa.eu/>, 2013; www.iea.org, 2013).

El Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC) (IPCC, 2007) pronostica que, con el actual ritmo de emisiones de GEI, el escenario global se verá seriamente afectado durante el siglo XXI. Los pronósticos se engloban en diferentes escenarios, denominados SRES (Special Report Emissions Scenarios) dependientes del ritmo de emisiones antropogénicas, que también recogen los nuevos desarrollos tecnológicos y de fuentes de energía no emisoras de GEI, crecimiento demográfico de la población, otros aspectos socio-económicos asociados al desarrollo humano y políticas climáticas. Cada SRES se agrupa en cuatro familias: A1, A2, B1 y B2 (Figura 5).

- A1 asume un crecimiento económico rápido, con un pico de crecimiento demográfico a mitad de siglo XXI, acompañado con un desarrollo de nuevas tecnologías más eficientes. A su vez, esta familia se subdivide en:
 - Un escenario con un uso intensivo de combustibles fósiles A1FI
 - Uso de fuentes energéticas no fósiles A1T
 - Un equilibrio entre los escenarios anteriores, A1B
- B1 describe un mundo convergente con una población global similar a A1 pero con unas estructuras económicas basadas en el sector servicios y la información.

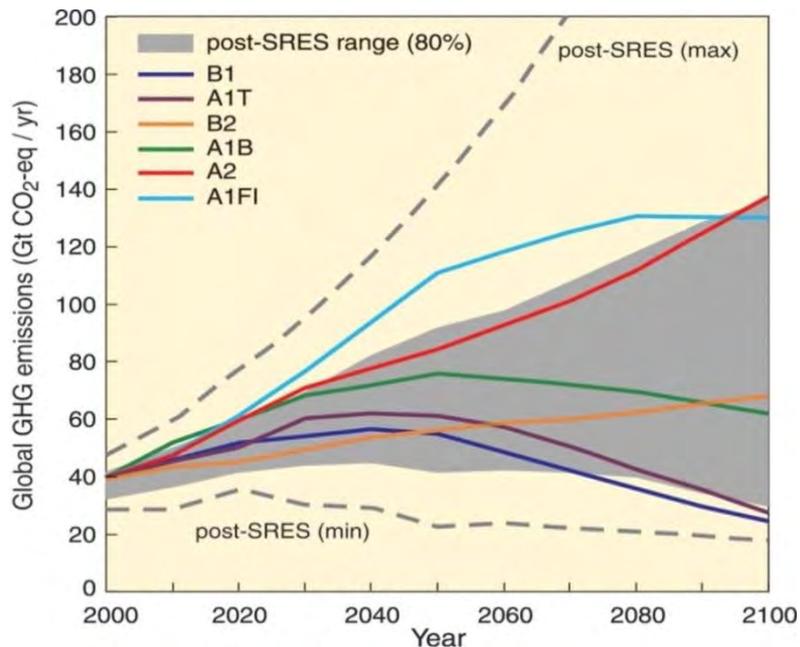


Figura 5. Predicción de emisiones globales de GEI (CO₂, CH₄, NO₂, compuestos fluorados) según los diferentes escenarios futuros planteados por el IPCC así como posteriores estudios (post-SRES) (IPCC 2007).

- B2 representa un mundo con un crecimiento demográfico y económico intermedio, enfatizando soluciones locales hacia una sostenibilidad económica, social y medioambiental.
- A2 describe un escenario con un mundo heterogéneo, con un crecimiento demográfico muy alto, bajo desarrollo económico y tecnológico.

Efectos y consecuencias del cambio climático

Aunque aún existe cierto escepticismo en la sociedad acerca del cambio climático y sus consecuencias, sí hay un consenso casi generalizado dentro de la comunidad científica (Oreskes, 2004). Para evaluar el impacto del CO₂ generado por la actividad humana se ha introducido el término “huella de carbono”. Este concepto define la superficie terrestre necesaria para asimilar todo el CO₂ de origen antropogénico producido durante una generación. Se puede considerar por tanto como indicador del potencial de cambio climático que tienen las actividades humanas. Esta definición ha sido ampliada en los últimos años a todos los GEI (Pandey et al., 2011).

Independientemente del SRES al que se concurra, se prevé un aumento de la temperatura media global desde 0,3°C (B1) hasta 6,4°C (A1FI) durante el siglo XXI (IPCC, 2007). Este incremento de la temperatura se asociará a un cambio drástico en el régimen climático. Se vaticina grandes impactos ecológicos, como el incremento del nivel del mar debido al deshielo de glaciares y zonas árticas y antárticas (Stroeve et al.,

2007; Hasan et al., 2013), que conllevaría la modificación de las líneas costeras, desaparición de islas y el desplazamiento forzado de comunidades humanas a zonas más altas (Barbi y da Costa Ferreira, 2013; Detraz y Windsor, 2013). Estos eventos migratorios acarrearían pérdidas económicas y sociales (Duarte, 2009). El ciclo del agua se vería afectado, cambiando el régimen de precipitaciones. Serían muy comunes episodios de sequías y lluvias torrenciales, así como una erosión drástica de grandes zonas del planeta (Shen et al., 2008; Bangash et al., 2013). Se producirían eventos extremos como huracanes y tornados. Debido a la modificación de los regímenes pluviométricos, la disponibilidad de agua potable se mermaría, afectando de manera importante a la agricultura y a la alimentación humana (Dono et al., 2013; Smith y Gregory, 2013). Así mismo, se prevén olas de calor (Dunne et al., 2013) y la aparición de nuevas enfermedades o el desplazamiento de enfermedades subtropicales a zonas templadas (Sorci et al., 2013). Los ciclos biogeoquímicos sufrirían alteraciones, especialmente los del N y el P (Erisman et al., 2013; Ozaki y Tajika, 2013; Voss et al., 2013). Por último el cambio climático acarrearía una acidificación de los océanos, implicando una pérdida de biodiversidad marina (Orr et al., 2005), y en ecosistemas terrestres (Ponce-Reyes et al., 2013).

Estrategias frente al cambio climático

Ante la alarma generada frente a la amenaza del cambio climático, la ONU, mediante el Programa de Convención para el Cambio Climático (<http://unfccc.int/2860.php>) ha venido desarrollando conferencias y cumbres con el objetivo de alcanzar acuerdos y medidas para paliar sus efectos. De las cumbres que desde finales del siglo XX se han desarrollado, cabe destacar la cumbre de Rio de Janeiro (1992), Kyoto (1997), Bali (2007), Copenhague (2009), Durban (2011) y Bonn (2013). El protocolo de Kyoto, ratificado por la gran mayoría de países desarrollados exceptuando USA y China, se comprometía a “potenciar la investigación, promover, desarrollar y aumentar el uso de formas nuevas y renovables de energía, tecnologías de secuestro de CO₂ y tecnologías ecológicamente racionales”. Sin embargo, un acuerdo tan ambicioso no se ha visto cumplido por los países firmantes (Anthoff y Hahn, 2010; Wang y Chen, 2013). En las cumbres posteriores se han intentado alcanzar acuerdos de mínimos, poniendo en boga el concepto de Gobernanza del Cambio Climático (Dirix et al., 2013) y creando mercados de emisiones de carbono (Bührs, 2010; Koop y Tole, 2013) como mecanismos de control de las mismas. Se trata de un tema complejo, que abarca medidas políticas, económicas, sociales y medioambientales, encaminadas todas a una sociedad basada en un desarrollo sostenible (Kuhlman y Farrington, 2010; Dylan, 2012). Algunas organizaciones abogan por un control de la población como medida de mitigación del calentamiento global (Nema et al., 2012).

En el protocolo de Kyoto se estableció el compromiso de reducir la emisión global de GEI al 5% con respecto al nivel de emisiones de 1990 entre los años 2008 y 2012 (Singh y Ahluwalia, 2012), aunque recientemente, en la cumbre de Doha (2012), se ha extendido este periodo hasta el 2020 (Pérez de las Heras, 2013). Sin embargo, las emisiones han continuado aumentando, llegando a valores históricos de 400ppm de CO₂ en 2013 (<http://www.nature.com/news/global-carbon-dioxide-levels-near-worrisome-milestone-1.12900>). Ante esta perspectiva, se hace necesario mitigar las emisiones de GEI, mediante las tres estrategias planteadas inicialmente (Lal, 2008):

- La disminución del consumo energético global
- El desarrollo de combustibles sin o con bajas emisiones de C
- La descarbonización de gases de escape y secuestro de CO₂ desde las fuentes emisoras o de la atmósfera

MITIGACIÓN DEL CO₂

El secuestro de CO₂ viene determinado por la implantación de procesos para la captura, transporte y almacenaje del mismo, CCS (del inglés “Carbon Capture & Storage”)

Técnicas para la captura de CO₂

Previo al almacenaje y virtual aprovechamiento del CO₂ (valorización), debe existir un proceso que capture las emisiones desde la fuente directa de producción (centrales térmicas, cementeras...). Se trata tanto de tecnologías físico-químicas como biológicas encaminadas a la captación y concentración de CO₂ generado por una fuente de combustible primario (carbón, petróleo, gas natural) o por biomasa. Cabe destacar que este proceso de captura no es viable en fuentes difusas de emisión, como puede ser el tráfico rodado o aéreo. Las tecnologías biológicas se explicarán en apartados sucesivos, tratándose en este apartado las tecnologías físico-químicas. Las técnicas se dividen en tres grandes grupos (Figura 6) (Volkart et al., 2013):

- **Precombustión:** El combustible primario se transforma primero en gas mediante su calentamiento con vapor y aire u oxígeno produciendo una mezcla que contiene, principalmente, monóxido de carbono e hidrógeno. El monóxido de carbono reacciona con el vapor, en un segundo reactor, produciendo CO₂ e hidrógeno adicional que pueden separarse, mediante técnicas de absorción física o química, en un flujo de CO₂ y un flujo de hidrógeno, que puede utilizarse para generar energía eléctrica y/o calor.
- **Postcombustión:** Se separa el CO₂ de los demás gases tras la quema del combustible primario en presencia de aire, mediante el empleo de sorbentes sólidos, separación por membranas, criogenia, líquidos iónicos o absorción química procurando una solución acuosa de aminas primarias, secundarias o terciarias.

- **Oxicombustión:** Se realiza la combustión de los combustibles fósiles en una atmósfera rica en oxígeno. De esta manera, la corriente de salida es prácticamente pura en CO_2 , sin la aparición de compuestos nitrogenados al no usar una corriente de aire en la combustión. No obstante, la separación previa del oxígeno requiere un gran coste energético.

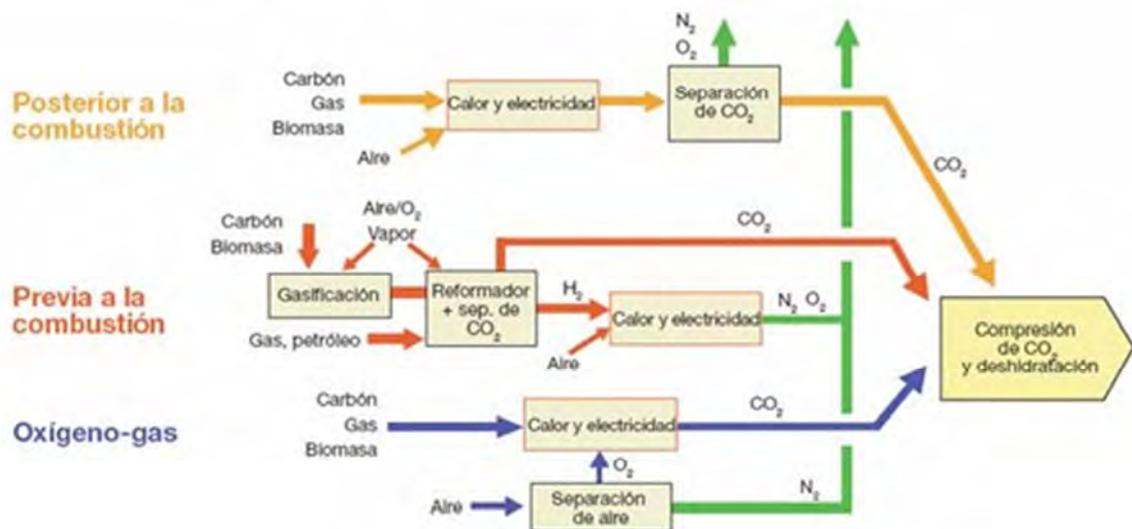


Figura 6. Sistemas de captura de CO_2 (Fuente: IPCC Special Report 2005)

Algunos proyectos y plantas para la captura de CO_2 ya están en pleno funcionamiento como Elcogas (Vega, 2010), Vattenfall, FutureGen, ZeroGen, E-oN (Stigson et al., 2012).

Técnicas para el transporte de CO_2

El CO_2 capturado debe ser transportado al lugar donde se realice su almacenaje o reutilización. Hasta la fecha, los sistemas ensayados son tres: camiones/vagones cisterna, buques petroleros y gaseoductos (Aursand et al., 2013). Los primeros, utilizados para el transporte de pequeñas cantidades de CO_2 , a una temperatura de -20°C y 20 atmósferas de presión, son económicamente poco viables. Los buques petroleros no requieren del desarrollo de nuevas tecnologías ya que el CO_2 licuado posee las mismas propiedades que los gases licuados de petróleo. Para el uso de gaseoductos se operaría de igual manera que con los oleoductos, comprimiendo el CO_2 a altas presiones (78atm) hasta alcanzar el estado supercrítico (Vega, 2010; Knoope et al., 2013). Los CO_2 -ductos pueden discurrir a través de la superficie terrestre o por fondos oceánicos. Su uso se justificaría para distancias menores de 1500km; para distancias mayores, sería más rentable el uso de buques (IPCC, 2005).

Secuestro y almacenamiento de carbono

El objetivo de los procesos de secuestro y almacenamiento de carbono es reequilibrar el balance global de las emisiones, desarrollando una estrategia económica basada en emisiones neutras de carbono. Este tipo de estrategias deberían secuestrar la mayor parte de las emisiones antropogénicas de una manera segura, estable y medioambientalmente aceptables. Existen diversas opciones tecnológicas para el secuestro de carbono. La elección de una o una combinación de algunas de ellas es un factor importante para proponer políticas energéticas para un futuro crecimiento económico. Estas tecnologías pueden agruparse en dos amplias categorías: métodos abióticos y bióticos (Lal, 2008).

Métodos abióticos

El secuestro abiótico se basa en reacciones físico-químicas y en técnicas geológicas sin la intervención de organismos vivos. Ha recibido gran atención debido a que las estructuras geológicas y oceánicas poseen mayor capacidad de secuestro que cualquier método biótico utilizado. Sin embargo, los aspectos técnicos y económicos de este tipo de operación requieren una investigación más profunda (Houghton, 2007). Aún son tecnologías especulativas, sin estudios detallados de sus consecuencias medioambientales (Singh y Ahluwalia, 2012).

- **Inyección oceánica:** El CO₂ licuado se inyectaría a gran profundidad para minimizar posibles fugas. La inyección a más de 1000m de profundidad se realizaría usando buques o CO₂-ductos, o bien a través de plataformas marítimas que lo harían a más de 3000m. Se formaría un lago de dióxido de carbono más denso que el resto de la columna de agua, inmisible, y por tanto más estable. Se estima que la capacidad de este depósito sobrepasaría las reservas actuales de combustibles fósiles. No obstante, aún no es seguro su viabilidad económica ni medioambiental ya que aún no existen estudios que demuestren su estabilidad a largo plazo, ni cómo afectaría a la acidez del agua, a la biota marina y al ciclo global de C (Israelsson et al., 2010; Singh y Ahluwalia, 2012).
- **Inyección geológica:** Se considera como una opción con gran potencial. Los estratos geológicos susceptibles a almacenar CO₂ licuado serían los acuíferos salinos, capas de carbón inexplorados y yacimientos de petróleo y gas natural agotados. Independientemente del tipo de estrato usado, la característica prioritaria debe ser la impermeabilidad y la estanqueidad del reservorio (Dhillon y Wuehlisch, 2013; Volkart et al., 2013). Ya existen casos prácticos de esta técnica en Noruega (campo de Sleipner) y USA/Canadá (Dakota del Norte/Weyburn) (Lal, 2008).
- **Carbonatación mineral:** Se consigue mediante la transformación química natural del CO₂ con óxidos metálicos, produciendo carbonatos estables como CaCO₃ o MgCO₃. Estas rocas carbonatadas son estables quedando el

CO₂ secuestrado permanentemente. Es una reacción lenta, con un alto consumo energético y por tanto, cara. Este proceso también puede darse de forma natural en los suelos, en determinadas condiciones físico-químicas, aunque a tasas muy bajas (Lal, 2008).

Métodos bióticos

El secuestro biótico corresponde a tecnologías basadas en la utilización de organismos y microorganismos fotosintéticos tanto terrestres como acuáticos para la mitigación de carbono atmosférico (Lal, 2008).

Se estima que los vegetales terrestres podrían asimilar hasta 1,1 Pg de C año⁻¹ mediante las siguientes prácticas (Lal, 2001):

- Gestión de los bosques: Las plantas leñosas forman estructuras resistentes como la lignina donde el C permanece almacenado durante un periodo largo de tiempo. Existen dos aproximaciones: a) protegiendo los ecosistemas boscosos que actualmente asimilan grandes cantidades de C, y/o b) gestionando bosques para incrementar su productividad. Se calcula que con reforestaciones futuras, los bosques podrían alcanzar tasas de fijación de hasta 5,4 Pg de C año⁻¹ hacia el 2050 (Vanhala et al., 2013). Se postula que la productividad primaria de los bosques alcanzaría su máximo con una concentración de CO₂ atmosférico de 800-1000ppm (Dhillon y Wuehlisch, 2013).
- Gestión y uso mejorado de las tierras de cultivo/ganadería. Actualmente la agricultura y la ganadería emiten entre 10-12% del total de GEI, principalmente en forma de metano (fermentación de la materia orgánica residual y ganadería) y N₂O debido al exceso de fertilizantes (Chowdhury y Dick, 2013; Dhillon y Wuehlisch, 2013). Por ello es necesario desarrollar nuevas técnicas agrícolas y ganaderas que reduzcan la dependencia actual de fertilizantes químicos y sintéticos, así como prácticas más sostenibles (Lal, 2013).
- Gestión de los recursos edafológicos. Muy relacionado con el apartado anterior. Consiste en incrementar la materia orgánica de los suelos, tanto agrícolas como humedales, bosques o zonas degradadas (Dinakaran y Rao, 2012). Con la humificación, aumenta la calidad de los suelos, disminuye la erosión y se fomenta la recirculación del carbono hacia su ciclo biológico (Chowdhury y Dick, 2013; Olson, 2013). Fertilizando el suelo mediante la inyección de CO₂ a 0,5-1m de profundidad, el incremento de carbono orgánico en el suelo aumentaría hasta tasas de 1000 kg de C ha⁻¹ año⁻¹ con tiempos de residencia de más de 70 años (Lal, 2008).

Respecto a los vegetales acuáticos, se estima que el 40% de las emisiones de CO₂ de origen antropogénico emitidas hasta ahora se han fijado en forma de materia orgánica en ecosistemas marinos por fitoplancton (Singh y Ahluwalia, 2012). Estos

microorganismos se caracterizan por poseer una tasa de renovación de biomasa muy breve (días). Parte de las partículas orgánicas se depositan en el fondo oceánico, quedando secuestradas. La distribución del fitoplancton y su productividad primaria está definida por la disponibilidad de luz y nutrientes (N, P e Fe principalmente) (Figura 7). Se ha propuesto la fertilización de los océanos con estos nutrientes además de CO₂. No obstante se desconoce las consecuencias que tendría la acidificación de los océanos debido al exceso de dióxido de carbono, y por tanto en el ciclo global del carbono, así como los efectos de una eutrofización de los ecosistemas marinos por exceso de P, N o Fe (Behrenfeld et al., 2006; Lal, 2008).

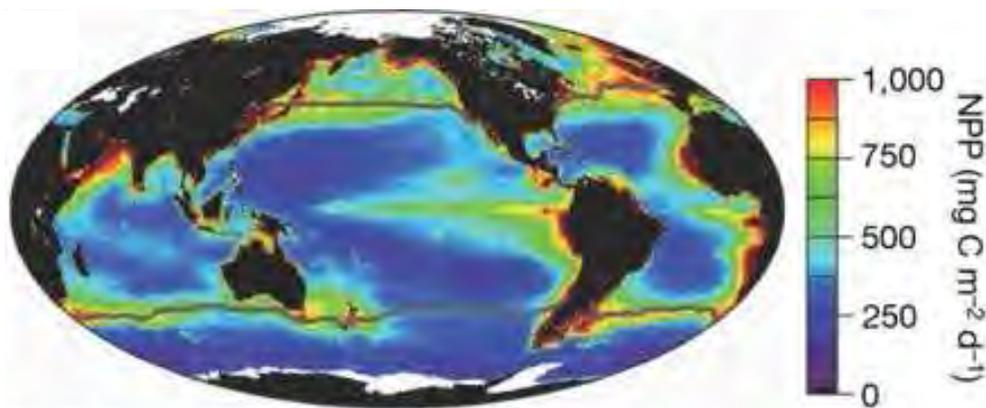


Figura 7. Distribución oceánica de la productividad primaria de fitoplancton (NPP) (Behrenfeld et al., 2006)

VALORIZACIÓN DEL CO₂

El dióxido de carbono puede encontrar un uso alternativo a la simple captura y almacenamiento, mediante una valorización del mismo. No obstante, esto conlleva describir el contexto medioambiental y económico que podría tener esta valorización (Vega, 2010). Los usos que puede tener el CO₂ se dividen en:

- **Procesos industriales** donde interviene de manera directa el dióxido de carbono, como por ejemplo, en la industria alimentaria (bebidas carbonatadas y alcohólicas, tratamiento de la leche, fabricación de quesos, envasado/desinsectación de alimentos, aturdimiento de animales, refrigeración y congelación). El CO₂ en estado supercrítico se puede usar como solvente para la extracción de compuestos naturales y pigmentos. También se usa en el sector textil, en la limpieza industrial y en la síntesis y modificación de materiales. Además, está generalizado el uso de CO₂ en el tratamiento de aguas residuales.
- **Extracción mejorada de petróleo y gas natural:** Esta técnica se inició en USA en la década de 1960. A los pozos petrolíferos explotados cuya presión es menor que la requerida para la extracción por bombeo se les aplica una inyección de CO₂ que permite recuperar trazas de petróleo que no eran accesibles. Estos

depósitos vacíos son idóneos para confinar el carbono, debido a su naturaleza estanca sin fallas ni discontinuidades. La misma idea se aplica para la recuperación de metano en capas de carbón inexplorables.

- **Síntesis de compuestos químicos:** El CO₂ se utiliza en la síntesis de urea (fertilizante), formación de resinas, producción de ácido acetilsalicílico y en la producción sintética de combustible como el metano.
- **Procesos biológicos:** Los organismos fotosintéticos utilizan CO₂ para generar biomasa empleando la energía solar. La composición de esta biomasa puede ser de interés comercial. De esa forma el CO₂ pasa de ser un residuo a convertirse en un producto. El ejemplo más ilustrativo es el empleo de CO₂ para el cultivo de microalgas, microorganismos fotosintéticos, con altas tasas de crecimiento y una composición de metabolitos muy amplia, que posibilita su uso para diferentes aplicaciones, como producción de biocombustibles, industria cosmética, compuestos nutracéuticos, vacunas, biorremediación...

LAS MICROALGAS

En ficología aplicada y biotecnología, el término microalgas define a organismos microscópicos, con clorofila *a*, que realizan fotosíntesis oxigénica y sin diferenciación en raíces, tallo y hojas. Incluyen tanto a microorganismos eucariotas (clasificados tradicionalmente según sus pigmentos fotosintéticos en rodofitas, clorofitas, dinofitas, crisofitas, prymnesiofitas, bacillariofitas, xantofitas, eustigmatofitas, raphidofitas y feofitas) como a procariotas (cianobacterias y proclorofitas) distribuidos por todos los hábitats terrestres y acuáticos (Richmond, 2004). Estos microorganismos fueron los responsables del cambio en la composición de la atmósfera primitiva hace unos 3500 millones de años, aumentando el nivel de oxígeno, originando una atmósfera rica en este gas, que ha permitido el desarrollo de la vida tal como la conocemos (Demirbas y Demirbas, 2010). Son responsables de al menos la mitad de la productividad primaria del planeta.

La fotosíntesis representa un proceso único en la conversión de compuestos inorgánicos en compuestos orgánicos usando energía solar (Ho et al., 2011). Virtualmente todas las formas de vida en la Tierra dependen directa o indirectamente de la fotosíntesis como fuente de energía para su metabolismo y crecimiento (Masojídek et al., 2004). En la fotosíntesis oxigénica, la luz del sol se convierte en energía química, actuando el agua como donador de electrones y generando el poder reductor (NADPH) y ATP que servirán para diferentes propósitos metabólicos, uno de los más relevantes, la fijación de CO₂. Los compuestos reducidos de carbono, se utilizan como estructura básica para la incorporación de elementos primordiales como nitrógeno, fósforo y azufre, generando monómeros orgánicos simples como aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y otros carbohidratos más complejos que se

ensamblan para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos que constituyen la biomasa de cualquier organismo vivo (Lehninger et al., 1995).

La asimilación de CO_2 es el proceso de mayor consumo energético en la fotosíntesis. Esta asimilación se lleva a cabo por una compleja ruta metabólica, el ciclo de Calvin, que implica 13 reacciones catalizadas por 11 enzimas diferentes y tiene lugar en el estroma. La primera fase, de carboxilación, consiste en la fijación del CO_2 a un esqueleto de cinco átomos de carbono, la ribulosa 1,5 bifosfato, catalizada por la Rubisco (la proteína más abundante de la biosfera) (Stryer et al., 2002). Se forma así un intermediario inestable de 6 átomos de carbono que se hidroliza en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (PGA). En la fase reductiva, las dos moléculas de PGA se reducen a triosas fosfatos consumiendo ATP y se condensan para formar hexosas monofosfato. En la fase de regeneración de la ribulosa-bifosfato (RuBP) interviene primero una transcetolasa que convierte un azúcar de 6 carbonos y otro de 3, en uno de 4 y otro de 5 carbonos. Una aldolasa combina el azúcar de cuatro y otro de tres carbonos generando otro azúcar de siete carbonos que se combina a su vez con otro de tres para formar dos azúcares de 5 carbonos (Malkin y Niyogi, 2000). El balance de todas estas reacciones es la formación de una hexosa y la regeneración de la ribulosa 5-fosfato con el consumo de tres moléculas de ATP y dos de NADPH. La fijación del CO_2 es el paso limitante de esta ruta siendo CO_2 el único sustrato posible (no usa HCO_3^- ni CO_3^{2-}). Una concentración elevada de CO_2 es necesaria para reducir al mínimo la pérdida de energía debida a la fotorrespiración (Falkowski y Raven, 1997). Cianobacterias y microalgas han desarrollado mecanismos muy diversos para concentrar el CO_2 (Price et al., 2008; Wang et al., 2011).

Las cianobacterias acumulan carbohidratos en forma de glucógeno mientras que plantas superiores y microalgas almacenan almidón. Ambos son polímeros de residuos de glucosa pero el almidón está menos ramificado por contener una menor proporción de enlaces α -1,6 glucosídicos. Otra diferencia respecto al glucógeno es que en el almidón el precursor activado es la ADP-glucosa y no la UDP-glucosa. El almidón se sintetiza y almacena en los cloroplastos y está constituido por amilosa, no ramificada, formada exclusivamente por residuos de glucosa con uniones α -1,4, y amilopeptina, la forma ramificada, con un enlace α -1,6 por cada 30 enlaces α -1,4. La hélice abierta formada por estos enlaces resulta muy útil para constituir un almacén de azúcar fácilmente accesible. Más de la mitad de los carbohidratos ingeridos por el hombre son almidón (Stryer et al., 2002).

Biotecnología de microalgas

Las microalgas están presentes en cualquier medio natural donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con un intervalo apropiado de temperatura. Hasta la fecha se han descrito más de 40.000 especies (Elliott et al.,

2012), aunque algunos autores refieren números muy superiores (más de 100.000) (Demirbas y Demirbas, 2010).

Las microalgas se han considerado buenos organismos modelo para el estudio de complejos procesos biológicos como la morfogénesis y diferenciación, el reconocimiento celular, los ritmos biológicos, la evolución de procesos y rutas metabólicas y la fisiología y bioquímica de la fotosíntesis. Por otro lado, en las microalgas se combinan propiedades metabólicas típicamente vegetales con características propias de células microbianas tales como la capacidad de crecimiento rápido en cultivo líquido, simplicidad de requerimientos nutritivos, plasticidad metabólica, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de sintetizar y secretar algunos metabolitos y potencialidad de manipulación genética, que les confiere interés biotecnológico (Borowitzka 2013).

Las primeras noticias acerca de la utilización de microalgas como alimento por el hombre se remontan al siglo XVI, cuando los cronistas del descubrimiento de América describen la elaboración de unos panecillos a partir de masas de algas que se recolectaban en el lago Texcoco y que utilizaba el pueblo azteca como alimento. Sin lugar a dudas se trataba de materia seca de la cianobacteria *Spirulina maxima*. El botánico belga J. Leonard, en 1964, describió la venta en los mercados de la región de Kanem (República del Chad) de tortas de color verde-azulado que empleaban como alimento la población nativa (Abdulqader et al., 2000; García-González et al., 2000).

La primera microalga aislada y mantenida en condiciones axénicas fue *Chlorella vulgaris*, en 1890, aunque hasta la década de 1940, no se iniciaron estudios sobre la fisiología y bioquímica de estos microorganismos. La idea de producir microalgas a gran escala tuvo su origen en Alemania durante los años 40 utilizando diatomeas (Harder y von Witsh, 1942). En 1951 el Instituto Carnegie de Washington financió la construcción en Massachusetts de la primera planta piloto para la producción de microalgas. Otro centro importante durante esos años fue el Instituto Tokugawa de Tokio donde se llevaron a cabo estudios al aire libre en una planta piloto sobre el cultivo de *Chlorella* (García-González et al., 2000; Huntley y Redalje, 2007).

La mayoría de las plantas industriales para el cultivo de microalgas están localizadas en el Pacífico a excepción de algunas factorías situadas en Israel (Nature Beta Technologies), en USA (Cyanotech en Hawaii o Algenol en Florida), y en Australia (Betatene Ltd. o Wester Biotechnology Ltd). La búsqueda de fuentes alternativas de biocombustible ha permitido el florecimiento de muchas nuevas compañías (Sapphire Energy, Solazyme, Joule Unlimited, Aurora Algae, PetroAlgae, OriginOil, Phycal...)

Aplicaciones de las microalgas

La biomasa de microalgas puede ser utilizada en la fertilización y acondicionamiento de suelos para uso agrícola, en la detección de contaminantes y

evaluación de ecotoxicidad, en la depuración de aguas residuales y gases contaminantes y fundamentalmente, en la generación fotosintética de productos de interés agrícola, alimentario, industrial y energético.

Alimentación

Desde la década de 1950 se han realizado intensos esfuerzos para explotar nuevas y alternativas fuentes de proteínas y suplementos alimenticios anticipándose a una población creciente y a una carencia en la ingesta proteica. Las microalgas pueden utilizarse directamente como alimento, para incrementar el contenido en principios nutritivos de alimentos preparados y como agente probiótico con un efecto positivo en la salud humana y animal, lo que ha permitido el desarrollo de mercados para los productos derivados de microalgas (Becker, 2004).

Durante las décadas de 1970 y 1980 se desarrolló un extenso trabajo para la producción a gran escala de cultivos de microalgas como fuente de proteínas. Bajo el concepto "Single-Cell Protein" se evaluó y estudió multitud de estirpes de microalgas buscando la de mayor contenido proteico así como el perfil de aminoácidos más adecuado para la dieta humana y animal (Borowitzka, 2013). Los géneros con mayor coeficiente de digestibilidad y valor biológico son *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Spirulina* (Pal et al., 2011).

Las microalgas sintetizan y acumulan gran variedad de carbohidratos como almidón o glucógeno fácilmente digeribles y sin restricciones para su uso como fuente de alimento (Becker, 2004). Sin embargo, su implantación es escasa salvo en algunas regiones de Asia. Los polisacáridos producidos por *Porphidium* o *Rhodella*, así como el de muchas cianobacterias, sí tienen aplicación como espesantes en diversos sectores industriales: alimentación, cosmética, pinturas, etc... aunque con un mercado restringido debido a alternativas más económicas como los polisacáridos producidos por macroalgas (carrageno, fucoídano o agar) o por plantas superiores (goma xantano) (Borowitzka, 2013).

Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) como γ -linoleico, araquidónico, eicosapentaenóico (EPA) o docosahexaenóico (DHA) se encuentran frecuentemente en la composición lipídica de las microalgas, constituyendo un mercado bien establecido tanto en alimentación humana como animal (acuicultura). Así mismo, las microalgas contienen un amplio rango de esteroides y vitaminas usados principalmente como constituyentes de alimentos funcionales (Borowitzka, 2013).

La biomasa de microalgas es rica en pigmentos que se utilizan como colorantes alimentarios y precursores de vitaminas. En acuicultura tienen aplicación para mejorar la supervivencia y maduración del sistema inmune y la pigmentación de la carne y piel de pescados y crustáceos (Walker et al., 2005).

Fertilización

Las microalgas pueden ser utilizadas como fertilizantes en agricultura sostenible. Dentro de las comunidades microbianas desarrolladas en los suelos, las microalgas y cianobacterias juegan un papel fundamental en la recirculación y biodisponibilidad de elementos importantes como P y por tanto, en el acondicionamiento de suelos agrícolas (Singh et al., 2011). Históricamente, en los campos de arroz del sureste asiático, cianobacterias del género *azollae* se han utilizado como fertilizantes por su capacidad de fijar nitrógeno (Roger, 2004). Actualmente se está poniendo en práctica el uso de microalgas para incrementar la productividad de cultivos como leguminosas y frutales (Ismail et al., 2011; Prasanna et al., 2013).

Biorremediación

Se ha propuesto el uso de microalgas en procesos de biorremediación tales como eliminación de dióxido de carbono proveniente de gases de escape de plantas industriales, tratamientos de aguas residuales o remoción de metales pesados provenientes de efluentes contaminados por la minería o zonas altamente contaminadas.

La posibilidad disponer de una fuente de carbono económica hace que se esté valorando el cultivo de microalgas a escala industrial en instalaciones anexas a grandes centros de emisión de CO₂ como pueden ser las centrales térmicas y cementeras con el doble objetivo de reducir sus emisiones y de generar un producto con diversas aplicaciones. Sin embargo, algunas de estas fuentes emisoras producen un gas con altas concentraciones de dióxido de carbono, así como de compuestos oxidados de nitrógeno y azufre, que no son adecuados para su aplicación al cultivo de microalgas (Barker et al., 2009; Douskova et al., 2009; Van Den Hende et al., 2012).

El oxígeno es un elemento clave en el proceso de depuración de aguas residuales urbanas para la oxidación de la materia orgánica por un consorcio de bacterias. De manera tradicional, este oxígeno se suministra por soplantes con un importante costo energético. El oxígeno producido por los cultivos de microalgas como resultado de la fotosíntesis supone una clara mejora en el proceso. Así mismo, las microalgas favorecen la retirada de nitrato, fosfato e iones metálicos. Para dar salida a esta biomasa de microalgas se plantea la instalación de plantas de biogás y generación de calor o electricidad a partir de la biomasa algar (Acién Fernández et al., 2012; Ahmad et al., 2013).

El cultivo de microalgas puede usarse para la biorremediación de efluentes provenientes de actividades industriales y agrícolas, eliminando sustancias altamente contaminantes como compuestos fenólicos y pesticidas. Se han descrito microalgas con capacidad de degradar crudo (Subashchandrabose et al., 2013). Diversas microalgas excretan carbohidratos y otros compuestos orgánicos complejos con capacidad de adsorber cationes, haciéndolas especialmente interesantes para la

remoción de metales pesados generados en los efluentes de actividades industriales como minería y metalurgia, evitando su dispersión y acumulación en el medio ambiente y en la cadena trófica con el consiguiente riesgo para la salud humana. (McHenry, 2013; Orandi y Lewis, 2013).

Generación de productos de interés

De entre todos los usos comerciales ya mencionados, la generación de productos con aplicación industrial constituye en la actualidad el aspecto central de la biotecnología de microalgas. Muchas especies producen, como resultado de su metabolismo, diferentes compuestos biológicos de interés para las industrias químicas o farmacéuticas, tales como pigmentos, lípidos, polisacáridos, vitaminas, etc. Éstos pueden acumularse como parte de la biomasa del alga o en algunos casos, liberarse al medio externo. Las microalgas han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales extremas, tales como sintetizar sustancias mucilaginosas extracelulares para protegerse del estrés hidrodinámico o acumular pequeñas moléculas intracelulares para solventar problemas de osmorregulación en medios salinos. Del mismo modo, pueden variar su contenido en pigmentos fotoprotectores o accesorios de la fotosíntesis para adaptarse a cambios en la irradiancia, así como acumular productos específicos para protegerse de situaciones de limitación de algún nutriente, etc. Si estas condiciones se simulan en los sistemas de cultivo, se puede conseguir que el metabolismo celular se dirija hacia la biosíntesis de productos de interés comercial (Gudin y Thepenier, 1986).

Pigmentos

Las ficobiliproteínas, además de su uso en como colorante en la industria alimentaria y cosmética, tienen una aplicación interesante en microscopía de fluorescencia e inmunoensayos. Se pueden asociar con una gran variedad de biomoléculas sin alterar sus características de absorción y emisión de luz, tienen alta eficiencia cuántica y son estables en amplios márgenes de pH y temperatura. Su fluorescencia anaranjada es fácil de diferenciar de la fluorescencia verde de los tejidos. Todas estas propiedades las convierte en excelentes trazadores fluorescentes para su aplicación en diagnóstico e investigación biomédica (Glazer, 1994).

Los carotenoides muestran una gran diversidad en su distribución, estructura y función. Se trata de pigmentos accesorios que aumentan la eficiencia de la absorción de luz por los organismos fotosintéticos al captar longitudes de onda del espectro distintas a las recogidas por las clorofilas, desempeñando un importante papel en la protección de las microalgas contra procesos fotooxidativos. Multitud de estudios han puesto de manifiesto la poderosa actividad antioxidante tanto de β -caroteno como astaxantina y cantaxantina (Borowitzka, 1992). Estos compuestos actúan secuestrando radicales libres de oxígeno, directamente relacionados con la aparición de enfermedades degenerativas, con beneficios para la salud humana y animal previniendo o retrasando algunas enfermedades como cáncer, aterosclerosis,

cataratas, etc. Los principales pigmentos explotados comercialmente son β -caroteno y astaxantina (Del Campo et al., 2007).

Compuestos con actividad biológica

Las microalgas son capaces de generar metabolitos secundarios de importancia en biomedicina y agronomía para el desarrollo de compuestos como herbicidas, pesticidas, antibióticos, compuestos anticancerígenos y antivirales, con actividad antiinflamatoria, antitrombótica, antidiabética, cardio, neuro y hepatoprotectora, antianémica y antihistamínica (Patel y Goyal, 2013; Skjånes et al., 2013).

En los últimos años ha surgido el concepto de compuesto “cosmecéutico”, derivado de las palabras cosmético y farmacéutico, haciendo referencia a compuestos bioactivos (Borowitzka, 2013) como los derivados de microalgas marinas: florotaninos, polisacáridos sulfatados e inhibidores de la tirosinasa. Existe una profunda investigación encaminada a caracterizar bioquímicamente y estructuralmente estos compuestos y sus posibles aplicaciones (Kim et al., 2008; Thomas y Kim, 2013).

Biocombustibles

La idea inicial de producir lípidos a partir de microalgas para su transformación en combustibles alternativos a los derivados del petróleo es muy antigua (Harder y von Witsch, 1942). La situación energética actual ha dado un nuevo impulso a estas iniciativas buscando reducir la dependencia del petróleo y la emisión de gases de efecto invernadero.

El uso de cultivos vegetales con fines energéticos no es nuevo (Brennan y Owende, 2010). La primera aproximación fue el uso de azúcares y aceites derivados de plantas. Mediante la digestión y fermentación del almidón proveniente de granos de cereales como maíz, trigo o cebada o de caña de azúcar se genera bioetanol y biobutanol. Aceites de plantas oleaginosas como palma, soja o colza se utilizan para la producción de biodiésel. Sin embargo, estas materias primas son la base de la nutrición mundial planteándose la disyuntiva de su uso como alimento o como combustibles. Por otra parte, las grandes extensiones de tierra y agua necesarias para estos cultivos han impulsado la búsqueda de otras materias primas más sostenibles (Borowitzka y Moheimani, 2010).

El potencial de la biomasa de microalgas como fuente de materias primas para biocombustible se basa en su rápido crecimiento y alta productividad, no competencia con la agricultura tradicional, posibilidad de utilización de agua residual, salobre o marina y elevado contenido en aceite y/o azúcares (Douskova et al., 2009). Se estima que para cubrir la demanda global de combustibles, debería destinarse a cultivos de microalgas unos 6 millones de hectáreas, lo que supone, menos del 0,4% de la superficie cultivable (Gressel, 2008).

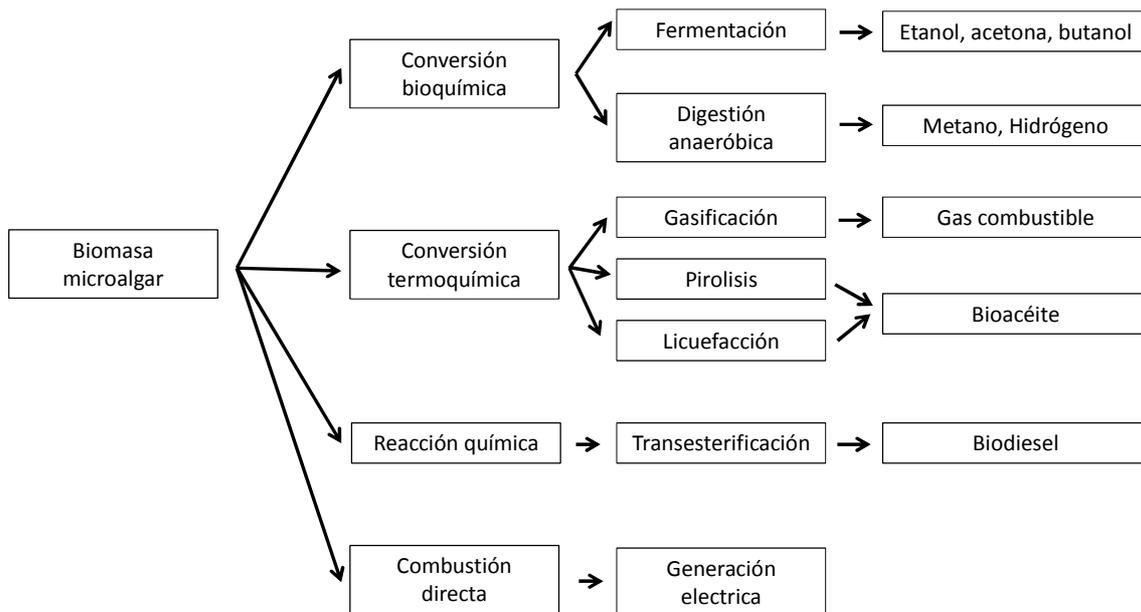


Figura 8. Procesos de producción de energía usando biomasa microalgar. Adaptado de Wang (2008)

La producción de biogás (metano e hidrógeno) (Figura 8) tiene lugar por digestión anaerobia de la biomasa completa o los residuos obtenidos tras la obtención de diversos componentes (Sialve et al., 2009). La producción de hidrógeno a partir de biomasa puede realizarse mediante procesos físico/químicos energéticamente costosos como la gasificación, pirólisis y licuefacción o mediante procesos biológicos como la fotólisis del agua, foto-descomposición de la materia orgánica algar por bacterias fotosintéticas, la producción de H₂ mediante fermentación o sistemas híbridos en los que interviene la fotosíntesis y bacterias fermentativas (Das, 2001).

Los azúcares algares (almidón y glucógeno) se pueden fermentar para la producción de bioetanol. El proceso pasa por un pretratamiento de la biomasa, una hidrólisis, posterior fermentación y separación del producto final (Harun et al., 2011).

La composición lipídica rica en ácido palmítico, palmitoléico, esteárico, oleico y linoléico, hacen de la biomasa microalgar una excelente materia prima para ser utilizada en el proceso de transesterificación para la generación de biodiésel (Chisti, 2007; Khan et al., 2009).

Por último la forma más básica de generación de energía a partir de la biomasa algar consiste en la combustión directa de la misma generando calor y electricidad (Kadam, 2002).

La posibilidad de explotar comercialmente todo el potencial de productos derivados de microalgas (biorrefinería) puede hacer económicamente factible su escalado (Pires et al., 2012). Este concepto integral, que implica extraer de la biomasa, de forma secuencial, distintos subproductos (Figura 9) hasta obtener un residuo final, necesita aun del desarrollo de tecnologías de separación sin dañar o impedir el

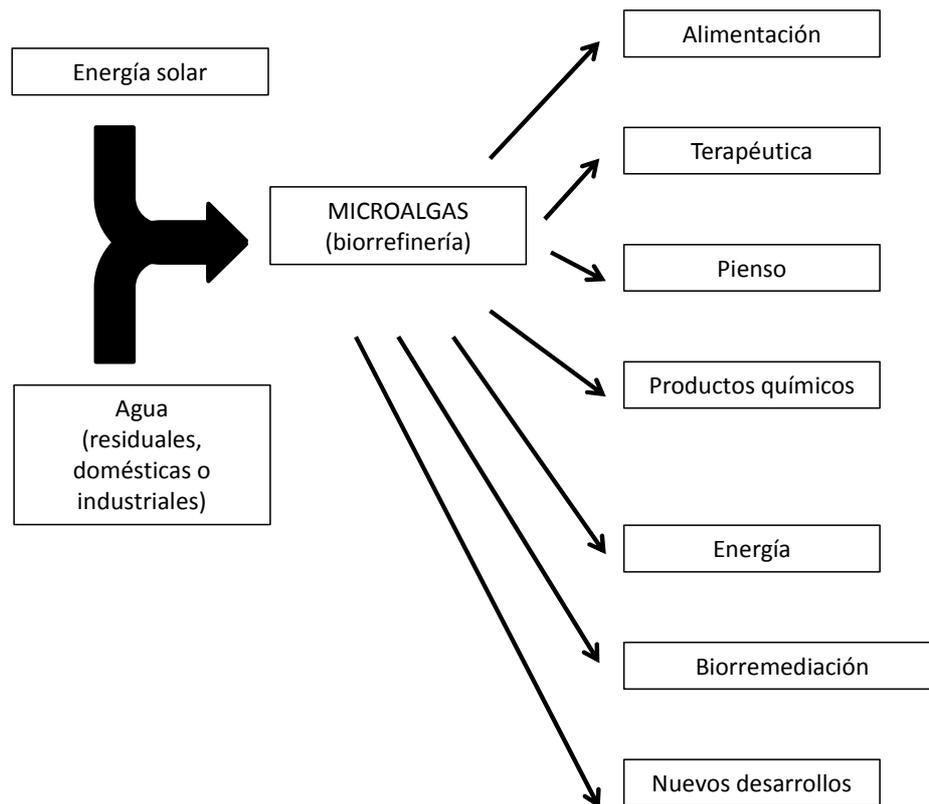


Figura 9. Usos y aplicaciones del cultivo de microalgas como biorrefinerías. Adaptado de García-González et al. (2000) y Ho et al. (Ho 2010)

aprovechamiento de otro compuesto, de forma económica y con un bajo consumo energético (Vanthoor-Koopmans et al., 2013).

Nuevos desarrollos

Se sigue investigando en nuevas aplicaciones y desarrollos para la biomasa de microalgas. Entre ellos, cabe destacar la producción de bioplásticos a partir de polihidroxicarbonos (Balaji et al., 2013; Borowitzka, 2013), proteínas recombinantes para farmacología y medicina (Potvin y Zhang, 2010), incremento de la productividad de lípidos y carbohidratos mediante modificación de rutas metabólicas (Angermayr et al., 2009; Dexter y Fu, 2009; Blatti et al., 2013) o mediante la modificación estructural de las células (reducción de los pigmentos antena para disminuir los fenómenos de fotoinhibición o incremento de la eficiencia de la Rubisco) (Huntley y Redalje, 2007).

El cultivo de microalgas

Para el establecimiento de un proceso de producción de microalgas para la obtención de un compuesto de interés, es de crucial importancia la selección de la microalga más idónea para el fin propuesto atendiendo a factores como la elevada productividad, tolerancia a temperatura, pH e irradiancia, elevado rendimiento en el

compuesto de interés y facilidad de recolección. Igualmente es necesario definir las condiciones de operación y el sistema de cultivo.

Atendiendo a la fuente de energía y de carbono las microalgas se pueden cultivar en distintos modos (Makareviciene et al., 2013):

- Autotrófico: Utiliza luz, natural o artificial, como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono.
- Heterotrófico: La energía y el carbono se obtienen de la oxidación de sustratos orgánicos. No todas las especies de microalgas pueden crecer en heterotrofia. Los costes de operación y riesgos de contaminación son elevados pero el control del proceso es máximo rindiendo elevadas productividades (Doucha y Lívanský, 2011; Perez-Garcia et al., 2011).
- Mixotrófico: Las microalgas realizan la fotosíntesis pero en presencia de una fuente de carbono orgánico (Abreu et al., 2012; Mitra et al., 2012).

Dependiendo del régimen de operación, los cultivos de microalgas pueden clasificarse en estancos, semicontinuos, continuos e inmovilizados (Yuan-Kun y Hui, 2004).

En el modo estanco se parte de una situación inicial con un medio de cultivo y condiciones establecidas que se deja evolucionar con el tiempo. La concentración de la biomasa va incrementándose hasta agotar nutrientes y/o la luz llegue a ser limitante. Se ajusta por tanto a las fases de un cultivo microbiano: aclimatación, crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de declive/muerte.

Los cultivos continuos se caracterizan por un aporte constante de medio fresco, una mezcla homogénea inmediata y la salida continua de la biomasa generada. Este modo de operación permite mantener estados de equilibrio dinámico, determinados por el valor de la velocidad de dilución impuesta (tasa de renovación o aporte de medio fresco). Cuando la velocidad específica de crecimiento (μ) iguala a la velocidad de dilución (D), se genera un estado estacionario en el que se mantiene un valor de densidad celular, de manera que se compensa la generación de células por crecimiento con la dilución producida por el aporte de medio fresco (Pirt et al., 1983). Los estados de equilibrio son situaciones estables, mantenidas en el tiempo, en las que las características del cultivo se mantienen constantes. Por lo tanto, una vez alcanzado este estado, se podría mantener el cosechado asegurando la misma composición de la biomasa. Además, el mantenimiento de una densidad celular estable asegura que las modificaciones en el comportamiento del cultivo cuando se cambia una variable del sistema, se debe exclusivamente a ese cambio y no a un sumatorio de efectos difíciles de determinar, como ocurre en los cultivos en estanco.

Los cultivos semicontinuos son una situación intermedia donde se realizan diluciones cada cierto tiempo renovando una parte del cultivo mediante el cosechado

de parte de la biomasa y la recuperación del volumen con medio fresco (Henrard et al., 2011).

Por último, algunas especies de microalgas pueden ser inmovilizadas en distintos tipos de matrices naturales (alginato, carrageno, esponjas de lufa) o artificiales (acrilamida, poliuretano) proporcionando un ambiente estable y protector que permite unas tasas de crecimiento altas así como facilidad para recuperar los posibles productos excretados al medio (Moreno-Garrido, 2008).

Factores que afectan al cultivo de microalgas

El cultivo a gran escala de microalgas persigue la obtención de cantidades importantes de un producto de valor, por tanto, la productividad del sistema debe ser máxima. Para alcanzar este objetivo es crítica la comprensión de los factores que determinan el crecimiento óptimo: medio de cultivo, intercambio de gases, pH, temperatura y régimen de iluminación. Del mismo modo, el conocimiento de estos factores posibilita su modulación para conseguir una composición celular determinada y con ello, redirigir el metabolismo del microorganismo hacia la producción del compuesto o proceso deseado (Hu, 2004).

El medio de cultivo debe suministrar todas las sales requeridas para el crecimiento de la microalga. De forma general todos los medios tienen una fuente de C bien en forma de sal inorgánica (bicarbonato sódico), compuesto orgánico (acetato) o como gas (CO_2). El nitrógeno se suministra como sal de nitrato y raras veces como amonio o urea. Otros nutrientes esenciales son P, S, Mg, Ca, K y algunos metales.

El intercambio de gases debe asegurar el aporte de CO_2 y la retirada del O_2 fotosintético. El intercambio a través de la superficie del cultivo es insuficiente de manera que es necesario suministrar una corriente de aireación y/o disponer de un adecuado sistema de agitación y mezcla.

La reducción del nitrato o la asimilación del CO_2 suponen una elevación del pH del medio de cultivo que debe ser corregida para asegurar el buen funcionamiento de las rutas metabólicas, bien utilizando medios tamponados, adicionando ácido de forma controlada o inyectando en la corriente de aire una proporción adecuada de CO_2 .

Uno de los factores más determinantes para el crecimiento óptimo de una microalga es la disponibilidad de luz, a la que debe considerarse como un nutriente más ya que va a convertirse en biomasa. La irradiancia promedio recibida por cada célula está determinada por la irradiancia incidente, la geometría del reactor y el sistema de mezclado, que asegura el continuo movimiento de las células desde zonas oscuras a iluminadas y viceversa para que la exposición sea óptima (Masojídek et al., 2004; Ergas y Van der Steen, 2013), evitando la fotoinhibición y daños por estrés fotooxidativo que repercutiría en el crecimiento celular (Vonshak y Torzillo, 2004; Ras et al., 2013).

Fotobiorreactores

Las características deseables en un biorreactor son (Tredici, 2004; Makareviciene et al., 2013):

- Ser universal y adecuado para el cultivo de varias especies de microalgas
- Proporcionar la mayor cantidad de luz posible
- Proporcionar un buen intercambio gaseoso de CO₂ y O₂
- Minimizar la sedimentación de las microalgas y su adhesión a la superficie del reactor
- Poseer una tasa alta de transferencia de masa y temperatura sin dañar a la célula o inhibir su crecimiento
- Baratos de construir y operar
- Fácilmente escalables

En el diseño y ubicación de un reactor se debe tener en cuenta la relación superficie/volumen, la orientación e inclinación, acumulación de oxígeno y difusión de dióxido de carbono, mezclado, temperatura y coste (Tredici, 2004).

Atendiendo a su diseño, los reactores utilizados a gran escala en la producción fotoautótrofa de microalgas se clasifican en abiertos y cerrados:

1. Abiertos: Los estanques abiertos fueron los primeros sistemas de cultivo a la intemperie desarrollados a escala industrial para el cultivo de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*. La explotación de estos sistemas de cultivo puede ser intensiva o extensiva (Figura 10). El sistema abierto de tipo extensivo utiliza grandes superficies (entre 5 y 50 ha) sin agitación mecánica, con una orientación tal que la turbulencia ocasionada por los vientos predominantes en la zona permitan una cierta homogeneización y movimiento de la masa líquida. La explotación extensiva se corresponde con el modo de operación de los lagos naturales, que se han empleado en la producción de hasta 20 t ha⁻¹ año⁻¹ de biomasa comestible (Chaumont, 1993). Los sistemas de cultivos



Figura 10. A) Estanque natural para la producción de *Dunaliella* (Cognis, West Australia) B) Reactores tipo raceway con diferentes volúmenes en Israel (Seambiotic Ltd.)

intensivos son estanques horizontales poco profundos tipo carrusel o “raceway”. Cada unidad de cultivo ocupa un área de entre varios cientos y pocos miles de metros cuadrados, estando compuesta de dos o más pistas niveladas de 2 a 10 m de ancho y 15-30 cm de profundidad, separadas entre sí por tabiques verticales, pudiendo adoptar un sistema de meandros. A lo largo de estos canales, cuyo piso y paredes suelen estar recubiertos por una capa de plástico inerte, fluye la suspensión celular a una velocidad de 0,2 a 0,5 m s⁻¹, impulsada por la acción de paletas giratorias, hélices o bombas. El carbono inorgánico se suministra según las necesidades del cultivo, lo que se controla generalmente por medio de un pHstato y una válvula solenoide, de forma que se insufla CO₂ cuando el pH supere un valor crítico, hasta restablecer el pH óptimo para el crecimiento. El cultivo en masa de microalgas en estanques abiertos combina características típicas de los cultivos agrícolas (uso extensivo de terreno, agua y nutrientes, así como dependencia del clima y de la radiación solar), con otras que asemejan la acuicultura y, sobre todo, con aquellas propias de procesos industriales para el cultivo de microorganismos, tales como operación continua, aporte dosificado de nutrientes y control del proceso de producción (García-Guerrero et al., 2006)

Este reactor es el más económico y sencillo, aunque su explotación presenta notables limitaciones debido a la falta de control de temperatura y al empleo ineficiente de la luz. Se alcanzan valores bajos de densidad celular puesto que el paso de luz es amplio (20-30 cm), y la agitación con paletas no permite la apropiada sucesión de ciclos de luz-oscuridad que requieren los cultivos de microorganismos fotosintéticos (Grobbelaar, 1994) ni una buena transferencia de materia. El control de la temperatura es inviable debido a las dimensiones de las instalaciones, por ello la mayoría de las explotaciones al exterior de microalgas en estanques se realizan en climas templados. En algunos casos, los cultivos son posibles únicamente en determinadas épocas del año (Borowitzka, 1999). Las características de los sistemas abiertos dificultan el mantenimiento de cultivos monoalgales y libres de predadores, por lo que su empleo a gran escala se ha limitado a estirpes que se desarrollan adecuadamente en condiciones restrictivas de pH (*Arthrospira*) o salinidad (*Dunaliella*), o de muy rápido crecimiento (*Chlorella*).

2. Cerrados: Los sistemas de cultivo cerrados, de mayor sofisticación tecnológica, representan la alternativa a los estanques abiertos, aportando mejores condiciones para cultivar cualquier microalga al dificultar la invasión por organismos contaminantes. De hecho algunas microalgas sólo pueden ser cultivadas en reactores cerrados puesto que se contaminan con facilidad (Pulz et al., 2001).

Los sistemas cerrados presentan múltiples ventajas frente a los reactores abiertos como un uso más eficiente de la irradiancia, que conduce a la producción de cultivos más concentrados, la posibilidad de cultivar todo el año, una disminución de

las pérdidas por evaporación, un mejor control de algunas variables como la temperatura y mayor facilidad de operación en continuo (Tredici y Materassi, 1992; Borowitzka, 1999; Grobbelaar, 2009).

Los reactores cerrados son apropiados para el cultivo de microalgas que generen productos de interés de elevado valor comercial, puesto que el coste de construcción y mantenimiento de estos reactores es elevado. Este hecho, unido al riesgo de inhibición de la fotosíntesis por la presencia de oxígeno, y la complejidad de su escalado, suponen los inconvenientes principales de los sistemas de cultivo cerrados.

Existen varios diseños de reactores cerrados, siendo el reactor tubular el ejemplo más representativo, considerándose los reactores planos un punto intermedio entre los sistemas de cultivos abiertos y cerrados (Pulz y Scheibenbogen, 1998) (Figura 11).

Reactor tubular: Los fotobiorreactores tubulares consisten esencialmente en tubos transparentes de vidrio o material plástico, conectados en serie o en paralelo para formar el colector solar, a través del cual se recircula la suspensión celular. Los tubos pueden estar dispuestos en horizontal (Molina Grima et al., 2001), en vertical (Converti et al., 2006), formando una espiral (Acién-Fernández et al., 2003), o inclinados (Vunjak-Novakovic et al., 2005). Para maximizar el empleo del terreno se ha situado en algunos casos un segundo nivel de tubos que están desplazados sobre los del nivel inferior (Torzillo et al., 1993). La recirculación de la suspensión por el fotobiorreactor se realiza mediante bombas mecánicas o sistemas “airlift”, en los que el flujo de aire sustenta el movimiento de la masa líquida. Los sistemas tubulares con circulación impulsada por “airlift” son robustos y menos susceptibles a la contaminación que los basados en bomba mecánica, estando las células menos expuestas a sufrir daños que en este último caso. El airlift cumple la doble función de bomba y de intercambiador de gases, eliminando el exceso de oxígeno generado fotosintéticamente, que acumula el cultivo en su recorrido por el colector solar (Eriksen, 2008). El diseño del reactor debe tener en cuenta el flujo idóneo y el adecuado intercambio gaseoso, además de maximizar la captura de luz, a la vez que se minimiza la ocupación de superficie. El diámetro del tubo debe estar entre 2 y 15 cm, siendo el valor óptimo de aproximadamente 10 cm. El tamaño de la unidad de este tipo de reactor no debería sobrepasar los 5.000 l. La mayor planta en operación basada en reactores tubulares (de disposición vertical) se encuentra en Klötze, Alemania, (600.000 l) y se dedica a la producción de biomasa microalgal (*Chlorella*) para consumo humano.

Reactor plano vertical: Los reactores planos son aquellos en los que el cultivo queda dispuesto en una lámina orientada de manera que la luz incida directamente sobre ella. Los primeros reactores planos verticales se desarrollaron en la década de



Figura 11. Diferentes diseños de fotobiorreactores cerrados: A) Tubular, C) Columna vertical. Reactor semiabierto: D) Panel vertical. Todos ellos en las instalaciones del IBVF en Isla de La Cartuja (Sevilla). B) Bolsas de polietileno (www.empowernetwork.com)

los 50 (Burlew, 1953). Su diseño y componentes han variado desde su origen (Tredici y Materassi, 1992; Pulz et al., 1995; Hu et al., 1996) hasta la actual bolsa de PVC contenida y soportada por una estructura rígida, que supone una reducción sustancial del coste de estos reactores (Tredici, 2004; Sierra et al., 2008). El sistema puede termostatzarse mediante un intercambiador de calor colocado en su interior. La agitación de estos reactores se realiza generalmente inyectando aire en la base del mismo, lo que supone en algunos casos estrés hidrodinámico para las células (Sánchez Mirón et al., 1999). Estos sistemas semiabiertos, con propiedades híbridas de estanques y sistemas cerrados, presentan un interesante potencial para su empleo en aproximaciones masivas, como serían aquellas dirigidas al aprovechamiento de las microalgas para la captura de CO_2 y/o la generación de biomasa para su empleo como materia prima de biocombustibles. Se ha citado mayor productividad por unidad de

área para estos sistemas que la de estanques y reactores tubulares en el cultivo de *Chlorella* en Alemania (Pulz et al., 1995).

La Tabla 1 resume las diferencias más notables entre los reactores abiertos y cerrados.

Tabla 1. Características de los reactores abiertos y cerrados para el cultivo de microalgas al exterior. Adaptado de Del Campo (Del Campo et al., 2007) y Acién Fernández (Acién Fernández et al., 2013)

	Abiertos	Cerrados
Difusión de CO ₂	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
Productividad de biomasa	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
Tasa específica de crecimiento	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
Riesgo de contaminación	<i>Muy alto</i>	<i>Bajo</i>
Pérdidas por evaporación	<i>Alto</i>	<i>Bajo</i>
Disponibilidad de luz	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
Relación volumen/superficie	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
Control de condiciones cultivo	<i>Difícil</i>	<i>Posible</i>
Costes instalación	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
Costes operación	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
Escalado	<i>Posible</i>	<i>Difícil</i>

Procesos para cosechado y secado de la biomasa

De especial relevancia para el éxito de iniciativas a gran escala de cultivos de microalgas es el cosechado de la biomasa generada, que puede representar hasta el 20-30% de los costes de su producción (Molina Grima et al., 2004). Debe ser un proceso idealmente continuo, capaz de procesar grandes volúmenes de medio y económico. Las propiedades de las microalgas que influyen en su separación son: morfología (filamentosa o unicelular), tamaño, peso específico y carga superficial de la célula (habitualmente carga negativa). Los cultivos de microalgas suelen estar poco concentrados, dificultando este proceso. Generalmente se lleva a cabo en varias etapas, de forma que, la concentración de biomasa se va incrementando gradualmente. Los pasos habituales son: 1) Cosechado primario, aumenta la concentración de la biomasa 10 veces, 2) Espesado o concentración secundaria, incrementa otras 10 veces la concentración, 3) Deshidratación, para la retirada de la casi totalidad del líquido y 4) Secado o concentración cuaternaria, elimina cualquier traza de agua (Fon Sing et al., 2011). Algunos autores estiman que con una optimización de estos pasos, la biomasa podría concentrarse hasta 200 veces (Molina Grima et al., 2004).

Las técnicas utilizadas para la recuperación de la biomasa algar son:

- **Sedimentación:** Es el método más simple aunque muy influenciado por la capacidad de decantación que tenga la microalga. La principal desventaja es

que los decantadores usados necesitan superficies adicionales además de generar una biomasa con un contenido en humedad alto. Es un proceso lento que puede modificar las características de la biomasa generada (Makareviciene et al., 2013).

- **Floculación:** La biomasa se recupera formando agregados por la adición al cultivo de un polímero. Permite tratar grandes volúmenes, siendo una de las técnicas más usadas. La formación de coloides viene determinada por la adición de algún floculante que se une a las cargas superficiales negativas de las células. Pueden ser orgánicos (biodegradables y poco tóxicos como el quitosano, almidón...) o inorgánicos (sales de Fe^{3+} , Al^{3+}). También es corriente el uso de floculantes sintéticos como la poliacrilamida. Además, la floculación puede ser inducida por el cambio de pH del cultivo (autofloculación), por la presencia de bacterias u otras especies algales en el cultivo (biofloculación) o mediante una corriente eléctrica (electrofloculación) (Fon Sing et al., 2011; Banerjee et al., 2012).
- **Separación magnética con nanopartículas férricas:** Basada en la adición de nanopartículas de Fe que quedan embebidas en la superficie celular; posteriormente se somete el cultivo a un campo magnético donde se recupera toda la biomasa. Puede considerarse un tipo especial de floculación.
- **Ultrasónica:** formación de agregados inducida por la aplicación de ultrasonidos (Bosma et al., 2003).
- **Flotación o DAF:** (del inglés Dissolved Air Flotation). Consiste en la inyección a presión de una corriente de aire en el cultivo favoreciendo la formación de microburbujas en el fondo del reactor. Éstas en su recorrido hacia la parte superior del reactor arrastran la biomasa adherida a ellas. Algunas especies algales tienen una flotabilidad natural debido a la formación de pequeñas burbujas de oxígeno o a un contenido alto en lípidos (Makareviciene et al., 2013).
- **Fraccionamiento por espuma:** Es una variante de la flotación. Se adiciona al cultivo reactivos químicos que confieren un carácter hidrofóbico a la superficie de las células. Se inyecta, a continuación una corriente de aire comprimido en el cultivo que forma espuma (red de burbujas hidrofóbicas) donde quedan adsorbidas las células (Coward et al., 2013).
- **Centrifugación:** Se trata de un proceso limpio y que puede realizarse de forma continua. Existen diferentes diseños de centrifugas industriales siendo objeto de una intensa investigación. Es el proceso más eficiente aunque sus costes de inversión y operación son altos (Acién Fernández et al., 2012).
- **Filtración:** Se han utilizado satisfactoriamente muchos tipos de filtros. La fuerza a aplicar para realizar el filtrado, y por tanto, el consumo energético, aumenta conforme disminuye el tamaño de poro. La microfiltración (0,1-10 μm) es el método más adecuado para todas las estirpes. Puede afectarse negativamente

por la presencia de materia orgánica extracelular. Los equipos de filtrado están ampliamente desarrollados y utilizados en la industria en multitud de procesos.

OBJETIVOS

La finalidad del proyecto es evaluar la viabilidad de sistemas de cianobacterias y/o microalgas para la producción de materia orgánica rica en carbohidratos, acoplada a la eliminación del CO₂ presente en mezclas gaseosas procedentes de emisiones industriales. Para ello, deben seleccionarse las cianobacterias y/o microalgas más idóneas, así como profundizar en el manejo de su cultivo y en el conocimiento de factores determinantes que maximicen la producción de biomasa y compuestos orgánicos de interés energético.

Para alcanzar este objetivo es necesario acometer las siguientes tareas:

- Preseleccionar estirpes de microalgas y cianobacterias con elevada tasa de crecimiento y fijación de CO₂. Evaluar estas estirpes en diferentes regímenes de cultivo para verificar dichas bondades y seleccionar un organismo para su caracterización posterior.
- Con la estirpe seleccionada, estudiar de forma exhaustiva las condiciones de cultivo que permitan maximizar la fijación fotosintética de CO₂ y su acumulación en forma de carbohidratos. Los resultados deben permitir modelizar el crecimiento de la estirpe seleccionada con vistas a evaluar el comportamiento en cultivos al exterior.
- Proceder a una completa caracterización bioquímica de la biomasa generada en las experiencias anteriores, con especial atención a carbohidratos fermentables a etanol.
- Evaluar la capacidad de crecimiento de la estirpe seleccionada usando gases de combustión con alto porcentaje de CO₂ y COV (compuesto orgánicos volátiles).
- Verificar la viabilidad de la estirpe seleccionada en cultivos a la intemperie empleando diferentes biorreactores y en diferentes condiciones ambientales optimizando su operación para maximizar de la tasa de fijación de CO₂ y la productividad en carbohidratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Para abordar los objetivos propuestos en este trabajo, se preseleccionaron once estirpes entre cianobacterias y microalgas. (Tabla 2 y Figuras 12 y 13)

Tabla 2. Relación de especies para este estudio y referencia bibliográfica que justifica su elección.

Cianobacterias	Referencias
<i>Anabaena</i> PCC 7119	(Vargas et al., 1998)
<i>Anabaena</i> PCC 7120	(Morales et al., 2002)
<i>Anabaena</i> PCC 7937	(Berberoğlu et al., 2008)
<i>Nostoc</i> PCC 9202	(Moreno et al., 1995)
<i>Nostoc punctiforme</i>	(Ruffing, 2011)
<i>Spirulina</i> PCC 6313	(de Morais y Costa, 2007)
Microalgas	Referencias
<i>Chlorococcum</i> sp.	(Wang et al., 2008)
<i>Chlorella</i> sp	Aislada en el grupo
<i>Chlorella vulgaris</i>	(Keffer y Kleinheinz, 2002)
<i>Porphyridium purpureum</i>	(Fleck-Schneider et al., 2007)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	(Carver et al., 2011)

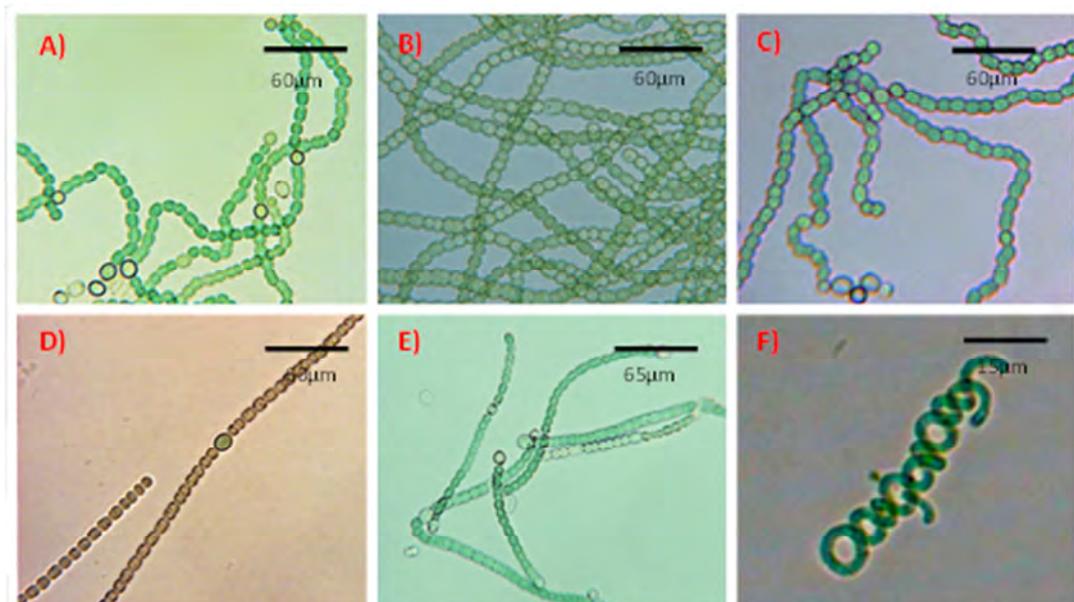


Figura 12. Fotografías al MO de las cianobacterias preseleccionadas: A) *Anabaena* PCC7119, B) *Anabaena* PCC7120, C) *Anabaena variabilis* PCC7937, D) *Nostoc* PCC 9202, E) *Nostoc punctiforme*, F) *Spirulina* PCC6313

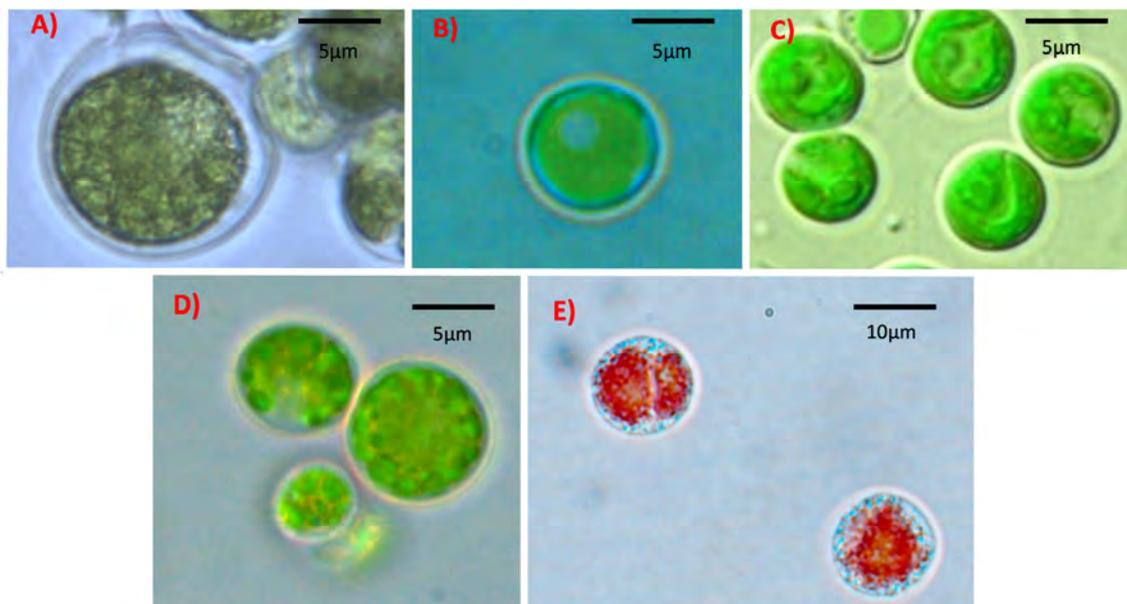


Figura 13. Fotografías al MO de las estirpes de microalgas preseleccionadas: A) *Chlorococcum* sp., B) *Chlorella* sp., C) *Chlorella vulgaris*, D) *Scenedesmus vacuolatus*, E) *Porphyridium purpureum*

Medios de cultivo

Se emplearon los medios de cultivo descritos en la bibliografía para cada estirpe. Así, para las microalgas de agua dulce se utilizó el medio Arnon suplementado con 20mM NaNO_3 (Arnon, 1974). En el caso *Chlorella* sp., al haber sido aislada en un ambiente salino, este medio se suplementó con 85,5mM NaCl. Para *Porphyridium purpureum*, por su origen marino, se utilizó el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962). Para las cianobacterias fijadoras de N_2 se usó el medio BG₁₁ (Rippka, 1979) sin fuente de nitrógeno añadida, mientras que *Spirulina* PCC 6313 se cultivó en medio Zarrouk suplementado con 29mM NaNO_3 (Zarrouk, 1966).

Cada estirpe se conservó en esterilidad realizando resiembras cada 4 semanas en placas de agar. Este medio sólido se preparó suplementando cada medio líquido anteriormente descrito con Bactoagar-Difco al 1,5% (p/v).

Cultivo estanco en cámara climatizada

Las estirpes se cultivaron fotoautotróficamente en condiciones axénicas en cámara climatizada a 25 o 30°C según la naturaleza de cada estirpe, empleando tubos cilíndricos de base cónica de 4,5 cm de diámetro y 200ml de capacidad, conteniendo un volumen de cultivo de 150ml. Los tubos cilíndricos se taparon con algodón hidrófobo atravesado por una varilla de vidrio hueca cuyo extremo inferior alcanzaba el fondo del recipiente. Por su extremo superior se prolongaba con la unión a una tubería de silicona por la que se suministraba la mezcla gaseosa compuesta por aire

suplementado con CO₂ al 1% (v/v) haciéndose pasar esta corriente a través de un filtro *Millipore* 0,2 μm de tamaño de poro para mantener la esterilidad. Estos cultivos se iluminaron con una batería de tubos fluorescentes (*daylight-20W-Philips*) proporcionando una irradiancia incidente de 135 μE m⁻² s⁻¹ aproximadamente (Figura 14).



Figura 14. Cultivo estanco en cámara climatizada

Cultivo continuo en fotoquimiostato

Para el cultivo continuo en laboratorio se utilizaron fotoquimiostatos tipo columna de burbujeo con un volumen de 1,8 l de capacidad. El diseño de este tipo de reactor se detalla en la Figuras 15 y 16. Estaba provisto de una doble pared, formando una camisa de termostatación por la que circulaba agua proveniente de un baño que mantenía la temperatura del cultivo constante. El suministro de aire y de CO₂ se realizaba por la base del reactor, a través de una tubería de silicona de 5mm de diámetro interno que atravesaba el tapón. El caudal de aire se regulaba mediante rotámetro, adicionándose 1 l aire l cultivo⁻¹min⁻¹ de forma constante para asegurar una homogeneización completa del cultivo. Para el control de pH, el reactor disponía de un electrodo combinado de pH (Crison, modelo 3100/225), conectado a un medidor-controlador de pH (Crison, modelo pH 217/220-R1). El controlador actuaba sobre una electroválvula de manera que, cuando el pH superaba el valor de consigna, dicha electroválvula se abría permitiendo el paso de CO₂ puro junto a la corriente de aire. Una vez recuperado el pH de consigna, la electroválvula se cerraba, quedando el medio de cultivo en agitación exclusivamente por la entrada de la corriente de aire. Para operar en modo continuo disponía de una salida por rebosadero mientras que por la parte superior se cerraba con un tapón provisto de unas varillas de vidrio de

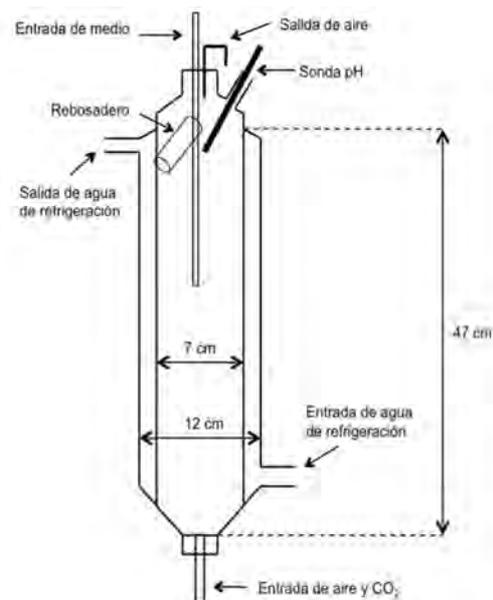


Figura 15. Esquema de fotoquimiostato empleado en los cultivos continuos

4mm de diámetro interno que alcanzaban la parte media del reactor, permitiendo el aporte de medio fresco. Dicho medio de cultivo, esterilizado en autoclave, se inyectaba en el biorreactor al flujo establecido para cada experimento de manera continuada durante el periodo de iluminación, a través de una bomba peristáltica (P-3, *Pharmacia*). El sistema se iluminaba durante 12 horas mediante tubos fluorescentes de potencia regulable mediante reostatos, controlados por una aplicación informática desarrollada por el Dpto. de Ingeniería Química de la Universidad de Almería. Mediante esta aplicación se modificaba la irradiancia desde 0 hasta $3000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, simulando un ciclo circadiano. Cada reactor estaba iluminado por 6 tubos fluorescentes (Osram, FQ-24W/840 HO), rodeándolo completamente, asegurando una iluminación homogénea.

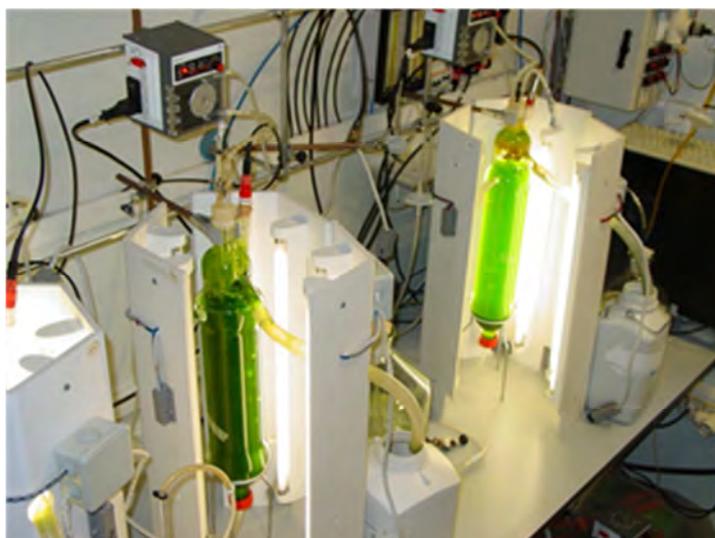


Figura 16. Instalación de fotoquimiostato

Cultivo a la intemperie

Los biorreactores utilizados en este trabajo estaban ubicados en el Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja en Sevilla (37°20'N, 6°0'O).

Estanque abierto

Fabricado con poliéster y fibra de vidrio, de dimensiones 1,25m x 0,8m, se operaba a una profundidad de cultivo de 10cm, correspondiendo a un volumen de 100 l. A lo largo de su eje longitudinal estaba dividido por un tabique vertical, de 0,75m de longitud, formando dos vías de circulación. Así mismo, en las proximidades de los extremos, se disponían dos pequeños tabiques verticales curvos del mismo material que facilitaban la circulación y homogenización del cultivo. La agitación de la suspensión celular se conseguía mediante un motor que hacía girar de manera regulable tres paletas de 28cm x 32cm, dispuestas en ángulos de 120° entre sí sumergidas parcialmente en el cultivo, asegurando la homogenización y un continuo desplazamiento de la suspensión celular a $0,3 \text{ m s}^{-1}$ (16 r.p.m.) (Figura 17). El control de pH se hacía a través de la inyección de CO_2 en burbujas de pequeño tamaño a través de un tubo poroso situado en el fondo del estanque. Un electrodo de pH (HI 2910, *Hanna Instruments*) unido a un controlador-medidor (HI 931700, *Hanna Instruments*) permitía la regulación del pH activando, mediante una electroválvula, la entrada de CO_2 cuando el pH superaba el valor de consigna. Este tipo de reactor no disponía de control de temperatura. Un sensor de temperatura (TinyTag TGP-4020) permitió el registro de temperatura durante la operación de estos sistemas.

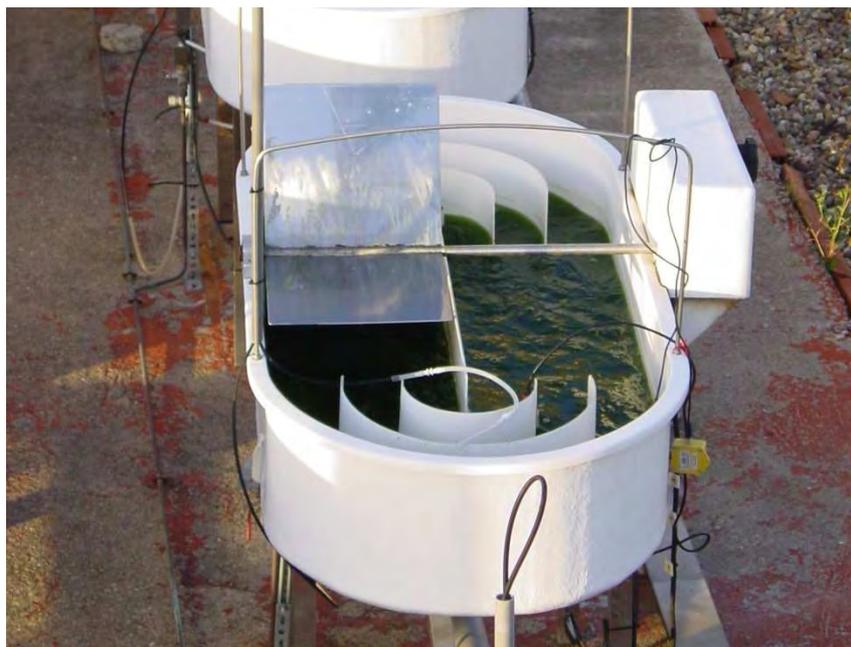


Figura 17. Cultivo en estanque de 1m^2

Los cultivos se operaron en régimen semicontinuo, renovándose parcialmente la suspensión celular con medio fresco a fin de mantener el cultivo a la densidad celular inicial establecida en cada ciclo de dilución. Previo a la toma de muestras, el volumen del reactor se completaba hasta 100l para compensar las pérdidas por evaporación.

Reactor plano vertical (RPV)

Compuesto por dos estructuras rígidas de hierro que sustentaban una bolsa de plástico translúcido (200 μm de espesor y 55% transmitancia en el espectro fotosintéticamente activo) que contenía el cultivo (Sierra et al., 2008). Las dimensiones eran 1,5m de alto, 2,5m de largo, con una separación entre las dos estructuras (ancho) de 5cm (Figura 18).

El volumen de cultivo en este reactor era de 300l, ocupando una superficie total de $2,5\text{m}^2$, considerando que, en la distribución global de un campo de reactores de este tipo debería existir una separación de 1 m entre cada fila de reactores. En la base de la bolsa se colocaba un tubo de metal perforado cada 10cm, a través del cual se hacía pasar una corriente de aire ($8,3 \text{ l aire l}^{-1} \text{ cultivo h}^{-1}$) para mantener el cultivo en suspensión. Por este mismo tubo perforado se inyectaba CO_2 a demanda para mantener el pH de consigna del cultivo. La suspensión celular se atemperaba mediante un intercambiador de acero en forma de serpentín, de 9m de longitud y 25mm de diámetro, ubicado dentro de la bolsa, a 50cm de la base de la misma. A través de este sistema, se hacía circular agua caliente o fría manteniendo la temperatura del cultivo



Figura 18. Cultivo en reactor plano vertical

dentro del intervalo marcado como consigna con una desviación de $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Al igual que en los estanques, previo a la recogida de muestras, el reactor se completaba con agua para recuperar las pérdidas por evaporación. Estos reactores se operaban en semicontinuo de forma similar a la descrita para los estanques abiertos.

Métodos analíticos

Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa se determinó mediante peso seco en el caso de microalgas y valorando el carbono orgánico total (TOC), tanto para microalgas como para cianobacterias. Así mismo, para las estirpes finalmente seleccionadas se realizó una curva de calibración que relacionase turbidez medida a una longitud de onda de 750nm con el peso seco.

Determinación de biomasa por peso seco

Se filtró un determinado volumen de cultivo (entre 5-10ml) a través de un filtro de microfibra de vidrio Whatman GF/C de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro, previamente secado en estufa (mínimo 24 horas y atemperado en desecador) y tarado. Se lavaron las células retenidas con un volumen igual de formiato amónico al 1% para eliminar las sales del medio. Los filtros con células se secaron en estufa a 80°C durante 24-48 horas, se atemperaron y se pesaron en una balanza de precisión. El peso seco de las células se determinó por diferencia de pesada y se refirió al volumen filtrado (gramos de biomasa por litro de cultivo).

Determinación de biomasa por carbono orgánico total (TOC)

La biomasa presente en cultivos de microalgas y cianobacterias se estimó a partir del carbono orgánico total utilizando un TOC Analyzer (Shimadzu). En primer lugar se medía el TOC al cultivo completo y se restaba el TOC medido en el medio tras retirar las células por centrifugación estimando así el TOC presente en la biomasa. A partir del contenido en carbono de la biomasa (% de C) medido por análisis elemental se calculaba la biomasa presente en la muestra. Se realizó un análisis de regresión siguiendo un modelo lineal para establecer la correlación entre la productividad de biomasa medida a partir de carbono orgánico total (TOC) y la medida a partir de peso seco. El ajuste de estos datos mostró una correlación lineal ($r^2=0,9$) constante e indicativa de la correcta medida de la biomasa determinada a través del TOC (Figura 19).

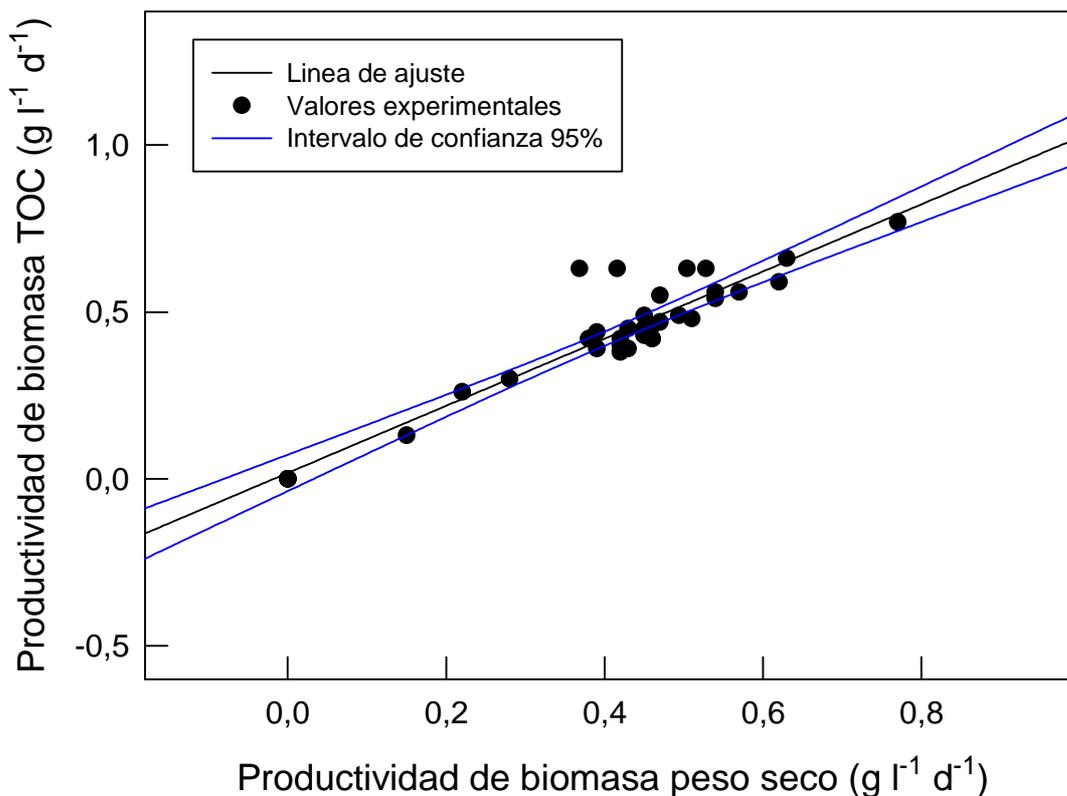


Figura 19. Correlación entre productividad de biomasa determinada por peso seco y por TOC

Determinación de la biomasa por turbidez del cultivo

Para las estirpes *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella vulgaris* se relacionó la turbidez presente en el cultivo a una determinada longitud de onda con el peso seco medido por filtración. Atendiendo al espectro de absorción presentado en el capítulo resultados (Figuras 25 y 50 respectivamente), la λ seleccionada fue 750nm, donde no existía interferencia con los pigmentos fotosintéticos. Las ecuaciones resultantes fueron ($r^2=0,99$):

- *Scenedesmus vacuolatus*: Biomasa ($g\ l^{-1}$)= $0,4013 \cdot DO_{750nm} - 0,0357$
- *Chlorella vulgaris*: Biomasa ($g\ l^{-1}$)= $0,1749 \cdot DO_{750nm} + 0,0014$

Determinación del carbono orgánico total (TOC)

Para determinar el carbono orgánico total de las muestras (*Total Organic Carbon, TOC*) se empleó un analizador de carbono orgánico elemental TOC-V_{CSH} (Shimadzu) con el módulo de inyección automático ASI-V (Shimadzu). Las muestras se

diluyeron en agua ultrapura hasta una concentración apropiada dentro del rango de sensibilidad del analizador. Durante el análisis, las muestras fueron agitadas mediante un agitador magnético para evitar la sedimentación. El contenido en carbono orgánico de la muestra se calculó por la diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico presente en la misma.

Determinación del calor de combustión

Se utilizó un microcalorímetro (PARR 6525). Muestras liofilizadas y prensadas con un peso aproximado de 0,2 g se colocaban en una bomba de inyección con alta presión y rica en oxígeno (30 atm). Esta cámara se sumergía en recipiente con agua destilada (0,4l) a temperatura ambiente y constante. A través de la cámara de inyección se hacía pasar una corriente eléctrica de alto voltaje que, en presencia de la atmósfera rica en oxígeno, quemaba la muestra. La energía liberada en esta combustión incrementaba la temperatura del agua contenida en el recipiente. La diferencia entre la temperatura del agua antes y después de la incineración, permitía estimar la energía contenida en la muestra expresándola en KJ g^{-1} .

Determinación de viscosidad

Se empleó un viscosímetro, *Visco Star Plus L*. Muestras de 18ml sin tratamiento de homogenización se colocaban en el contenedor adaptador para baja viscosidad (LCP) y se realizaban las determinaciones de viscosidad ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) y esfuerzo de cizalla (N m^{-2}) incrementando la velocidad de giro dentro del rango de fiabilidad (torque). La relación existente entre velocidad y esfuerzo de cizalla era una curva que expresaba la viscosidad de las muestras.

Liofilización de la biomasa

Para las determinaciones analíticas se utilizó biomasa liofilizada. Se recogió un volumen de cultivo por centrifugación y se lavó varias veces con formiato amónico al 1% para eliminar el exceso de sales. El sedimento se congeló en nitrógeno líquido y se deshidrató en el liofilizador (Virtis Sentry), durante al menos 2 días.

Determinación de componentes celulares

Obtención de extractos para la determinación de proteínas y carbohidratos

Se pesaron entre 3 y 6mg de biomasa liofilizada y se resuspendió en un volumen de NaOH (1M) para obtener una relación de 0,8g de biomasa seca por ml de NaOH. Esta mezcla se calentó a 70°C una hora y se dejó enfriar para la determinación de componentes celulares.

Determinación de proteínas

Para determinar el contenido en proteínas en los extractos liofilizados se utilizó el método de Lowry modificado por Herbert (Lowry et al., 1951; Herbert et al., 1971).

Se tomaron 0,1ml de muestra (0,1ml de NaOH 1M para el blanco) y se diluyeron con 0,3ml de NaOH (1M) y 0,4ml de agua destilada. Se añadieron 2ml de solución A, agitando y dejando reposar 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 0,4ml de la solución B y se volvió a agitar y dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada muestra a 750nm. El valor de la concentración de proteínas se determinó a partir de una recta patrón realizada con soluciones de concentración conocida de seroalbúmina bovina (BSA) 0,2 mg ml⁻¹ y tratados de igual forma que las muestras problema.

- Reactivo A: Debe ser preparado inmediatamente antes de usarse. Se mezclaron 50ml de Na₂CO₃ al 5% (p/v) con 2,4 ml de una solución 1:1 de tartrato sódico potásico al 2% (p/v) y CuSO₄·5H₂O 1% (p/v).
- Reactivo B: Se diluyó el reactivo comercial Folin-Ciocalteu con agua destilada (1:1).

Determinación de carbohidratos

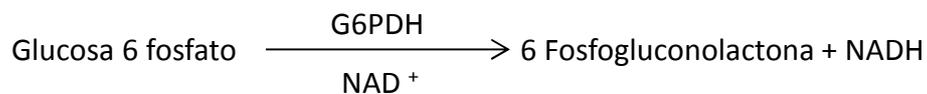
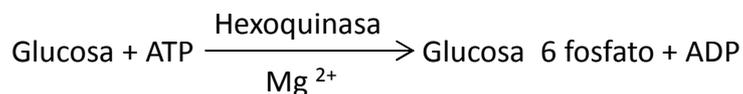
Estas determinaciones se realizaron según el método de Dubois (Dubois et al., 1956), de acuerdo con la técnica descrita por Kochert (Kochert, 1978).

Se tomaron 0,1ml de muestra y se añadieron 0,9ml de agua destilada y a continuación 25µl de la solución de fenol. Tras agitar, se adicionaron 2,5ml de ácido sulfúrico (98% v/v). Se dejó reaccionar durante 30minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 480nm, frente a un blanco con 0,1ml de NaOH y 0,9ml de agua destilada tratado de la misma forma. La cantidad de carbohidratos en las muestras analizadas se determinó utilizando como referencia una recta de calibrado obtenida a partir de diferentes diluciones de glucosa (0,5mg ml⁻¹) tratadas de igual manera que las muestras problema.

Determinación de almidón

Para determinar el contenido en almidón de los cultivos se adaptó el protocolo para almidón en hojas de arroz (Lin et al., 1988) siguiendo el método de rotura de biomasa de microalgas propuesto por Doucha (Doucha y Livansky, 2008).

Las muestras de aproximadamente 5mg de biomasa liofilizada se resuspendieron en 1ml de una solución de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) con 1ml de perlitas de vidrio de 0,5 μ m de diámetro. La rotura se realizó en un molino Bead-Beater™ con dos pases de 2 minutos a máxima potencia. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se realizaron lavados de las muestras con cloroformo:metanol tantas veces como fue necesario hasta obtener un sedimento blanco. De esta manera se eliminaron de la muestra pigmentos y sustancias lipídicas que interferían en la determinación. Los gránulos de almidón presentes en el pellet se solubilizaron alcalinamente (KOH 0,2M; 100°C; 30minutos) reajustando, posteriormente, el pH a 5 mediante la adición de ácido acético (1N). Gracias a la acción conjunta de α -amilasas y amiloglucosidasas (0,2U μ l⁻¹ CH₃COONa 0,1M pH 4,5 y 0,03U μ l⁻¹ CH₃COONa 0,1M pH 4,5 respectivamente) se liberaron los residuos de glucosa. La valorización de esta glucosa se realizó mediante la acción secuencial de dos actividades enzimáticas: hexoquinasa (1U μ l⁻¹ HEPES 100mM pH 7,7), que fosforilaba la glucosa, y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (2,5U μ l⁻¹ HEPES 100mM pH 7,7) que formaba poder reductor a partir de NAD⁺ y la glucosa fosforilada de la reacción anterior. Según la estequiometría del ensayo, un mol de glucosa generaba un mol de NADH.



El valor registrado de absorbancia ($\lambda=340\text{nm}$) correspondía a la formación de NADH, y por lo tanto, al contenido en glucosa y almidón. Este contenido se refirió a una recta patrón con diferentes diluciones de almidón 1mg ml⁻¹ tratadas de la misma forma que las muestras problema.

Extracción y determinación de lípidos

Se realizó una extracción de lípidos diferente según la estirpe. Para cianobacterias, muestras de biomasa liofilizada (20mg aproximadamente) resuspendidas en 1ml de metanol se calentaron a 70°C durante 1hora. Este extracto se

centrifugó y se recuperó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió y lavó con metanol tantas veces como fue necesario hasta dejar el pellet completamente azul. En el caso de microalgas, se llevó a cabo el mismo proceso de rotura y extracción utilizado para la determinación de almidón, pero recuperando los sobrenadantes hasta dejar el pellet blanco.

El método de cuantificación de lípidos totales se basó en una adaptación del método gravimétrico descrito por Kochert (Kochert, 1978). A los sobrenadantes recogidos tras los sucesivos lavados y depositados en tubos de centrifuga de 10ml, se les añadieron 300µl de $MgCl_2$ 0,5% (p/v) y 3ml de HCl 1N. Después de una centrifugación en la que se separaron las proteínas, se recogió la fase inferior de color parduzco y se depositó en viales de vidrio previamente lavados con hexano y tarados. Tras secar el contenido de los viales en una campana de vacío, se determinó la cantidad de lípidos por diferencias de pesadas y refiriéndolos al peso inicial de la muestra liofilizada.

Determinación de la composición elemental

Para la determinación de la composición elemental se utilizó un Analizador Elemental *CHNS-O THERMO, modelo FLASH-EA 1112 Series*, conectado a un integrador. Para determinar la composición elemental de las células se tomaron 10 ml de cultivo y se centrifugaron a 3000g durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el sedimento con una solución de formiato amónico al 1%. Se centrifugó de nuevo y se guardó el sedimento en la estufa a 80°C durante al menos 48 h. A partir de estas muestras secas y atemperadas, se pesaron alícuotas en cápsulas previamente taradas (de estaño para C, H, N, y de plata para O). La cantidad pesada siempre estuvo comprendida entre 500 y 1500 µg. Se utilizaron como patrones: sulfanilamida, L-cistina, D, L-metionina y BBOT (1,5 Bis (5-tert-butil-benzoxazol-2-il) tiofeno). Los contenidos en N, C, H y O de las muestras analizadas se calcularon por referencia a los patrones. Todos los análisis se efectuaron, al menos, por duplicado.

Medidas de irradiancia

La irradiancia incidente sobre los cultivos en fotoquimostatos se cuantificó con un medidor de radiación escalar QSL-100 de tipo 4 (*Biospherical Instruments Inc.*) que integra la radiación procedente de todas las direcciones. La irradiancia incidente se determinó en agua.

La irradiancia solar que incidió sobre los cultivos al exterior se cuantificó usando una estación meteorológica Datalogger IQ3000 (*Quimisur*). Compuesta por un sensor (PQS1 PAR Sensor, *Kipp & Zonen*) que determinaba la radiación fotosintéticamente activa (PAR) y otro sensor (IQ-BUS) que medía la radiación total.

Medidas de demanda de CO₂

Instalaciones Inabensa S.A. desarrolló un método para determinar la demanda de dióxido de carbono por parte de los cultivos en fotoquimiostato. El método se basó en el desarrollo de un software que cuantificaba el tiempo de apertura de las electroválvulas que permitían el paso de CO₂ cuando el pH del cultivo superaba el punto de consigna. Esta demanda estaba determinada por el crecimiento del cultivo. Mediante una estandarización de la temperatura y la presión de la línea de CO₂ (fracción molar 100%); y suponiendo la densidad del aire y del CO₂ constantes (1,2 y 1,3 kg m⁻³, respectivamente) a una temperatura ambiente constante (20°C) se pudo calcular el caudal molar de gas (mmol CO₂ s⁻¹) que pasaba a través de la electroválvula en los periodos de apertura.

Mediante la tasa de fijación de CO₂ y los moles del mismo que se inyectaron en el cultivo, se pudo evaluar la eficiencia en la asimilación fotosintética de CO₂ por parte de los cultivos (Ecuación 1)

$$\text{Eficiencia asimilación CO}_2 (\%) = \frac{\text{Tasa de fijación de CO}_2 (\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1})}{\text{Demanda de CO}_2 (\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1})} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Cálculos

Velocidad específica de crecimiento

En cultivos estancos, la velocidad específica de crecimiento (μ) y expresada en d⁻¹ se determinó durante la fase exponencial, según la siguiente Ecuación:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde x_1 y x_2 representan la densidad celular a tiempos t_1 y t_2 .

Productividad en cultivo continuo

La productividad de biomasa (g l⁻¹ d⁻¹) en cultivos en régimen continuo se determinó según la Ecuación 3. Los resultados presentados en este trabajo corresponden a los valores promedio de al menos 5 determinaciones en cada estado estacionario.

$$\text{Productividad biomasa (g l}^{-1}\text{ d}^{-1}) = C_b \text{ (g l}^{-1}) \cdot D \text{ (d}^{-1}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde C_b es la densidad celular; D es la tasa de dilución impuesta al cultivo (d^{-1}).

Tasa de fijación de CO_2

La tasa de fijación fotosintética por parte de los cultivos se determinó empleando la Ecuación 4. Cada mol de CO_2 contiene 12 gramos de C (44/12), por tanto, la estequiometría de la reacción de fijación de este gas indica que, por cada gramo de carbono asimilado, se retira de la atmósfera 3,66 g de CO_2 :

$$\text{Tasa de fijación de } \text{CO}_2 \text{ (g l}^{-1}\text{ d}^{-1}) = 3,66 \cdot [C_{\text{orgánico}}] \text{ (g l}^{-1}) \cdot D \text{ (d}^{-1}) \quad \text{Ecuación 4}$$

Productividad de cultivo semicontinuo

La productividad de biomasa de un cultivo semicontinuo se expresa como el peso seco de la biomasa recogida por unidad de superficie o volumen, y por unidad de tiempo. Para su determinación se utilizó la Ecuación 5. C_b es la concentración de biomasa del reactor en el momento de diluir (g l^{-1}) multiplicada por el volumen de dilución (l), y dividido por el periodo de dilución (días) y la superficie total ocupada por el reactor (m^2) o el volumen del mismo (l):

$$\text{Productividad de biomasa (g m}^{-2}\text{ d}^{-1}) = \frac{C_b \text{ (g l}^{-1}) \cdot V \text{ (l)}}{S \text{ (m}^2) \cdot t \text{ (d)}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética (R) medida en g MJ^{-1} , es una medida de la capacidad de conversión de la energía solar en energía química, esto es, biomasa. Para su determinación se utilizó la siguiente Ecuación:

$$R \text{ (\%)} = \frac{\text{Productividad biomasa (g m}^{-2}\text{ d}^{-1}) \cdot \text{Calor combustión (KJ g}^{-1})}{\text{Irradiancia (MJ m}^{-2}\text{ d}^{-1})}$$

Ecuación 6

RESULTADOS

VERIFICACIÓN EN CULTIVO ESTANCO DEL POTENCIAL DE LAS ESPECIES PRESELECCIONADAS

Para verificar el potencial de cada especie preseleccionada para el fin propuesto se adoptaron unas condiciones de cultivo uniformes, que permitieran la comparación entre ellas y la elección final del organismo más idóneo. Estos estudios se realizaron en régimen estanco en las condiciones especificadas en material y métodos, ofreciendo una primera aproximación del potencial máximo de cada cianobacteria/microalga para generar biomasa, y por tanto, para eliminar CO₂.

Se siguió la evolución de la biomasa de los cultivos durante los 8 días que se mantuvieron las experiencias. Al final de este periodo se recogió la biomasa para su posterior caracterización. Se analizó la composición elemental y bioquímica, así como, el calor de combustión de dicha biomasa. La valoración diaria de la biomasa sirvió para determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) durante la fase exponencial de los cultivos. Además permitió una estimación de la tasa de fijación de CO₂ durante este periodo (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de crecimiento (μ) y de fijación de CO₂ (fase exponencial) y acumulación de biomasa (final fase estacionaria) de las estirpes ensayadas en las condiciones básicas empleadas (ver Material y Métodos)

Estirpe	μ (d ⁻¹)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Biomasa acumulada (g l ⁻¹)
<i>Anabaena</i> PCC 7119	0,6±0,1	0,4±0,1	1,2±0,2
<i>Anabaena</i> PCC 7120	0,7±0,1	0,4±0,0	1,4±0,2
<i>Anabaena</i> PCC 7937	0,7±0,1	0,4±0,1	2,1±0,3
<i>Chlorococum</i> sp.	0,7±0,0	0,2±0,0	2,9±0,1
<i>Chlorella</i> sp.	0,6±0,0	0,6±0,0	2,6±0,5
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,8±0,0	1,2±0,0	6,6±0,1
<i>Nostoc</i> PCC 9202	0,3±0,0	0,5±0,1	3,1±0,4
<i>Nostoc punctiforme</i>	0,5±0,0	0,5±0,0	3,0±0,0
<i>Porphyridium purpureum</i>	0,5±0,0	0,8±0,0	1,3±0,1
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	0,7±0,0	0,8±0,0	8,3±0,0
<i>Spirulina</i> PCC 6313	0,8±0,0	0,7±0,0	2,9±0,1

Las estirpes que presentaron la tasa de crecimiento más elevada fueron *Chlorella vulgaris* y *Spirulina* PCC 6313 ($\mu=0,8$ d⁻¹). *Chlorella vulgaris* exhibió la capacidad de fijación de CO₂ más alta durante la fase exponencial del crecimiento del cultivo (1,2 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹), seguida de *Scenedesmus vacuolatus* y *Porphyridium purpureum* (0,8 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹ para ambas estirpes). En cuanto al comportamiento en fase estacionaria, al cabo de 8 días de experimentación, las microalgas acumulaban

más biomasa que las cianobacterias. Destacaban *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus vacuolatus*, con 6,6 y 8,3 g biomasa l⁻¹ respectivamente.

Paralelamente, se determinó el contenido en carbohidratos totales al final de las fases exponencial y estacionaria (Tabla 4). Hay que decir que se trató de una medida de carbohidratos totales en el cultivo, tanto los contenidos en la biomasa como los excretados al medio. *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus vacuolatus* acumulaban mayor cantidad de carbohidratos que el resto de estirpes ensayadas en fase estacionaria.

Tabla 4. Contenido en carbohidratos totales en cultivo estanco al final de la fase exponencial y estacionaria.

Estirpe	Carbohidratos totales (g l ⁻¹)	
	Fase exponencial	Fase estacionaria
<i>Anabaena PCC7119</i>	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0
<i>Anabaena PCC7120</i>	0,3 ± 0,0	0,9 ± 0,5
<i>Anabaena PCC 7937</i>	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,1
<i>Chlorococcum sp.</i>	0,3 ± 0,0	1,8 ± 0,2
<i>Chlorella sp.</i>	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,2 ± 0,1	3,9 ± 0,2
<i>Nostoc PCC 9202</i>	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,2
<i>Nostoc punctiforme</i>	0,7 ± 0,0	2,1 ± 0,1
<i>Porphyridium purpureum</i>	1,8 ± 0,1	3 ± 0,2
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	0,9 ± 0,0	5,6 ± 0,1
<i>Spirulina PCC 6313</i>	0,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0

Los cultivos más viscosos fueron *Nostoc PCC 9202*, *Nostoc punctiforme* y *Porphyridium purpureum* (Tabla 5).

Tabla 5. Viscosidad (100rpm) de los cultivos al final de la fase estacionaria.

Estirpe	Viscosidad (mPa s ⁻¹)
<i>Anabaena PCC 7119</i>	1,3
<i>Anabaena PCC 7120</i>	1,4
<i>Anabaena PCC 7937</i>	4,3
<i>Chlorococcum sp.</i>	1,4
<i>Chlorella sp.</i>	1,3
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,5
<i>Nostoc PCC 9202</i>	fuera de rango
<i>Nostoc punctiforme</i>	fuera de rango
<i>Porphyridium purpureum</i>	5
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	1,3
<i>Spirulina PCC 6313</i>	2,3

Para caracterizar la biomasa generada en estos cultivos en estanco se analizó el contenido en carbohidratos, lípidos y proteínas en la biomasa recogida al final de la fase estacionaria, así como la relación C/N. Para realizar los balances carbono/energía, se determinó el calor de combustión de la biomasa recogida y liofilizada de cada uno de los cultivos, obteniéndose valores próximos a 20 kJ g⁻¹ para casi todas las especies en estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Composición bioquímica, calor de combustión y relación C/N para cada estirpe tras 8 días de cultivo en régimen estanco

Estirpe	(%) Biomasa			Calor de Combustión (KJ g ⁻¹)	C/N
	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos		
<i>Anabaena PCC7119</i>	52,8±3,5	23,5±1,3	9,2±0,3	17,7±3,1	5
<i>Anabaena PCC7120</i>	41,4±0,9	25,7±6,8	15,4±3,8	16,6±0,4	6
<i>Anabaena PCC 7937</i>	51,1±1,6	21,1±0,9	10,5±0,2	18,9±0,5	5
<i>Chlorococcum sp.</i>	17,2±0,7	37,5±2,5	28,4±1,8	20,9±1,5	18
<i>Chlorella sp.</i>	35,5±1,9	31,3±1,1	19,3±4,3	18,6±3,0	10
<i>Chlorella vulgaris</i>	25,4±1,1	39,1±0,7	24,1±1,5	23,1±2,4	17
<i>Nostoc PCC 9202</i>	47,2±0,0	25,0±0,6	16,2±0,4	13,9±5,9	4
<i>Nostoc punctiforme</i>	46,0±2,7	32,4±2,7	11,6±1,3	24,2±0,0	5
<i>Porphyridium purpureum</i>	20,3±3,1	57,9±1,7	4,1±0,3	n.d.	—
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	17,8±0,9	52,3±0,3	15,8±2,2	21,7±0,6	19
<i>Spirulina PCC 6313</i>	39,5±1,9	30,1±0,3	9,8±0,3	16,6±1,9	5

VERIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS ESPECIES PRESELECCIONADAS EN CULTIVO CONTINUO

Los estudios en régimen estanco dan idea del potencial máximo de cada microalga para acumular biomasa, así como para fijar CO₂. La capacidad real sólo se puede estimar a partir de cultivos operados en régimen continuo. Con el objetivo de unificar el estudio, las condiciones de operación para esta evaluación en continuo se eligieron de acuerdo con los requerimientos que de forma general presentan cianobacterias y microalgas, no siendo necesariamente las óptimas para cada estirpe. Así, los fotoquimiostatos se operaron a tasas de dilución de 0,26 y 0,66 d⁻¹ para microalgas y cianobacterias respectivamente. El pH predeterminado fue de 7,5 para microalgas y 8 para cianobacterias, con una temperatura controlada de 25°C para microalgas y 30°C para cianobacterias.

En la Tabla 7 se presentan los datos productividad de biomasa y fijación de CO₂ en cultivo continuo, una vez alcanzado el estado estacionario, destacando *Chlorella vulgaris* por su alta tasa de fijación de CO₂. La microalga *Porphyridium*

purpureum y las cianobacterias *Anabaena PCC7119*, *PCC7120* y *PCC7937* no soportaron las condiciones de experimentación impuestas y sus cultivos se perdieron por dilución.

Tabla 7. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ en estado estacionario de cultivos continuos

Estirpe	Productividad de biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
<i>Chlorococcum sp.</i>	0,4±0,0	0,7±0,1
<i>Chlorella sp.</i>	0,6±0,0	1,0±0,0
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,6±0,0	1,1±0,0
<i>Nostoc PCC 9202</i>	0,4±0,1	0,7±0,2
<i>Nostoc punctiforme</i>	0,5±0,1	0,9±0,2
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	0,5±0,0	0,9±0,1
<i>Spirulina PCC 6313</i>	0,2±0,0	0,4±0,1

Los valores más altos de productividad de biomasa se registraron en los cultivos del género *Chlorella* (*C. vulgaris* y *Chlorella sp.* 0,6 g biomasa l⁻¹ d⁻¹). *Scenedesmus vacuolatus* mostró también un comportamiento destacable, produciendo más de medio gramo de biomasa por litro y día.

A partir de la biomasa liofilizada recogida en estado estacionario se analizó la composición bioquímica y el calor de combustión (Tabla 8). La biomasa de las microalgas ensayadas contenía aproximadamente un 50% de proteínas y el resto de carbono distribuido, en proporción diferente según la estirpe, entre carbohidratos y lípidos. Mientras que, las estirpes pertenecientes al género *Chlorella* presentaron valores de carbohidratos ligeramente superiores al del resto de las microalgas,

Tabla 8. Composición bioquímica, calor de combustión y eficiencia fotosintética (R) en estado estacionario de cultivo continuo

Estirpe	(% Biomasa)			Calor de combustión (KJ g ⁻¹)	R (%)
	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos		
<i>Chlorococcum sp.</i>	47,2±2,8	19,7±1,9	20,2±0,9	16,9±1,1	0,9
<i>Chlorella sp.</i>	48,5±1,3	23,8±1,6	17,7±0,1	19,1±2,2	1,3
<i>Chlorella vulgaris</i>	47,3±1,0	23,0±1,3	19,9±1,5	17,1±0,2	1,4
<i>Nostoc PCC 9202</i>	42,4±0,8	32,2±2,3	8,1±1,3	12,6±2,7	0,8
<i>Nostoc punctiforme</i>	45,8±0,7	29,9±2,1	13,6±2,1	15,4±1,3	1,1
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	44,6±2,1	20,3±0,6	28,0±3,8	18,9±1,2	1,2
<i>Spirulina PCC 6313</i>	43,7±1,7	32,4±0,5	17,7±0,1	15,6±1,4	0,5

Scenedesmus vacuolatus destacó por almacenar mayor cantidad de lípidos (aproximadamente 30% de la biomasa seca). Las cianobacterias tuvieron un comportamiento distinto, localizándose una parte sustancial del carbono fijado como carbohidratos en detrimento de los lípidos. Respecto al poder calórico, las microalgas mostraron en general valores más altos que las cianobacterias, cercanos a 20 kJ g⁻¹. Considerando la irradiancia incidente sobre los cultivos, se pudo estimar la fracción de energía luminosa transformada en energía química como medida de la eficiencia fotosintética. Los valores más elevados se obtuvieron con microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp* y *Scenedesmus vacuolatus* (1,2-1,4 %).

SELECCIÓN DE ESTIRPE

Para la selección definitiva de la cianobacteria/microalga adecuada se tomó en consideración la capacidad de fijar CO₂, la densidad de los cultivos una vez alcanzado el estado estacionario (cuanto más concentrado esté un cultivo, menos volumen hay que procesar para recoger la misma cantidad de biomasa) y la composición bioquímica de la biomasa generada, destacando según estos criterios *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp.* y *Scenedesmus vacuolatus*.

Para la selección final entre estas tres especies se consideró de interés conocer su capacidad de autofloculación, para aplicar la economía en el proceso de cosechado como criterio selectivo. Las especies del género *Chlorella* debido a su pequeño tamaño no autofloculaban bien. Sin embargo, *Scenedesmus vacuolatus*, de mayor tamaño, sedimentaban rápidamente por lo que el cosechado de su biomasa resultaría más económico (Figura 20).

Por tanto la selección definitiva de *Scenedesmus vacuolatus* se tomó basándose en las siguientes características:

- Alta capacidad de fijación de CO₂
- Alta densidad celular en cultivos continuos
- Facilidad de cosechado
- Generación de biomasa con prometedor valor añadido por su destacable contenido en lípidos y carbohidratos

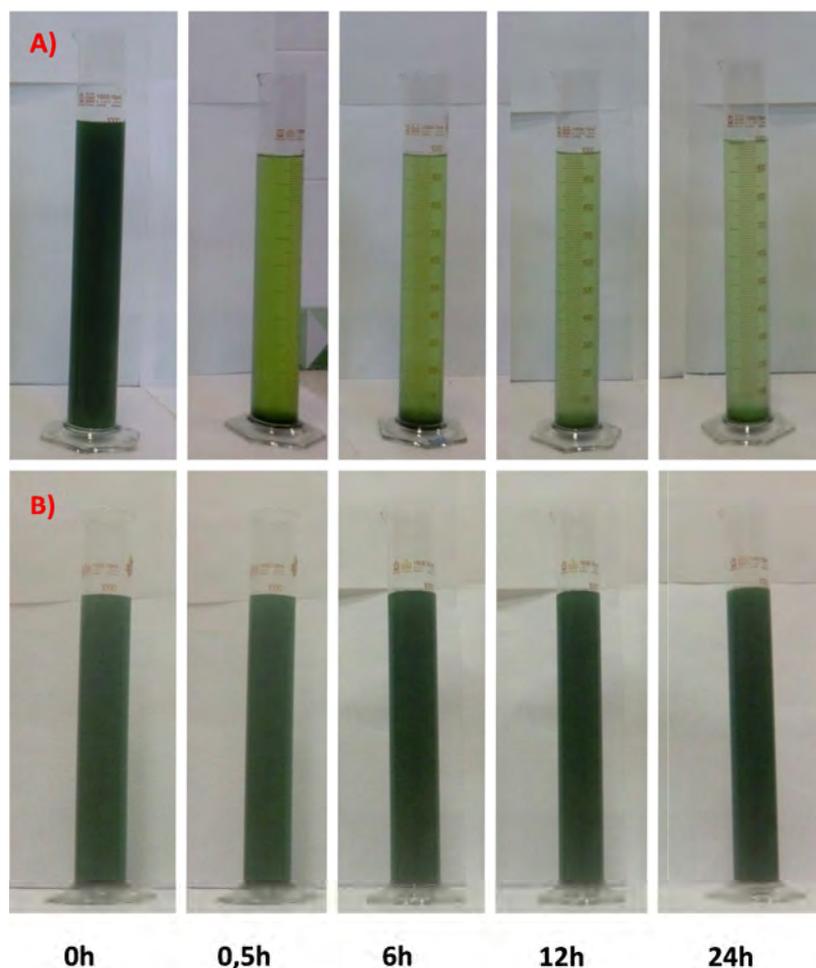


Figura 20. Decantación de cultivos densos (1 g l^{-1}) de *S.vacuolatus* (A) y *C.vulgaris* (B) durante 24h

EL CASO DE *Scenedesmus vacuolatus*

Previamente a operar los cultivos de cualquier microalga a la intemperie, se requiere una caracterización del comportamiento de la estirpe en condiciones controladas de laboratorio, con análisis de la influencia de parámetros críticos y la consecuente optimización de condiciones para el cultivo. A estos efectos, se desarrollaron cultivos de *S. vacuolatus* en fotoquimiostatos de tipo columna de burbujeo operados en régimen continuo e iluminados simulando un ciclo solar. De esta manera se establecieron las condiciones óptimas en las se maximizaba la fijación fotosintética de CO_2 , estableciéndose asimismo la tolerancia de los cultivos respecto del pH y la temperatura. La asignación de los valores óptimos para cada variable se llevó a cabo de manera secuencial. Una vez determinada la influencia de un parámetro sobre el rendimiento del cultivo, se seleccionó el valor con el que se obtenía mayor

productividad de biomasa, fijándose de dicho parámetro en las experiencias posteriores.

Las variables analizadas fueron pH, temperatura y velocidad de dilución, estudiándose también el efecto combinado de temperatura/irradiancia. Los resultados obtenidos permitieron establecer un modelo del comportamiento de productividad y tasa de fijación de CO₂ de los cultivos respecto a importantes factores, tales como irradiancia disponible y temperatura.

Por último, y para completar la valoración del potencial de *Scenedesmus vacuolatus* para su empleo en procesos de tratamiento de emisiones gaseosas industriales, se ha analizado la viabilidad de su cultivo en presencia de mezclas gaseosas de composición análoga a la corriente de gases de chimenea de una central térmica.

Efecto del pH

La primera variable analizada fue el pH, estudiando cómo la variación del mismo afecta la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂. El intervalo de valores de pH estudiado fue entre 6 y 9.

Resulta patente que *S. vacuolatus* es una microalga con amplia tolerancia a cambios de pH, siendo viable su cultivo en todo el intervalo ensayado (Figura 21). El mayor rendimiento se obtuvo a pH 7,5 con una productividad de biomasa de 0,55 g l⁻¹ d⁻¹, asimilando 1,1 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹. A pH 6, el valor más bajo ensayado, el rendimiento del cultivo solo descendió alrededor del 20%, siendo el valor de la productividad de biomasa 0,44 g l⁻¹ d⁻¹ y 0,9 g l⁻¹ d⁻¹ el de la fijación fotosintética de CO₂. Al ensayar condiciones de cultivo más alcalinas, tampoco se registraba un descenso dramático ni en la productividad de biomasa ni en la fijación de CO₂. A pH 8, 8,5 y 9, los cultivos de *S.vacuolatus* presentaron productividades superiores a 0,4 g l⁻¹ d⁻¹, con una asimilación de CO₂ de 0,9 g l⁻¹d⁻¹. Por consiguiente, el comportamiento de esta microalga fue bastante estable dentro del margen de pH ensayado, manteniendo entre 75 y 80% de la productividad máxima.

El análisis de varianza (Anova factorial) indicaba una influencia estadísticamente significativa del pH sobre la productividad de biomasa de los cultivos de *S.vacuolatus*, con un máximo a pH 7,5. Por tanto, para las siguientes experiencias, se operó a este valor de pH.

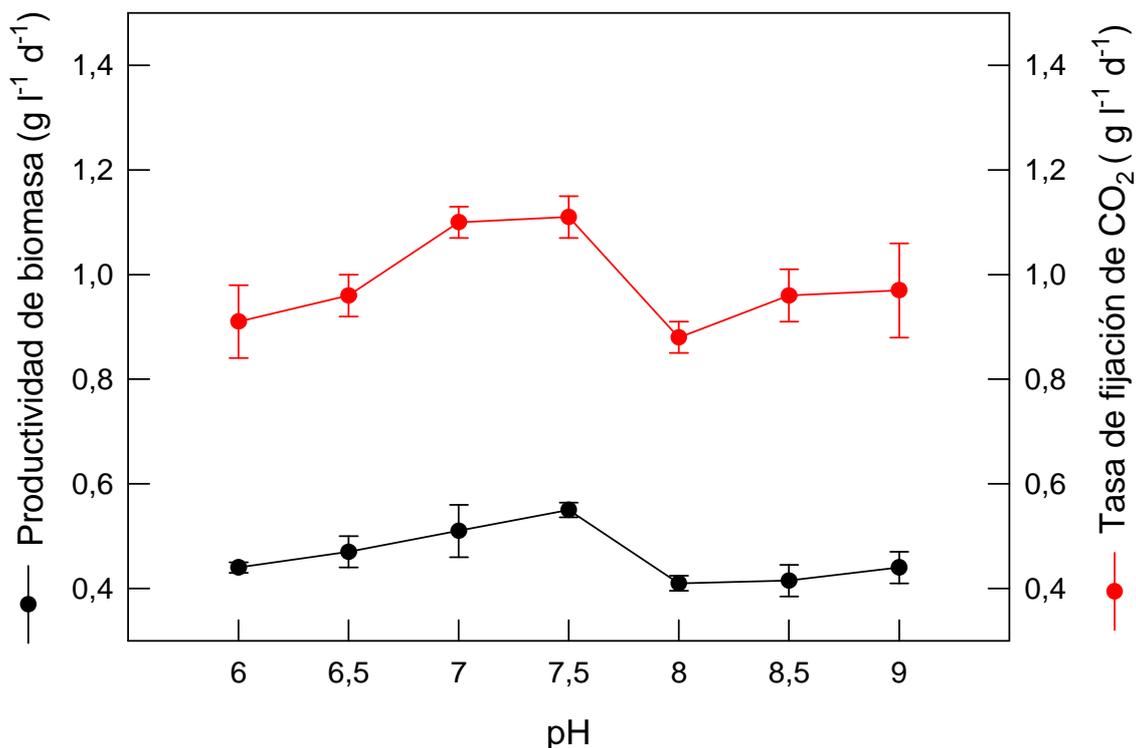


Figura 21. Efecto del pH sobre la productividad de biomasa y la tasa de fijación de CO₂ de *S.vacuolatus* en cultivo continuo. Condiciones de cultivo: D: 0,4 d⁻¹, temperatura: 25°C, I_{max}: 3000μE m⁻² s⁻¹, 20mM NO₃⁻

Efecto de la temperatura

Una vez establecido el pH óptimo, se llevó a cabo el estudio del efecto de la temperatura, analizando el comportamiento de *S. vacuolatus* en cultivo continuo a seis valores distintos para esta variable. Los resultados se presentan en la Figura 22.

La temperatura óptima, tanto para la productividad de biomasa como para la fijación de CO₂, fue 30°C. Para los demás valores en los que fue viable el cultivo, es decir, 25 y 35°C, la productividad en biomasa sufrió un descenso del orden del 10% (de 0,6 g l⁻¹ d⁻¹ a temperatura óptima, disminuyó a 0,54 y 0,56 g l⁻¹ d⁻¹ a 25 y 35°C, respectivamente). Sin embargo, el rendimiento del cultivo se vio afectado claramente a temperaturas más extremas. Así, a la temperatura más alta ensayada (40°C), el cultivo no alcanzó el estado estacionario, lavándose tras varios días de operación. A baja temperatura (15°C), la productividad descendió hasta un 60% con respecto a la presentada a 30°C. El análisis de la varianza (Anova factorial), indica la existencia de una influencia estadísticamente significativa de la temperatura en el comportamiento del cultivo.

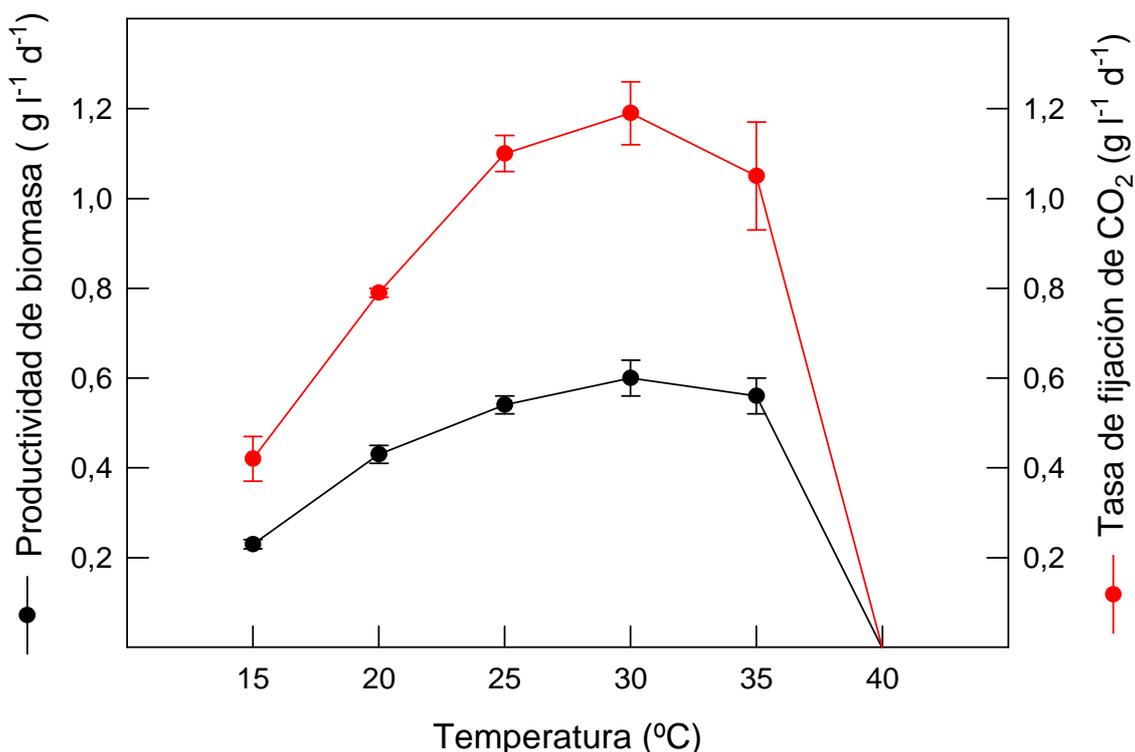


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ de *S. vacuolatus* en cultivo continuo. Condiciones de cultivo: D: 0,4 d⁻¹, pH: 7,5, I_{max}: 3000 μE m⁻² s⁻¹, 20mM NO₃⁻

En base a estos resultados, se fijó como temperatura óptima 30°C.

Efecto de la velocidad de dilución

La tasa de renovación del medio es una de las variables más influyentes en el comportamiento de los cultivos en régimen continuo, por lo que es importante realizar un estudio detallado que comprenda un intervalo amplio de velocidades de dilución. Así, se ensayaron cinco velocidades, entre 0,15 y 0,8 d⁻¹ (Figura 23).

Los resultados indicaban que para una velocidad de dilución de 0,6 d⁻¹ se obtenían las máximas tasas de fijación de CO₂ y de productividad de biomasa. Las diferencias en cuanto a este último parámetro, no eran estadísticamente significativas cuando el cultivo se operaba a velocidades de dilución de 0,4 y 0,5 d⁻¹. Por debajo de 0,4 d⁻¹ se reducía hasta un 30% el rendimiento del cultivo (de 0,7 a 0,4 g l⁻¹ d⁻¹). El análisis de la varianza (Anova factorial) acreditó la relevancia de esta variable sobre el comportamiento del cultivo.

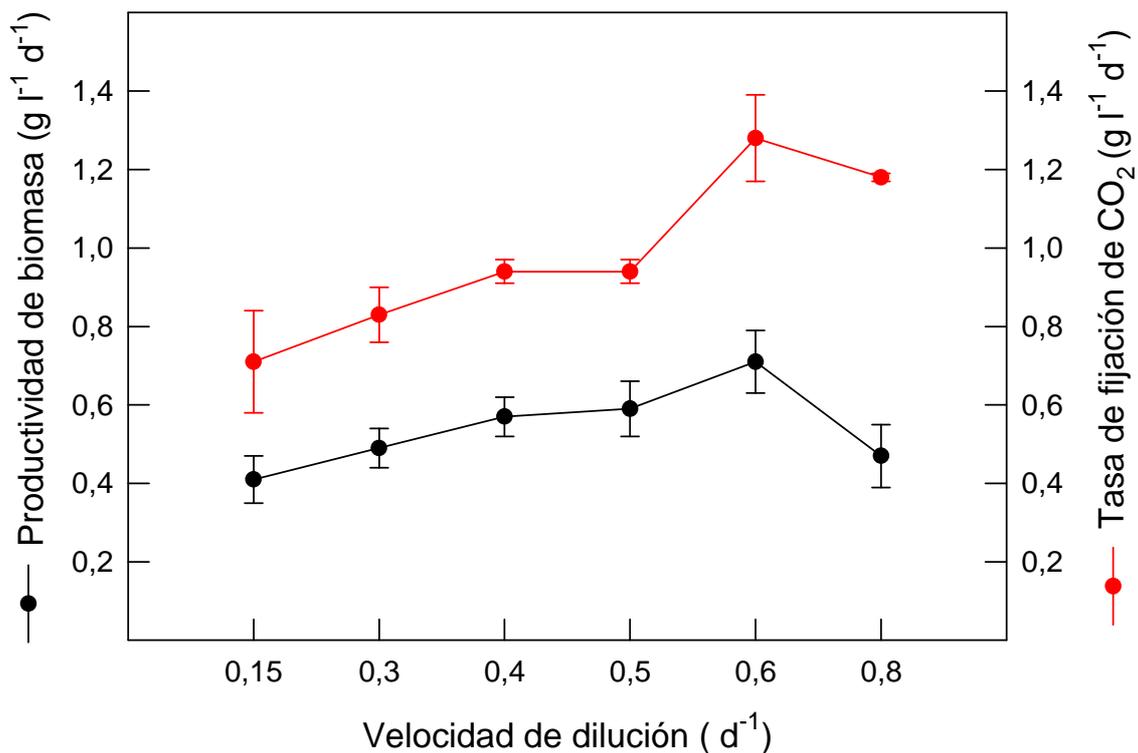


Figura 23. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ de *S.vacuolatus* en cultivo continuo. Condiciones de cultivo: Temperatura: 30°C, pH: 7,5, I_{max}: 3000 μE m⁻² s⁻¹, 20mM NO₃⁻

Análisis del efecto conjunto de temperatura e irradiancia

La disponibilidad de luz y la temperatura son dos factores interrelacionados que afectan marcadamente al crecimiento y rendimiento de los cultivos al exterior. Por ello, es importante realizar un estudio detallado de cómo estos dos factores influyen en el comportamiento de los cultivos de *S.vacuolatus*. A este fin, se han evaluado los efectos para distintas combinaciones de valores de ambas variables, que pudieran ser representativas de la situación en las distintas estaciones del año en Sevilla. Estos estudios se llevaron a cabo a una velocidad de dilución de 0,6 d⁻¹ y a pH 7,5. Los valores de irradiancia incidente máxima analizados fueron 1000, 2000 y 3000 μE m⁻² s⁻¹ y las temperaturas 15, 25, 30 y 35°C.

La Figura 24 ilustra la respuesta de la productividad de biomasa, que es análoga a la observada para la tasa de fijación de CO₂, aunque los resultados para este último parámetro no se muestran.

Como consideración de carácter general, cabe apuntar que la temperatura óptima fue la misma (30 °C) para los tres valores ensayados de irradiancia máxima, y

que la productividad de los cultivos respondía positivamente al aumento del valor de irradiancia para todas las temperaturas ensayadas.

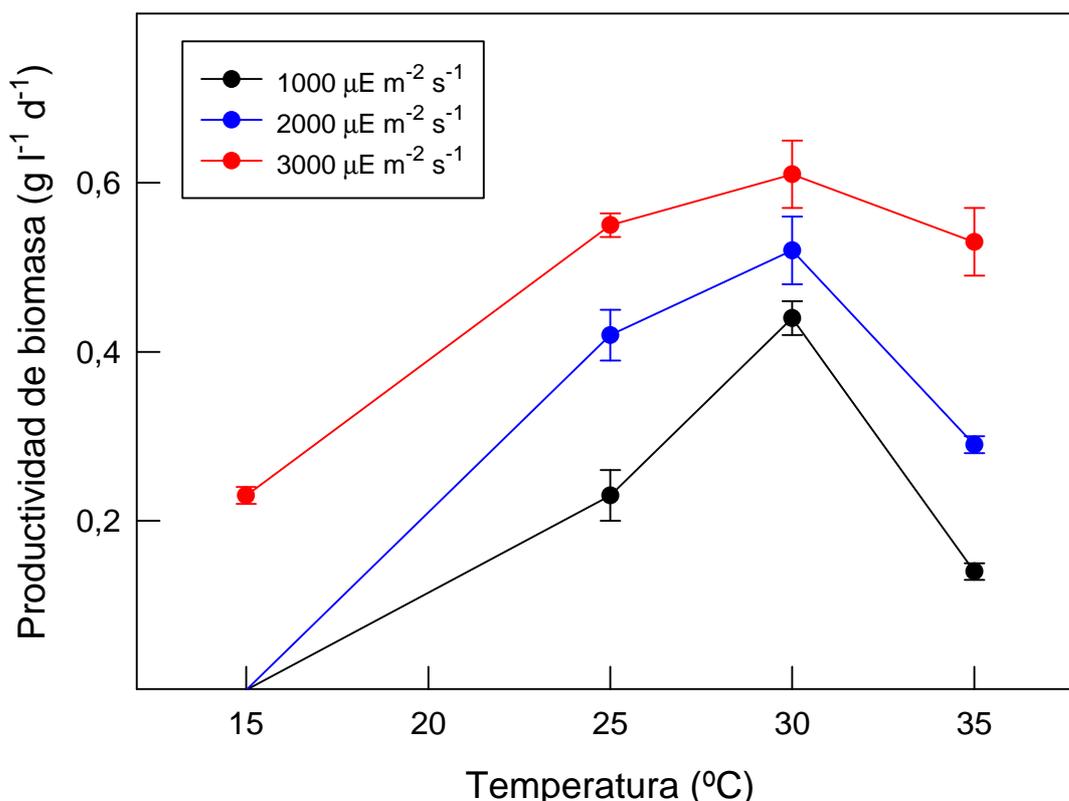


Figura 24. Efecto conjunto de temperatura e irradiancia incidente máxima sobre la productividad de biomasa de *S.vacuolatus* en cultivo continuo. Las experiencias se realizaron a una velocidad de dilución de $0,6 \text{ d}^{-1}$, pH 7,5, y 20mM NO_3^-

Para condiciones de baja irradiancia ($1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y baja temperatura (15°C), *Scenedesmus vacuolatus* fue incapaz de mantenerse en cultivo continuo a la velocidad de dilución establecida; no se alcanzó el estado estacionario y se lavó a los pocos días de operación. Al mismo valor de irradiancia, pero a una temperatura más favorable (25°C), el cultivo era viable, aunque con solo la mitad de la productividad de la registrada para la temperatura óptima, 30°C . A 35°C la productividad del cultivo se vio muy afectada, rindiendo prácticamente unos $0,15 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

A irradiancia media ($2000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), el comportamiento fue similar al registrado a baja irradiancia. A 15°C , la velocidad de crecimiento de *S.vacuolatus*, fue incapaz de igualarse a la velocidad de dilución impuesta, por lo que el cultivo se lavó. A 30°C alcanzó el máximo de productividad, $0,52 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, un 20% mayor que la presentada a 25°C para la misma irradiancia. A 35°C la productividad de biomasa solo alcanzaba un 45% ($0,29 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) del valor óptimo a 30°C .

A 3000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pudo conseguirse el estado estacionario para cultivos continuos de *S.vacuolatus* a 15°C, superándose los 0,2 $\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$. La productividad a 25 y 35°C (0,55 y 0,53 $\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente) fue un 90% de la máxima. A 30 °C y 3000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia incidente, los cultivos de *S.vacuolatus* rindieron hasta 0,6 $\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$, siendo éstas las condiciones óptimas para el crecimiento y fijación de CO_2 de los cultivos en régimen continuo.

El análisis de la varianza refrendó la importancia de la irradiancia y la temperatura sobre el comportamiento de los cultivos de *S.vacuolatus*, resaltando la irradiancia como variable más significativa.

Modelo de crecimiento y de fijación de CO_2

Un completo análisis estadístico (ANOVA multifactorial) de la influencia de cada variable estudiada sobre la velocidad de crecimiento pone de manifiesto que el crecimiento en régimen continuo de *Scenedesmus vacuolatus* se encuentra fuertemente influenciado por la irradiancia promedio (I_{av}) y por la temperatura. Es por ello necesario definir un modelo de crecimiento (o función matemática) que tenga como base estas variables.

Definición de un modelo de crecimiento en función de la velocidad de dilución e irradiancia

La primera variable a considerar es la irradiancia promedio, por ser la variable con mayor influencia y significación sobre el crecimiento de *S.vacuolatus*.

I_{av} se define como la irradiancia que recibe una célula media del cultivo, y se relaciona directamente con la irradiancia incidente (I_o) e inversamente con el paso de luz del cultivo (p), la densidad celular del mismo (C_b) y el coeficiente de extinción de la biomasa (K_a), según la Ecuación 7:

$$I_{av} = \frac{I_o}{K_a \cdot p \cdot C_b} \cdot \left(1 - e^{(-K_a \cdot p \cdot C_b)} \right) \quad \text{Ecuación 7}$$

Por lo tanto, un incremento en la irradiancia incidente sobre la superficie del reactor no implica un aumento de la irradiancia promedio que recibe cada célula. Si la densidad del cultivo aumenta, se darán fenómenos de sombreado entre las células, disminuyendo I_{av} . Para determinar la irradiancia media que recibe cada célula en cada condición ensayada, es necesario determinar experimentalmente el valor de K_a ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) ya que el resto de variables que conforman la ecuación de la I_{av} están determinadas

($p = 7\text{cm}$; I_0 y C_b fueron medidas experimentales propias de cada condición ensayada). El valor de K_a se establece de acuerdo con la Ecuación 8:

$$K_a = \frac{\text{Absorbancia media}}{C_b \cdot l} \quad \text{Ecuación 8}$$

donde la absorbancia media se calcula a partir del espectro de absorción (Figura 25) de una suspensión celular con una concentración de biomasa determinada (C_b , g m^{-3}), siendo l (m) el camino óptico que recorre la luz (cubeta de 0,01m). Para el caso de *S. vacuolatus*, el valor de la K_a fue $0,17 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Una vez determinada la K_a , se puede calcular la I_{av} de cada condición de acuerdo a la Ecuación 7.

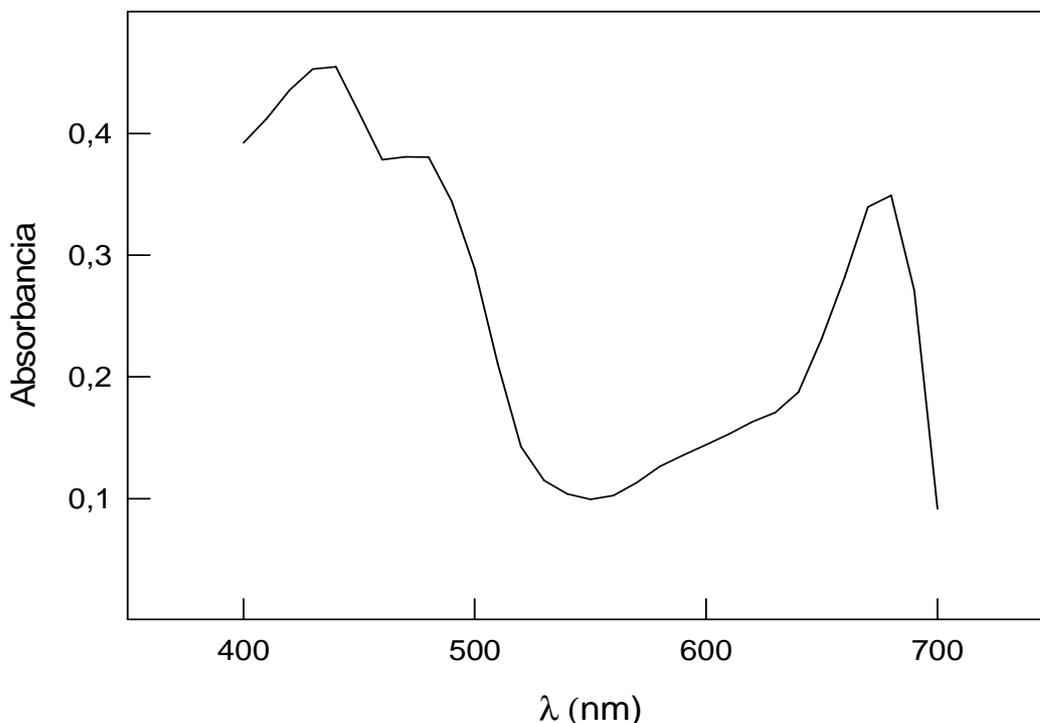


Figura 25. Espectro de absorción de *Scenedesmus vacuolatus*

Por tratarse de un microorganismo, el modelo a aplicar inicialmente es el de crecimiento bacteriano de Monod (1949). Este modelo asume que, en un cultivo limitado por un nutriente, la tasa o velocidad de crecimiento (μ) y la concentración del sustrato limitante (S) están relacionadas según la expresión matemática:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 9}$$

En el caso de las microalgas, la luz puede considerarse un sustrato esencial para el crecimiento. La aplicación de la ecuación de Monod al crecimiento de microorganismos fotosintéticos, siendo la tasa de crecimiento (μ) dependiente de la irradiancia promedio (I_{av}), resulta en la siguiente función (Molina Grima et al., 1994):

$$\mu(I_{av}) = \frac{\mu_{max} \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n} \tag{Ecuación 10}$$

donde μ es la tasa específica de crecimiento, μ_{max} es la tasa específica máxima de crecimiento bajo las condiciones de cultivo establecidas, I_k ($\mu E m^{-2} s^{-1}$) representa la afinidad del microorganismo por la luz y equivale al valor de I_{av} para el cual la velocidad de crecimiento es $\mu_{max}/2$, y n es un parámetro de forma.

Ajustando los datos experimentales a la ecuación propuesta por Molina Grima (1994) por regresión no lineal (Figura 26) se obtuvieron los siguientes parámetros característicos para *S. vacuolatus*:

- $\mu_{max}=0,88 d^{-1}$
- $n=2,5$
- $I_k=87,5 \mu E m^{-2} s^{-1}$

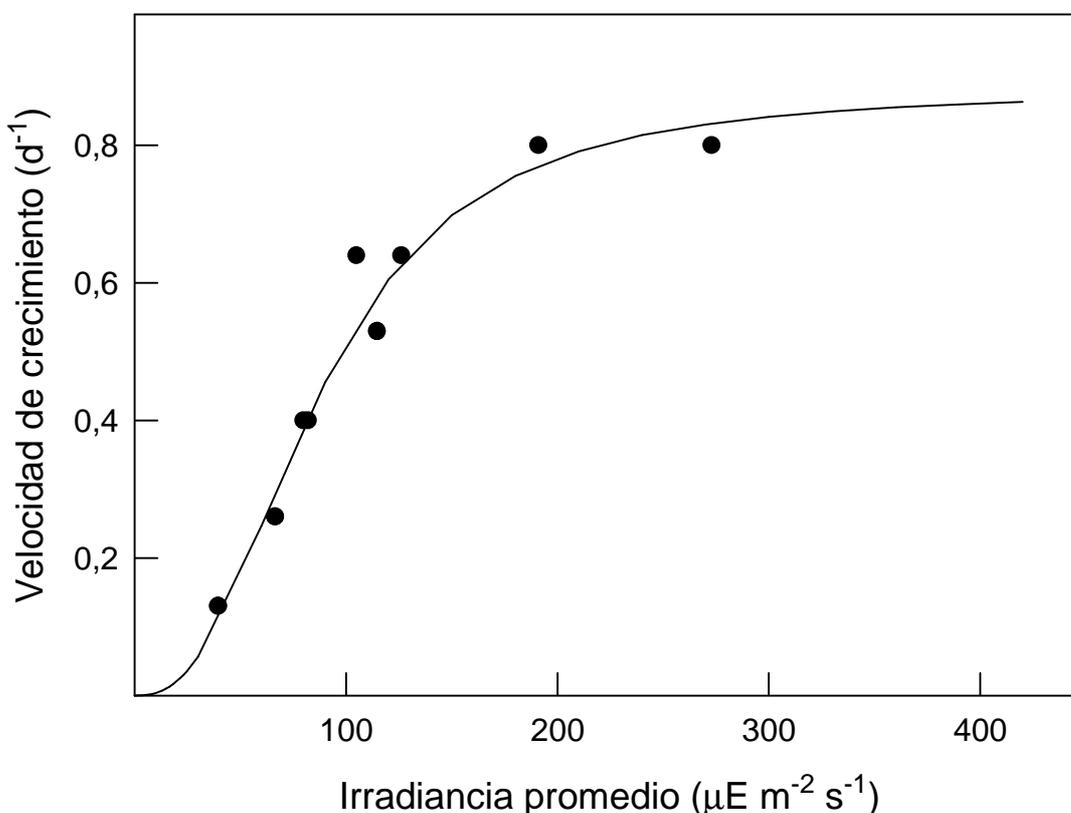


Figura 26. Efecto de la irradiancia promedio (I_{av}) sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) de *S.vacuolatus* en cultivo continuo

Estos valores indican que *S. vacuolatus* es una microalga de rápido crecimiento con una alta afinidad por la luz disponible (constante de semi-saturación para la irradiancia, I_k , inferior a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Los valores experimentalmente obtenidos para la velocidad de crecimiento se ajustaban con elevada correlación ($r^2=0,96$) a los predichos por el modelo propuesto (Figura 27).

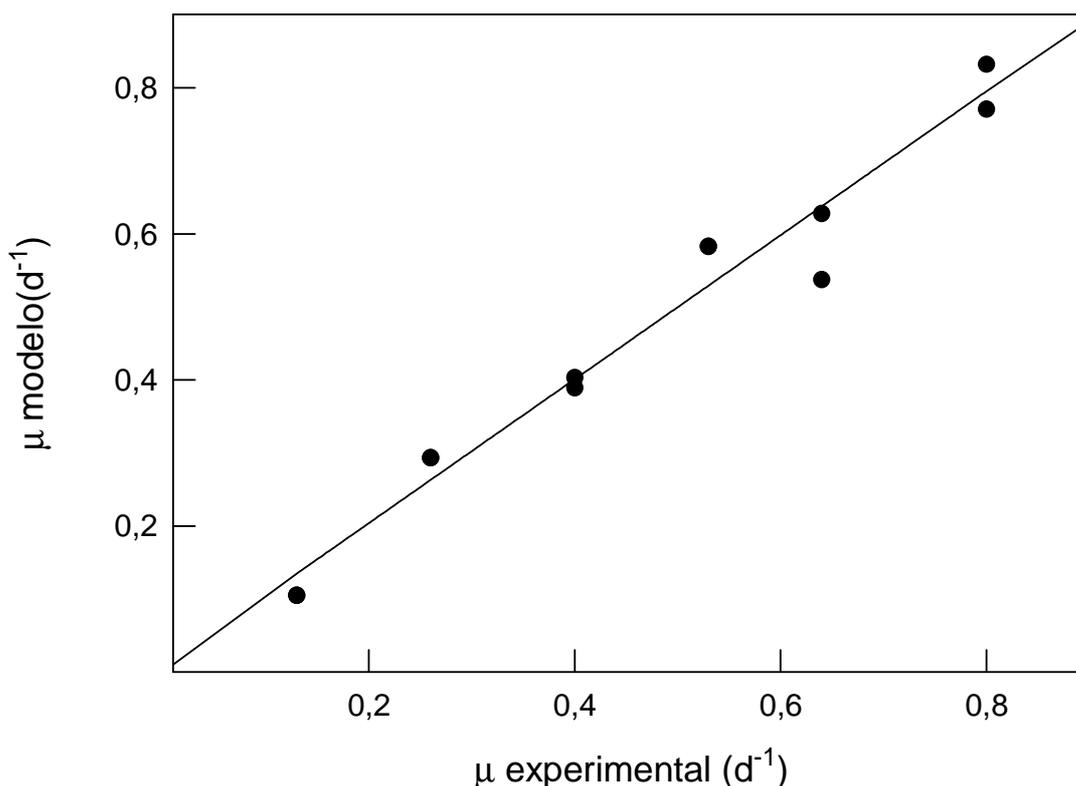


Figura 27. Ajuste entre los valores experimentales y los obtenidos mediante la Ecuación 10 para la velocidad de crecimiento de cultivos de *S.vacuolatus* a distintos valores de irradiancia promedio

Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia de la temperatura

El modelo básico de crecimiento fundamentado en la irradiancia promedio se ha refinado y complementado incorporando la temperatura como segunda variable que más afecta al crecimiento de *S.vacuolatus* en cultivo continuo. De esta manera pueden estimarse los límites de tolerancia a temperatura y precisar cómo se afecta el rendimiento de los cultivos. A tal fin, se aplicó la ecuación de Arrhenius (Ecuación 11) que relaciona la velocidad de crecimiento con la temperatura:

$$\mu(T) = \left[A_1 \cdot e^{\left(\frac{E_{a1}}{RT}\right)} - A_2 \cdot e^{\left(\frac{E_{a2}}{RT}\right)} \right] \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde A_1 y A_2 son parámetros relacionados con el crecimiento y característicos de cada microorganismo. Así, A_1 corresponde al efecto positivo de la temperatura sobre el crecimiento hasta los 30°C, mientras que el parámetro A_2 se relaciona con la caída de la velocidad de crecimiento a partir de la temperatura óptima. Los términos E_{a1} y E_{a2} se corresponden con la energía de activación de los parámetros A_1 y A_2 . Con los valores previamente determinados para n , I_k y μ_{max} se ajustaron los valores experimentales a la ecuación de Arrhenius, determinando los valores de los parámetros característicos de la misma: $A_1= 2 \cdot 10^7 \text{ d}^{-1}$; $E_{a1}= 4,09 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$; $A_2= 7,56 \cdot 10^{13} \text{ d}^{-1}$; $E_{a2}= 8,05 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$; $R= 8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

El modelo de crecimiento de *Scenedesmus vacuolatus* basado en la irradiancia promedio (I_{av}) y la temperatura (°C) corresponde a la función:

$$\mu(I_{av}, T) = \left(\frac{\mu_{max}(I_{av}, T) \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n} \right) \left(A_1 \cdot e^{\left(\frac{E_{a1}}{RT}\right)} - A_2 \cdot e^{\left(\frac{E_{a2}}{RT}\right)} \right) \tag{Ecuación 12}$$

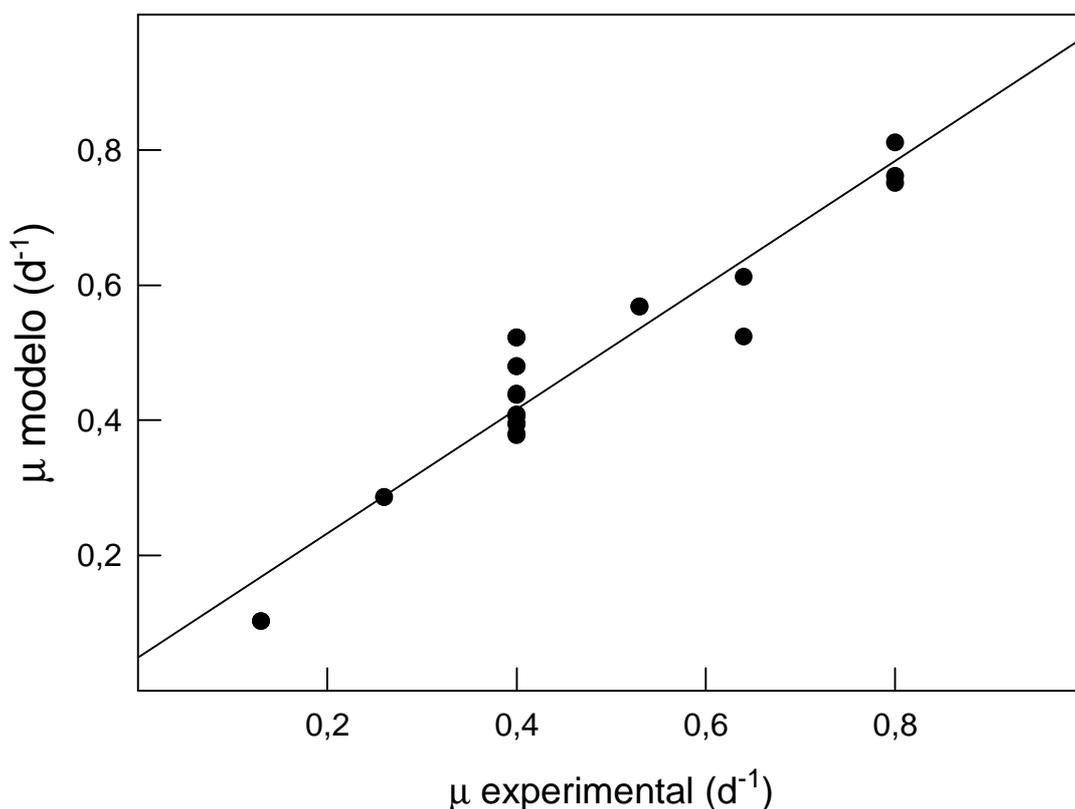


Figura 28. Ajuste entre los valores experimentales y los obtenidos mediante la Ecuación 12 para la velocidad de crecimiento de *S.vacuolatus* en cultivo continuo para distintas condiciones de irradiancia promedio (I_{av}) y temperatura

Como se observa en la Figura 28, existía un excelente ajuste ($r^2=0,9$) entre los datos experimentales y los valores calculados según el modelo propuesto.

Simulación del comportamiento de *S.vacuolatus* en cultivo continuo

Gracias al modelo de crecimiento propuesto, es posible simular el comportamiento de la microalga en cualquier situación experimental para distintas combinaciones de valores de temperatura, irradiancia incidente y velocidad de dilución y a partir de ellas estimar la concentración y la productividad de biomasa o la tasa de fijación de CO₂ para cada una de estas situaciones. En las Figuras 29, 30A y 30B, se presentan estas simulaciones para una velocidad de dilución de 0,5 d⁻¹.

Para una tasa de dilución de 0,5 d⁻¹, la simulación predice una densidad celular máxima ligeramente superior a 1,2 g l⁻¹, que se corresponde con una productividad de biomasa que sobrepasa los 0,6 g l⁻¹ d⁻¹ y una de fijación de carbono cercana a 1,2 g l⁻¹ d⁻¹ alcanzables a 30°C y máxima I₀. Con la ayuda del modelo, resulta pues posible establecer la combinación de valores de las tres variables (D, T^a, I₀) que permitirían alcanzar las máximas tasas de fijación de CO₂.

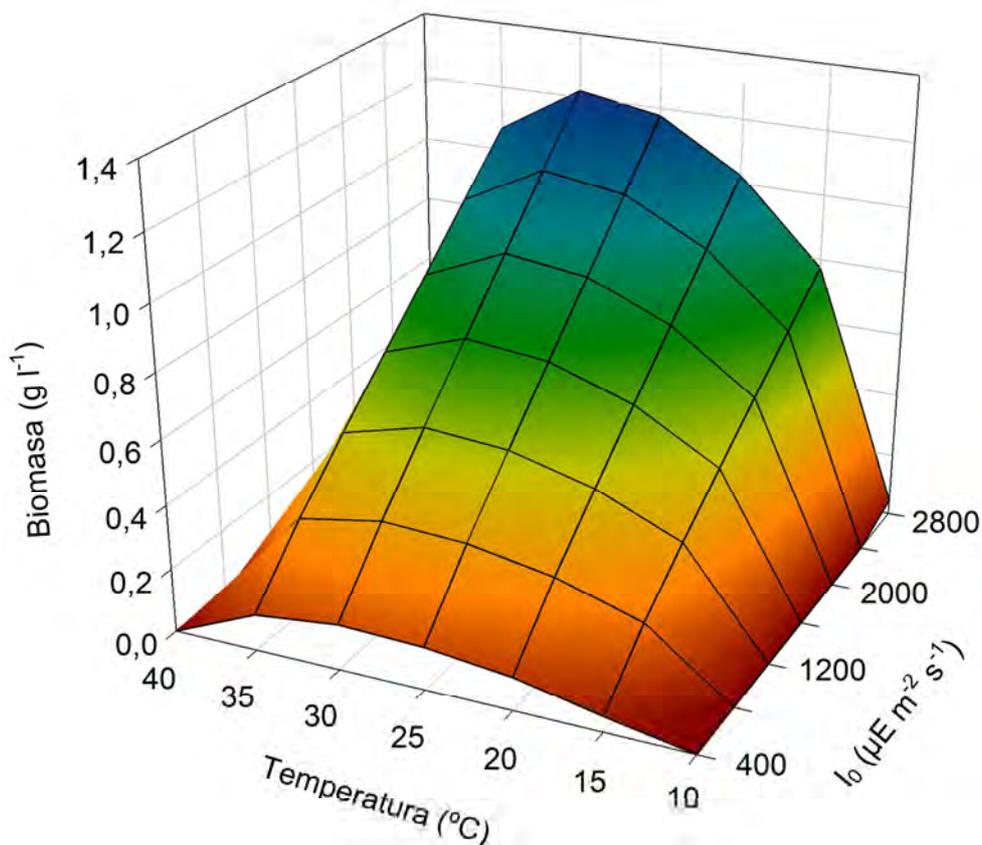


Figura 29. Simulación del efecto combinado de irradiancia y temperatura sobre la concentración de biomasa de cultivos de *S. vacuolatus* en régimen continuo para una tasa de dilución de 0,5 d⁻¹

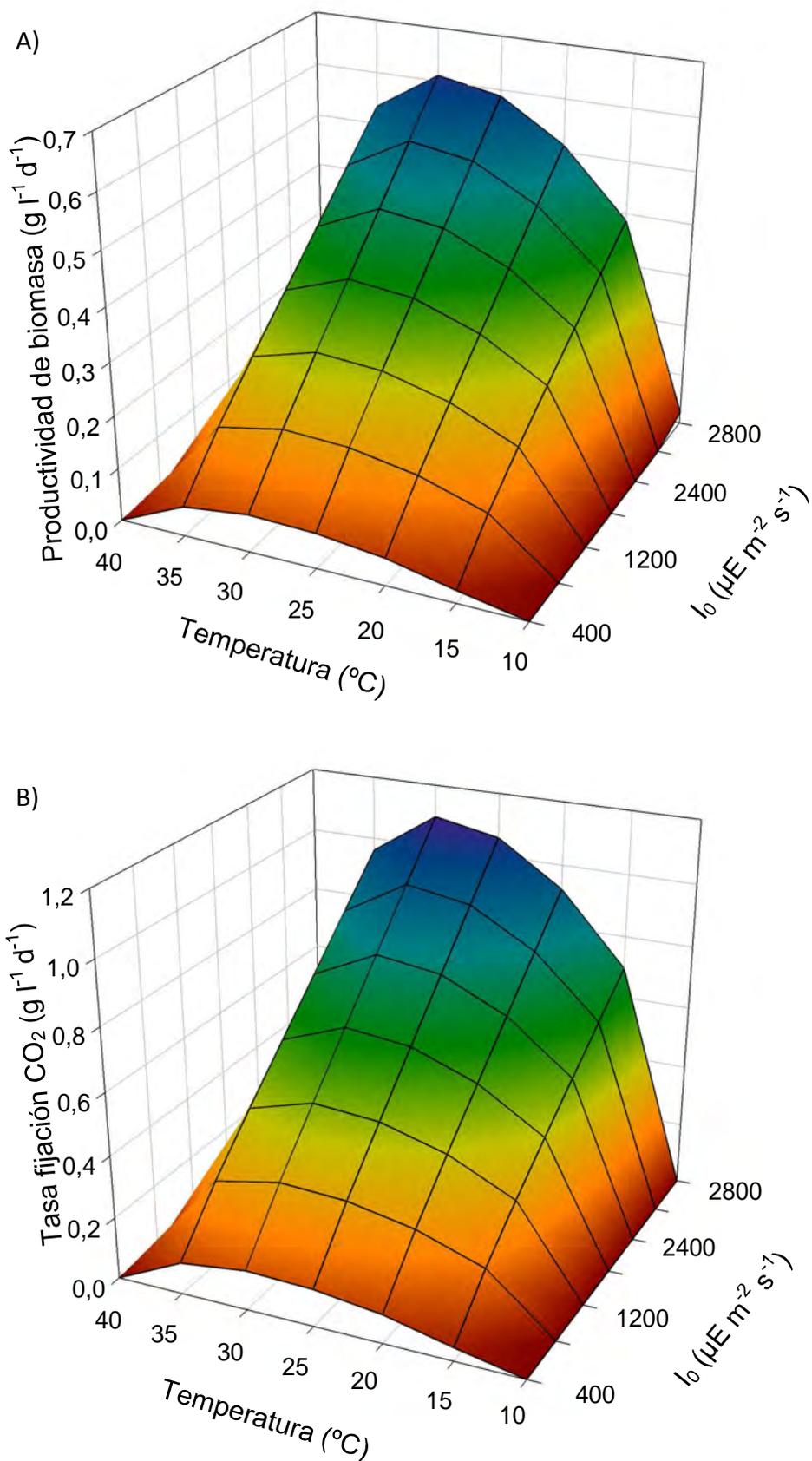


Figura 30. Simulación de la influencia de la irradiancia y temperatura sobre la productividad de biomasa (A) y la tasa de fijación de CO₂ (B) de cultivos de *S. vacuolatus* en régimen continuo para una tasa de dilución de 0,5d⁻¹

Efecto de las mezclas gaseosas de origen industrial sobre la viabilidad y eficiencia de los cultivos

Uno de los objetivos generales de este trabajo era determinar la posibilidad de utilizar gases procedentes de emisiones industriales para el cultivo de microalgas. Esta aproximación reduciría los costes de operación de los cultivos, así como las emisiones de CO₂. Para determinar el potencial de cultivos de *S. vacuolatus* para captar y utilizar gases residuales, se desarrollaron diversas experiencias suministrando a los cultivos una mezcla de gases de composición similar a la de las emisiones de una central térmica, que emplea carbones bituminosos como combustible fósil para la producción del vapor de agua necesario para generar energía eléctrica (Tabla 9). Aunque en este tipo de instalaciones los gases de combustión se depuran parcialmente mediante procesos químicos (precipitación electrostática, desulfuración o reducción de óxidos nitrosos), el contenido en óxidos de N y S aún permanece alto.

Tabla 9. Composición de gases típica a la salida de un proceso de combustión de una central térmica de 450MW que utiliza carbones bituminosos

Temperatura	50-60°C
Presión	1 bar
Gas	(% v/v)
CO ₂	9,5-12
H ₂ O	12-27
N ₂	57-70
O ₂	4,5-5
SO ₂	0,03-0,06
NO ₂	0,04-0,08

La mezcla de gases utilizada para las experiencias que aquí se describen contenía: NO₂=0,08%; SO₂=0,06%; O₂=5%; CO₂=12%, siendo el resto N₂. Cuando procedía, este gas básico se diluía con aire en la proporción requerida. Las experiencias se llevaron a cabo en fotoquimiostatos operados en régimen continuo y en las condiciones de temperatura, pH e irradiancia establecidas como óptimas.

El CO₂ puro que se utilizaba habitualmente para el suministro de carbono, y que se inyectaba a demanda para mantener el pH del cultivo, se sustituyó por la mezcla de gases descrita. Inicialmente, para establecer la tolerancia de *S. vacuolatus* a los gases presentes en la mezcla gaseosa básica, se adicionó de forma continua al

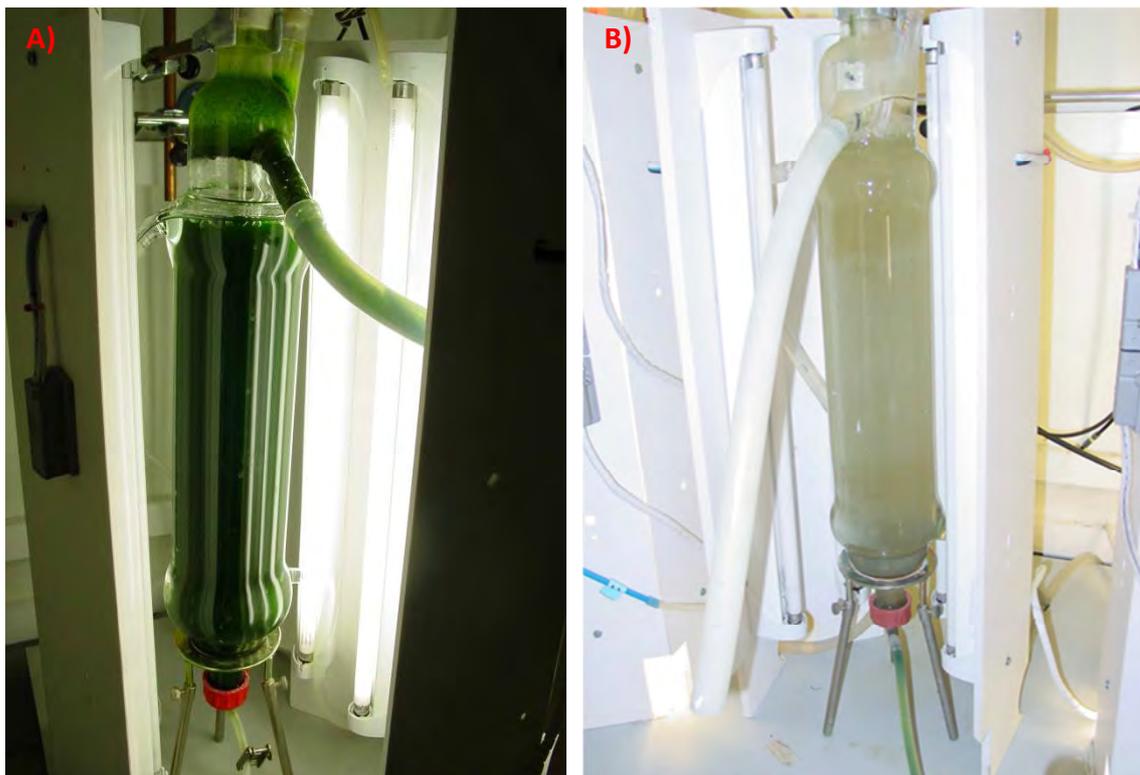


Figura 31. Aspecto de un cultivo de *S.vacuolatus* en condiciones óptimas de operación (A) y usando gases de escape con CO₂ al 12% (B) como fuente de C

cultivo una corriente de aire enriquecido con la mezcla gaseosa a diferentes proporciones para asegurar un suministro de CO₂ al 12 (sin diluir con aire) ,6 ,3 y 1%.

Sólo cuando la mezcla se diluyó con aire doce veces (CO₂ al 1%), el medio no se acidificaba exageradamente (pH estabilizado entre 7 y 8) y los cultivos de *S. vacuolatus* eran viables. Para diluciones menores de la mezcla gaseosa básica (CO₂ al 3, 6 ó 12%), el cultivo se acidificó, con valores de pH por debajo de 5, afectándose severamente el desarrollo de las células e imposibilitando su cultivo (Figura 31).

La comparación con un reactor operado en las mismas condiciones pero burbujeadado de forma continua con una corriente de aire suplementado con CO₂ puro al 1%, mostró una productividad análoga a la del cultivo burbujeadado con la mezcla gaseosa básica diluida 12 veces, que contenía igualmente un 1% de CO₂ (Tabla 10). Así mismo, la composición bioquímica de la biomasa generada no presentó diferencias significativas, con un contenido en proteínas del 40%, así como niveles del orden del 20% tanto de lípidos como de carbohidratos (Figura 32).

Tabla 10. Productividad de cultivos continuos de *S.vacuolatus* burbujeados continuamente con aire enriquecido con CO₂ puro o combinado con otros gases de combustión

	Productividad de biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
CO ₂ puro	0,64 ± 0,2	1,17 ± 0,3
Gas combustión	0,67 ± 0,1	1,22 ± 0,2

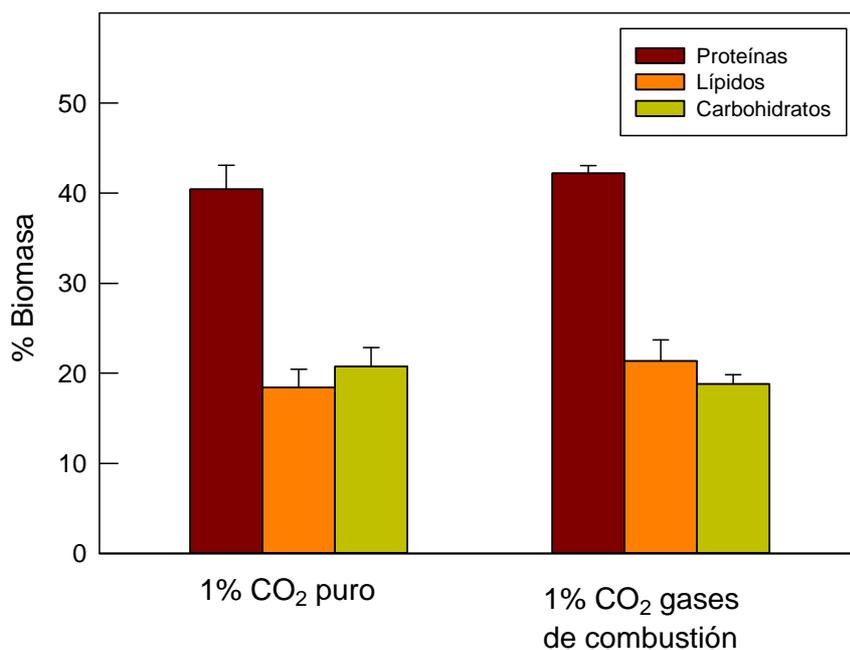


Figura 32. Composición bioquímica de cultivos en régimen continuo de *S.vacuolatus* burbujeados continuamente con aire enriquecido con CO₂ puro o combinado con otros gases de combustión

Por otra parte, cuando el CO₂ (puro o combinado con otros gases de combustión) se suministró a demanda para mantener el pH del medio a 7,5, los valores de productividad, tasa de fijación y composición de la biomasa de cultivos de *S.vacuolatus* fueron similares independientemente de la fuente de CO₂ (Tabla 11, Figura 33).

Tabla 11. Productividad de cultivos burbujeados con aire enriquecido con CO₂ puro o combinado con otros gases de combustión a demanda

	Productividad de biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
CO ₂ puro	0,63 ± 0,1	1,15 ± 0,2
Gas combustión	0,64 ± 0,1	1,17 ± 0,1

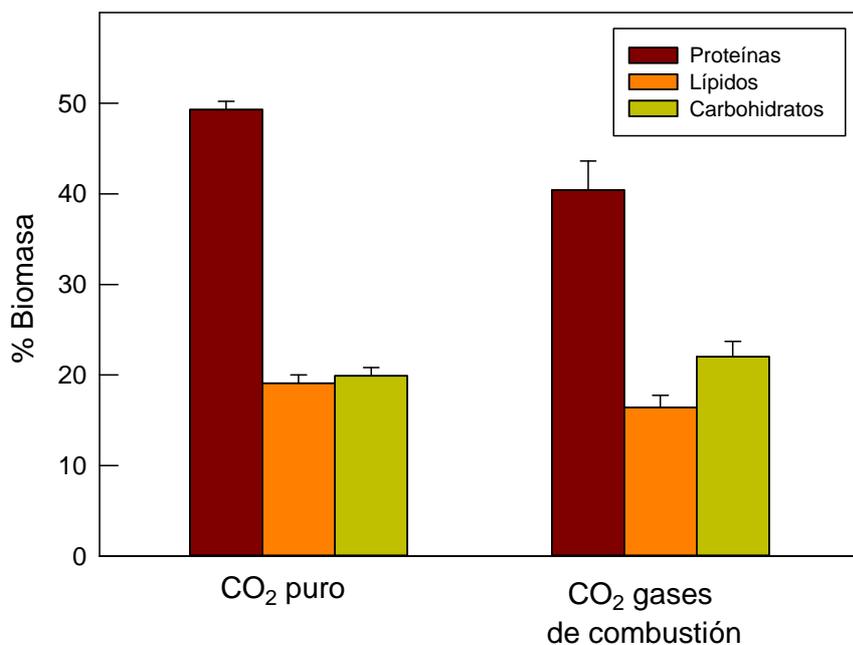


Figura 33. Composición bioquímica de cultivos en régimen continuo de *S.vacuolatus* burbujeados con aire enriquecido con CO₂ puro o combinado con otros gases de combustión a demanda

CULTIVO DE *Scenedesmus vacuolatus* AL EXTERIOR

Empleando las condiciones óptimas para el cultivo de *S.vacuolatus* establecidas en laboratorio, se estimó la eficiencia de captación de CO₂ en cultivos a la intemperie empleando diferentes diseños de reactor. Los sistemas usados fueron: estanques abiertos agitados por paletas, con una relación volumen/superficie de 100 l m⁻² y reactores planos verticales (RPV) de 115 l m⁻².

El objetivo inicial era desarrollar el estudio comparativo a lo largo de un ciclo anual completo. Sin embargo, problemas de contaminación limitaron de forma importante estos ensayos.

Cultivo en estanque abierto

Los cultivos se operaron en modo semicontinuo, con inyección de CO₂ a demanda para el control de pH (punto de consigna 7,5) y sin control de temperatura. En las Tabla 12 y 13 se muestra las variables de operación y los resultados de productividad en aquellas experiencias que no tuvieron problemas de contaminación. La frecuencia de dilución generalmente viene determinada por el crecimiento del cultivo, y éste, a su vez, por la irradiancia incidente. Los ciclos de dilución fueron de 2-3 días tanto en verano como en otoño. Así, en verano, con valores elevados de irradiancia incidente, la densidad celular mínima era de 0,3 g l⁻¹, rindiendo 0,05 g l⁻¹ d⁻¹.

Tabla 12. Variables de operación de cultivo semicontinuo en estanque abierto de *S.vacuolatus*

Estación	Densidad celular mínima (g l ⁻¹)	Frecuencia diluciones (días)	Irradiancia media incidente (MJ m ⁻² d ⁻¹)	Temperatura media (°C)
Verano	0,3	2-3	21,3±1	25,3±5
Otoño	0,2	2-3	10,3±1	19,4±4

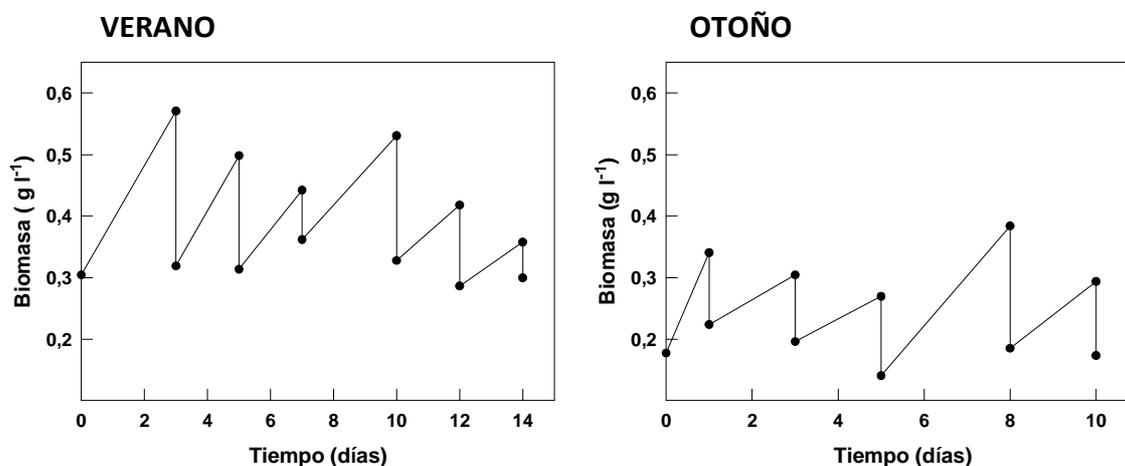


Figura 34. Evolución de los cultivos semicontinuos en estanque abierto de *S.vacuolatus* representativo de experiencias viables en diferentes estaciones

Tabla 13. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ de cultivos de *S.vacuolatus* en estanque abierto

Estación	Productividad de biomasa		Tasa de fijación de CO ₂	
	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)
Verano	0,05±0,03	5±3	0,09±0,05	9±5
Otoño	0,04±0,03	4±3	0,07±0,05	7±5

En otoño, con un valor menor de irradiancia, los reactores se operaron a 0,2 g l⁻¹, rindiendo 0,04 g l⁻¹ d⁻¹. En la Figura 34 observamos el progreso de los cultivos semicontinuos en estos reactores, que se mantenían durante periodos superiores a una semana.

Cultivo en reactor plano vertical (RPV)

Los cultivos de *S.vacuolatus* en este tipo de reactor, al igual que en estanques abiertos, presentaron problemas de contaminación. En la Tabla 14 se muestra las variables de operación de los cultivos semicontinuos en RPV. Los valores de productividad de biomasa y fijación de carbono (0,13 y 0,24 g l⁻¹ d⁻¹, respectivamente) determinados en Primavera eran similares a los encontrados en Otoño (Tabla 15). El diseño de reactor plano vertical, permite un buen aprovechamiento de la luz, con valores de eficiencia fotosintética entre 1,5 (primavera) y 2,5% (otoño). En la Figura 35, se muestra la evolución de los cultivos semicontinuos en RPV en primavera y otoño, así como, la composición bioquímica de la biomasa generada, que es análoga, independientemente de la época del año en que se opera el cultivo.

Tabla 14. Variables de operación de cultivos semicontinuos en RPV de *S.vacuolatus*

Estación	Densidad celular mínima (g l ⁻¹)	Frecuencia diluciones (días)	Irradiancia media incidente (MJ m ⁻² d ⁻¹)	Temperatura media (°C)
Primavera	0,5	2-3	18,6±3	29,1±3
Otoño	0,6	2-3	11,9±3	31,6±1

Tabla 15. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ en cultivos de *S.vacuolatus* en RPV

Estación	Productividad de biomasa		Tasa de fijación de CO ₂	
	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)
Primavera	0,13±0,04	15±4,6	0,24±0,07	27,7±8,4
Otoño	0,13±0,06	15±7	0,24±0,11	27,7±12,8

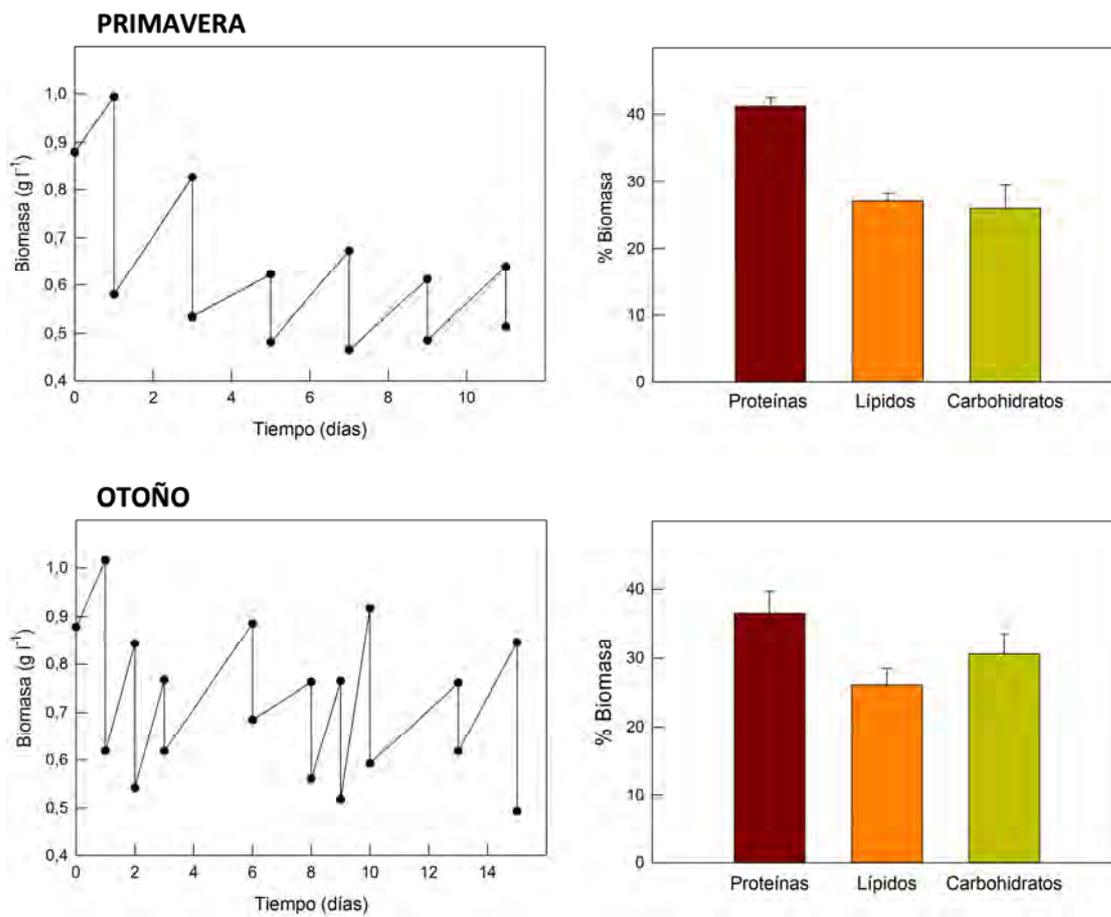


Figura 35. Evolución de la concentración de biomasa de los cultivos de *S.vacuolatus* en RPV. Composición bioquímica de la biomasa generada

Contaminaciones presentes en los cultivos al exterior de *S.vacuolatus*

Los problemas de contaminación por otros microorganismos que presentaron los cultivos de *S. vacuolatus* fueron episodios independientes del tipo de reactor que se operó o de cualquier otro tipo de parámetros físico-químicos que afectase al cultivo. A parte de bacterias, organismos que difícilmente pueden ser eliminados en un cultivo a la intemperie, las infecciones más recurrentes fueron por hongos (Phylum *Chytridiomycota*) y ciliados como *Vorticella sp* y *Paramecium sp*. (Figura 36).

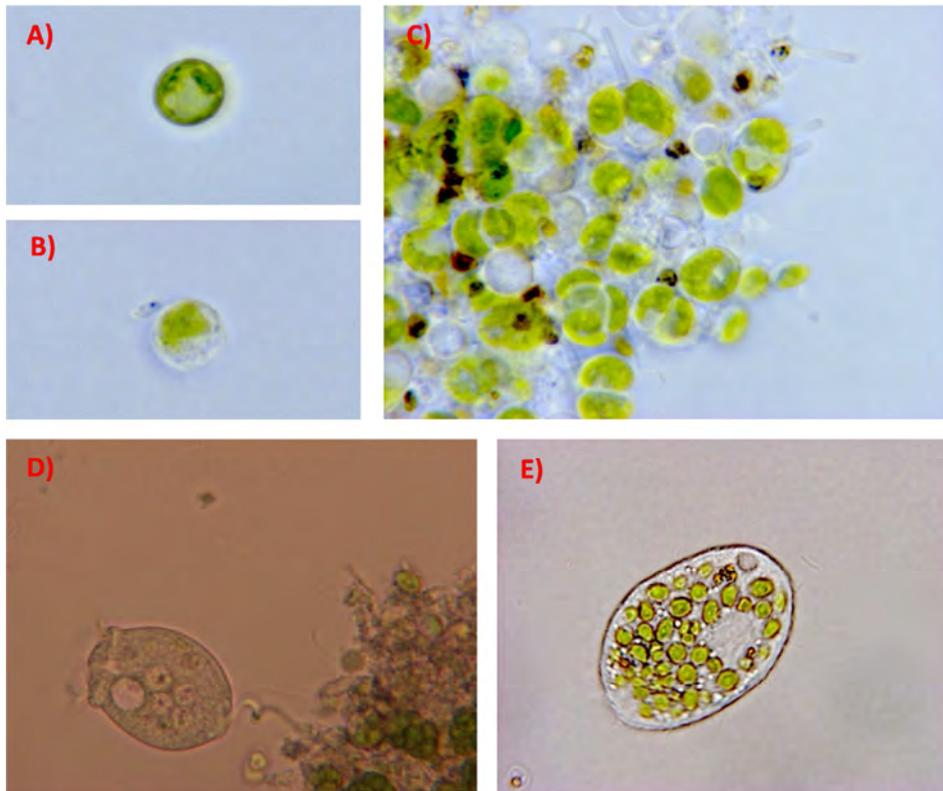


Figura 36. Aspecto de cultivos de *S.vacuolatus* contaminados. A) Célula no parasitada (x100), B) Célula infectada por quitridio (x100), C) Aspecto de un cultivo contaminado por quitridios (x100), D) *Vorticella sp* (x25), E) *Paramecium sp* (x63). Todas las fotos tomadas al MO.

EL CASO DE *Chlorella vulgaris*

Comprobada la dificultad de mantener cultivos a la intemperie, estables en el tiempo, de *Scenedesmus vacuolatus* se descartó la opción de esta especie como sistema efectivo para retirar CO₂ procedente de emisiones. De acuerdo con la información obtenida en el proceso de selección, *Chlorella vulgaris*, también presentaba alta productividad de biomasa, elevada capacidad de fijación fotosintética de CO₂ y una composición bioquímica interesante, aunque se seleccionara a *Scenedesmus vacuolatus* fundamentalmente por su mayor facilidad para sedimentar, con su consecuente ventaja para el cosechado.

Se reconsideró por tanto la idoneidad de *C. vulgaris* para el objetivo propuesto en este trabajo, determinando el efecto de diversos parámetros sobre la productividad de sus cultivos continuos (pH, temperatura, velocidad de dilución, irradiancia incidente y concentración de nitrato (como fuente de N combinado) en el medio de cultivo), estableciendo las condiciones óptimas para el crecimiento y fijación de CO₂. Adicionalmente, debido a su perfil bioquímico, se evaluó la idoneidad de esta microalga en relación a su aprovechamiento para la producción de un compuesto de interés energético como es el almidón. En base a estos resultados se propone un modelo de crecimiento para *C. vulgaris* y otro para la producción de almidón. Se analizó su comportamiento cuando se aireaba con una mezcla gaseosa que simulaba las emisiones de una central térmica. Por último, se verificó la viabilidad del cultivo a la intemperie de esta microalga.

Efecto del pH

Bajo las condiciones de operación descritas en la Figura 37, se analizó la productividad y tasa de fijación de CO₂ en el intervalo de pH estudiado que abarca valores entre 6,5 y 9.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que *C.vulgaris* es una estirpe con amplia tolerancia al pH, sin que el rendimiento de sus cultivos se viese afectado en un intervalo de pH entre 6,5 y 8. Sin embargo, a pH 8,5, la productividad decaía un 20%, disminuyendo a pH 9 hasta 65% con respecto al máximo. El análisis de la varianza indica que el pH es una variable estadísticamente significativa en la productividad de biomasa. Así mismo, el análisis estadístico aplicado (test de Tukey) revela la existencia de dos grupos con diferencias estadísticamente significativas, uno para valores de pH comprendidos entre 6,5 y 8 y otro correspondientes al intervalo entre 8,5 y 9. Se seleccionó 7,5 como valor óptimo de pH para el cultivo de *C.vulgaris*, valor intermedio

dentro del intervalo donde esta microalga presentaba sus valores máximos de productividad y fijación fotosintética de CO₂.

A pH 7,5, 25°C y una velocidad de dilución de 0,4d⁻¹, el cultivo alcanzaba elevadas densidades celulares de 1,5±0,1 g de biomasa l⁻¹, poseyendo la biomasa un elevado contenido energético de 20 kJ g⁻¹.

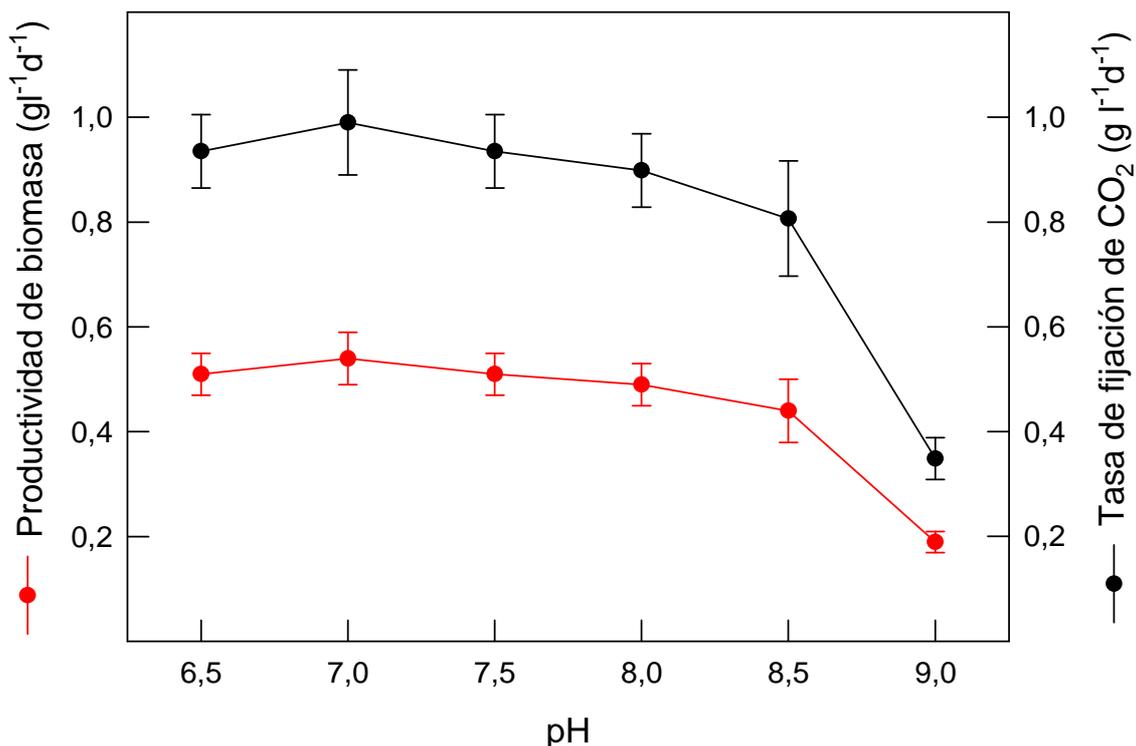


Figura 37. Efecto del pH sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ de cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo. Condiciones de cultivo: D 0,4 d⁻¹, Temperatura 25°C, I_{max} 3000 μE m⁻² s⁻¹, 20mM NO₃⁻

En cuanto a la composición bioquímica de la biomasa generada, el contenido de proteínas era máximo a pH 7,5 (próximo al 50%), descendiendo a pH más ácidos y alcalinos, pero sin ser nunca inferior al 40% de la biomasa. El contenido en lípidos no se modificó con el pH, oscilando entre un 20 y 25% de la biomasa generada. A pH más extremos, dentro del intervalo analizado, el contenido en carbohidratos, era mayor (23%) que a pH 7,5-8 (18%). Un patrón similar se observó para el contenido en almidón, que era notablemente superior para los valores más bajos y más elevados de pH, representando el almidón a pH 8,5 o 9 hasta un 66% de los carbohidratos totales. La productividad en almidón de los cultivos de *C.vulgaris* registraba su máximo (60 mg l⁻¹ d⁻¹) a pH 8,5 (Figura 38).

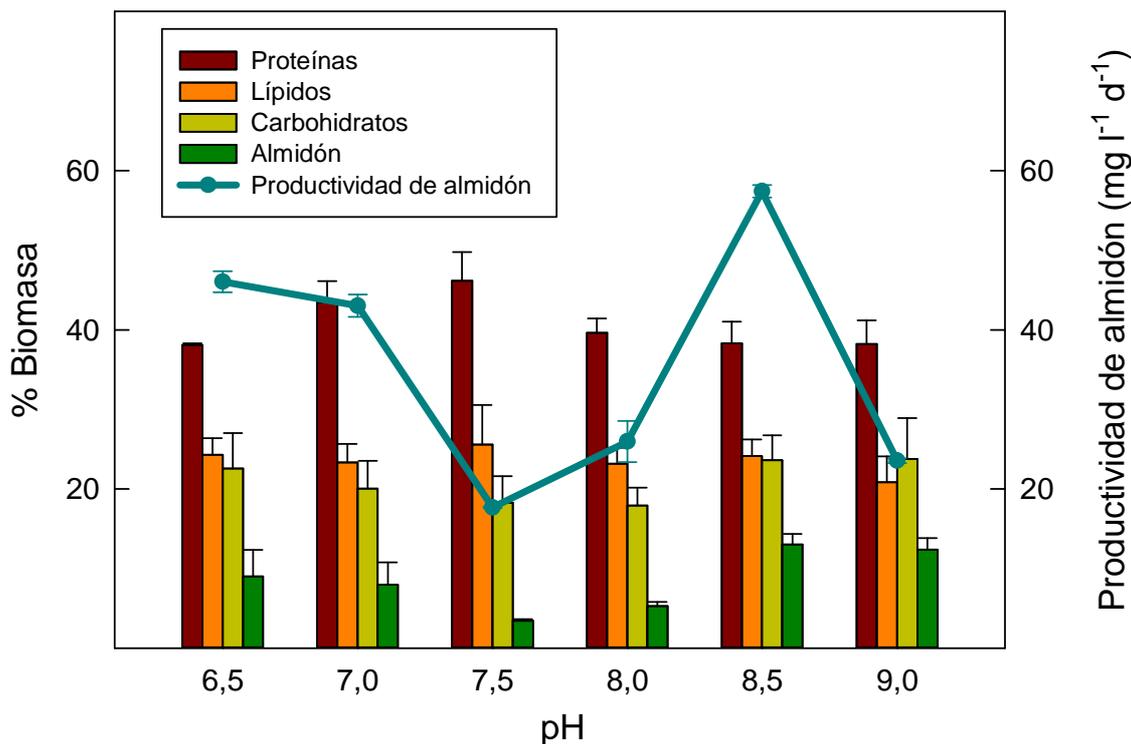


Figura 38. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo a diferentes valores de pH. Condiciones de cultivo como las descritas en la Figura 37

Efecto de la temperatura

Se ha evaluado la respuesta de los cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo a la temperatura, dentro de un intervalo amplio de valores, desde 15 a 35°C.

Los cultivos presentaron una amplia tolerancia a este factor, mostrando los valores más altos para productividad de biomasa y fijación fotosintética de carbono entre 15 y 25°C. A 20 y 25°C, el rendimiento del cultivo fue ligeramente superior a los 0,5 g l⁻¹ d⁻¹, asimilando casi 1 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹. A 30°C, disminuían la productividad de biomasa y la fijación de carbono un 50% con respecto al máximo obtenido a 20 y 25°C. A 35°C los cultivos en régimen continuo eran inviables (Figura 39).

Una vez alcanzados los distintos estados estacionarios, se evaluó la composición bioquímica y el calor de combustión de la biomasa, determinándose la densidad celular y el contenido en C y N. A 20 y 25°C, la concentración de biomasa una vez alcanzado el estado estacionario era cercana a 1,3 g l⁻¹, disminuyendo un 40% (0,77 g l⁻¹) a 30°C. El calor de combustión de la biomasa generada se mantuvo en 20 kJ g⁻¹.

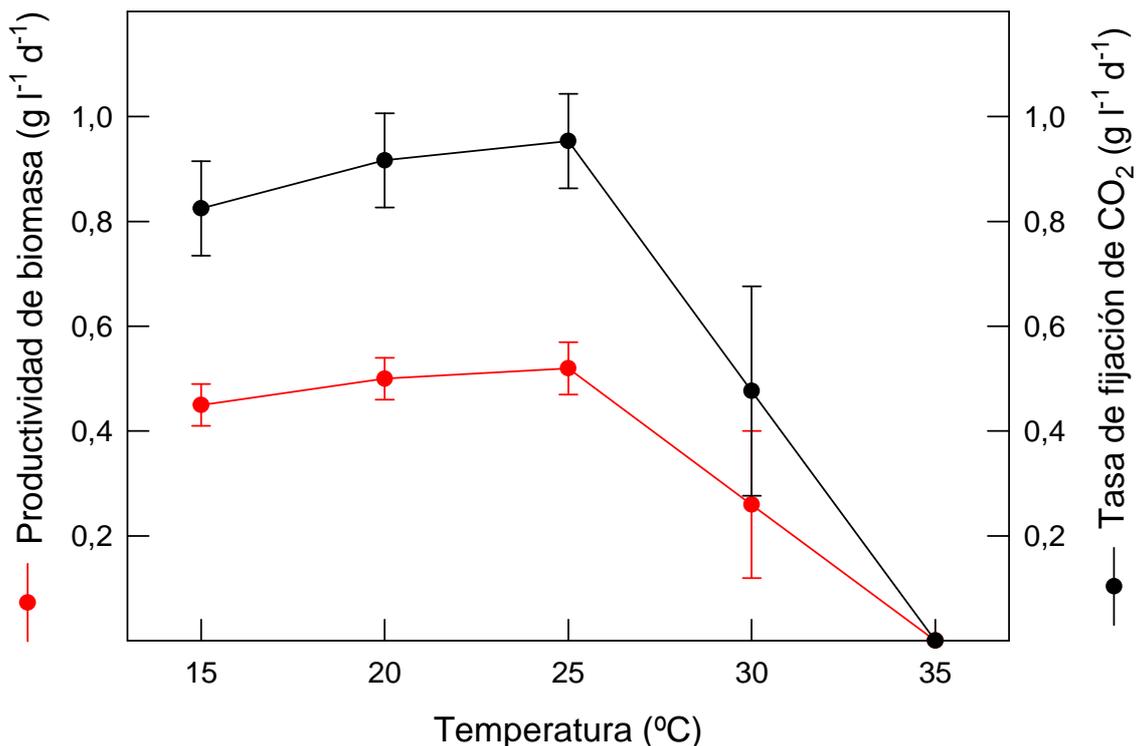


Figura 39. Efecto de la temperatura sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ de cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo. Condiciones de cultivo: D: 0,4 d⁻¹, pH: 7,5, I_{max}: 3000 μE m⁻² s⁻¹, 20mM NO₃⁻

En cuanto a la composición bioquímica (Figura 40), el contenido en proteínas entre 15 y 25°C fue constante, correspondiendo al 50% del total de la biomasa generada. Sin embargo, a 30°C, el contenido en proteínas descendió hasta un 37%, determinando una razón C/N de 6,1, muy superior al 4,7 obtenido a 20 y 25°C. El exceso de C asimilado debería incorporarse como lípidos y/o carbohidratos. A 30°C, el carbono de nueva fijación se distribuía en partes equivalentes entre proteínas, lípidos y carbohidratos, con mayor proporción de estos últimos compuestos (30% de la biomasa) que en los correspondientes a las otras temperaturas ensayadas (15%). El contenido en lípidos se mantuvo entre 28 y 35% de la biomasa en todos los casos. A temperaturas entre 15 y 25°C, el almidón representaba el 10-15% del total de carbohidratos. A 30°C esta proporción subió hasta el 25%, alcanzando el máximo de productividad en almidón (20mg l⁻¹ d⁻¹).

El análisis de la varianza indicó una influencia estadísticamente significativa de la temperatura en la productividad de biomasa. El análisis estadístico aplicado (test de Tukey) evidenció la existencia de dos grupos de respuesta a la temperatura, uno correspondiente al intervalo de 15 a 25°C, y el otro correspondiente a los valores de 30 y 35°C. La temperatura óptima seleccionada fue 20°C, valor intermedio en el intervalo de temperaturas en el que la productividad de *C. vulgaris* era máxima.

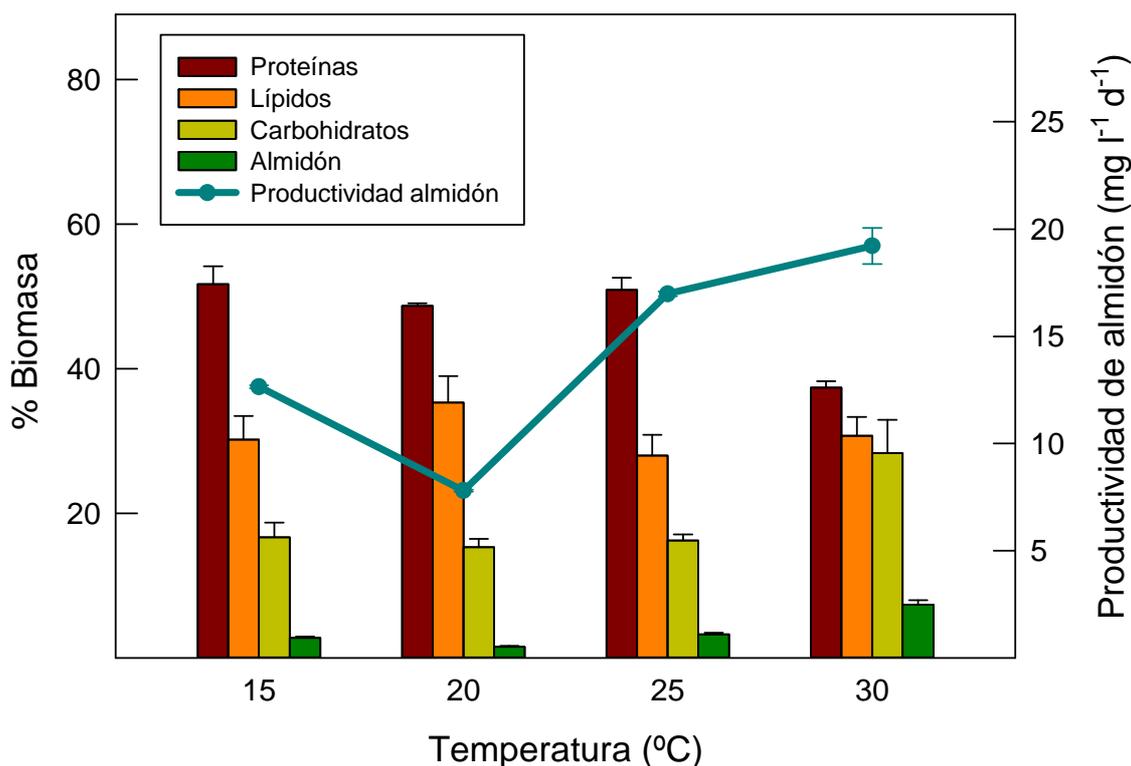


Figura 40. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de *C. vulgaris* en régimen continuo a diferentes temperaturas. Condiciones de cultivo como las descritas en la Figura 39

Efecto de la velocidad de dilución

Se ha evaluado la respuesta de los cultivos de *C. vulgaris* a la velocidad de dilución en un intervalo amplio de valores de dilución (D), desde $0,2 \text{ d}^{-1}$ a $1,1 \text{ d}^{-1}$ (Figura 41).

El rendimiento más alto se observó dentro del intervalo comprendido entre $0,5$ y $0,8 \text{ d}^{-1}$, siendo los valores máximos de $0,7 \text{ g de biomasa l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A velocidades de dilución más bajas, no se comprometía excesivamente el rendimiento de los sistemas, disminuyendo apenas un 15-20% la productividad. En cambio, a alta tasa de dilución, se registraba una caída drástica de dicha productividad, entre un 50 y 75% con respecto al valor máximo obtenido a $0,5 \text{ d}^{-1}$. El análisis de la varianza indicaba que la velocidad de dilución era una de las variables más influyentes en el comportamiento de los cultivos de *C. vulgaris*. Así mismo, el test de Tukey indicó la existencia de tres grupos de respuesta estadísticamente diversos dentro de los resultados. Dentro del intervalo con mejor respuesta ($0,5$ a $0,8 \text{ d}^{-1}$) se seleccionó $0,5 \text{ d}^{-1}$, que permitía trabajar con cultivos más densos ($1,4 \text{ g l}^{-1}$).

El análisis bioquímico de la biomasa generada (Figura 42) corroboró que a baja tasa de dilución, cuando la relación C/N era de 6,0, el contenido en proteínas era bajo, suponiendo un 30% de la biomasa. Sin embargo, a valores más altos de diluciones representaba del orden del 50%, con una relación C/N de aproximadamente 5. El contenido en lípidos, fue mayor a baja velocidad de dilución, sobrepasando el 40% de la biomasa generada a 0,2 y 0,3 d^{-1} . Sin embargo, al incrementar la velocidad de aporte de medio, el contenido lipídico disminuyó hasta el 25% de la biomasa. Por otro lado, el contenido en carbohidratos siguió un comportamiento inverso al lipídico, aumentando al hacerlo la velocidad de dilución (25% de la biomasa a 1,1 d^{-1}). El contenido en almidón siguió un comportamiento similar, acumulándose más a mayor D. La mayor productividad de almidón se encontró a 0,9 d^{-1} , con valores de 30 $mg\ l^{-1}\ d^{-1}$. A 1,1 d^{-1} , a pesar de poseer un contenido en almidón cercano al 10% de su biomasa, el bajo rendimiento en biomasa determinaba una productividad de almidón de solo 18 $mg\ l^{-1}\ d^{-1}$.

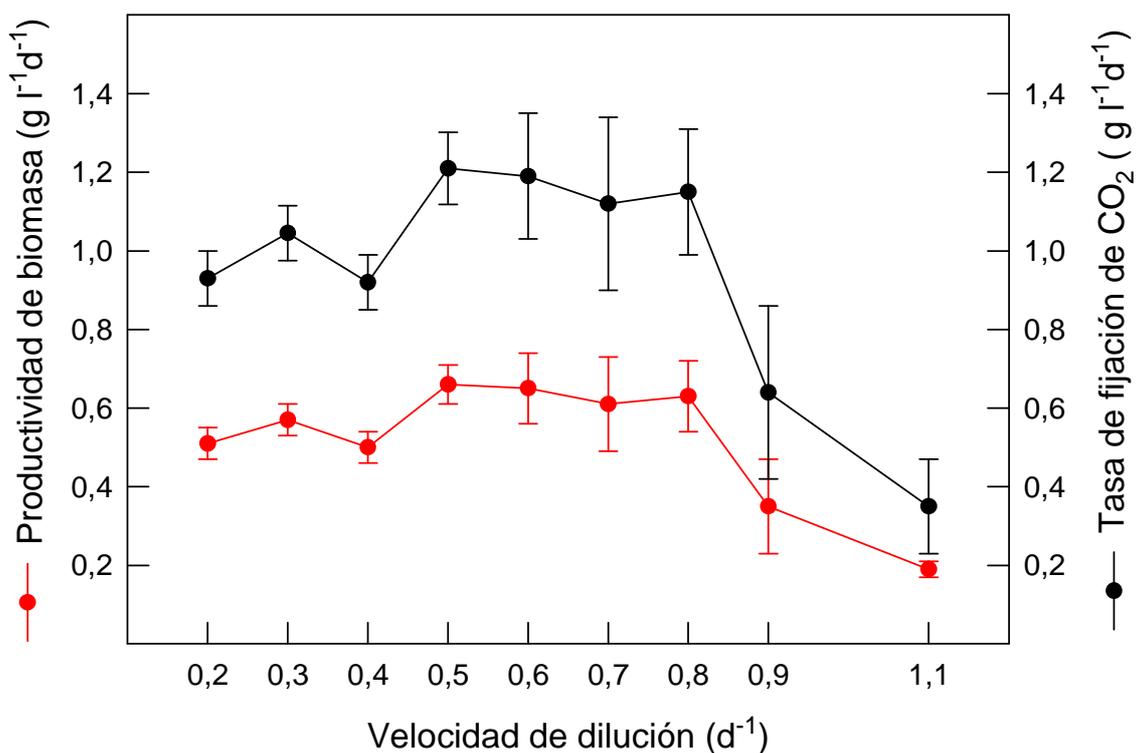


Figura 41. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO_2 de cultivos de *C. vulgaris* en régimen continuo. Condiciones de cultivo: Temperatura 20°C, pH 7,5, I_{max} 3000 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, 20mM NO_3^-

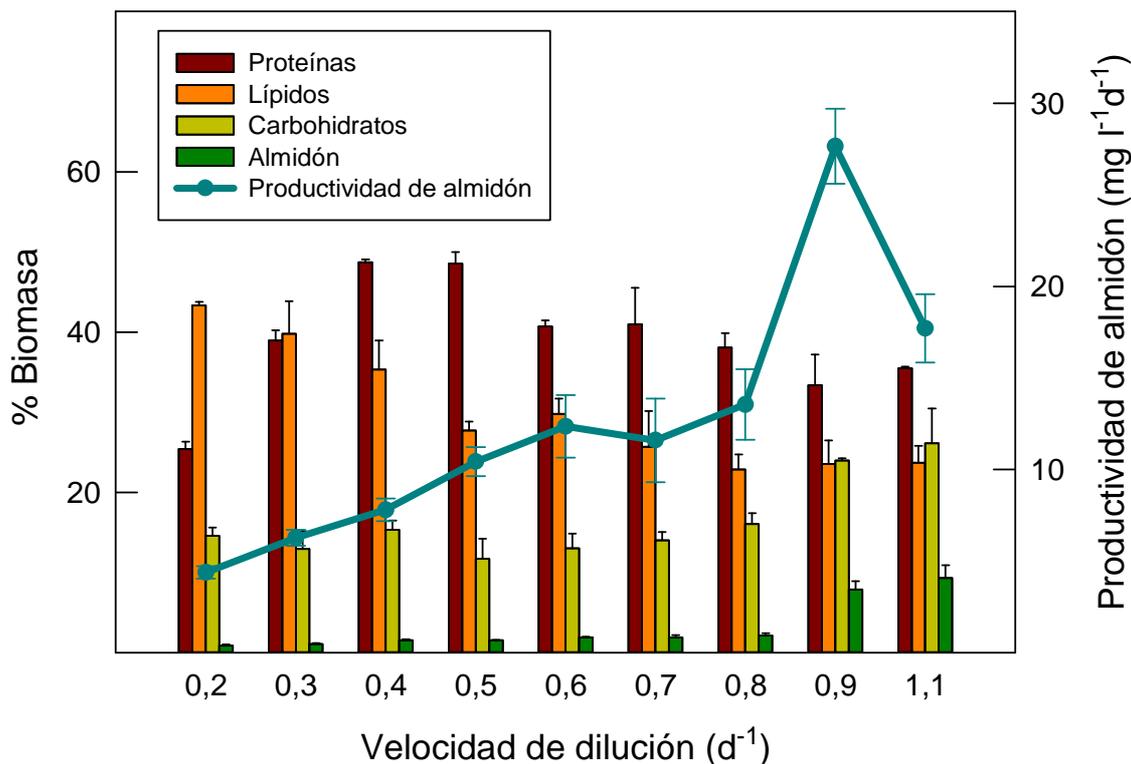


Figura 42. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de *C. vulgaris* en régimen continuo a diferentes velocidades de dilución. Condiciones de cultivo como las descritas en la Figura 41

Efecto conjunto de temperatura e irradiancia

Operando en condiciones óptimas respecto de las variables ya optimizadas de pH (7,5) y velocidad de dilución (0,5 d⁻¹), se evaluó el efecto de diferentes irradiancias a diferentes temperaturas. Las combinaciones fueron:

- 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 15,20,30 y 35°C
- 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 15,20,30 y 35°C
- 3000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 15,20,30 y 35°C (0,4 d⁻¹)

La máxima productividad de biomasa se obtenía a 20°C, independientemente de la irradiancia incidente (Figura 43), manifestándose un claro descenso de productividad a 30°C. A 35°C ningún cultivo fue viable.

Al analizar el efecto de la irradiancia a la temperatura óptima de 20°C, se observa un mayor rendimiento de los cultivos al máximo valor de irradiancia ensayado

(Figura 44). A $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la productividad decayó un 35% mientras que a $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, caía aún más, en torno al 60%.

El análisis de la varianza mostró que la irradiancia tenía una influencia positiva en la productividad de biomasa, con los mayores rendimientos a $3000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 44). Aplicando el test de Tukey se encontraron diferencias significativas dentro de cada irradiancia para las diferentes temperaturas, exceptuando los casos de $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 15 y 20°C .

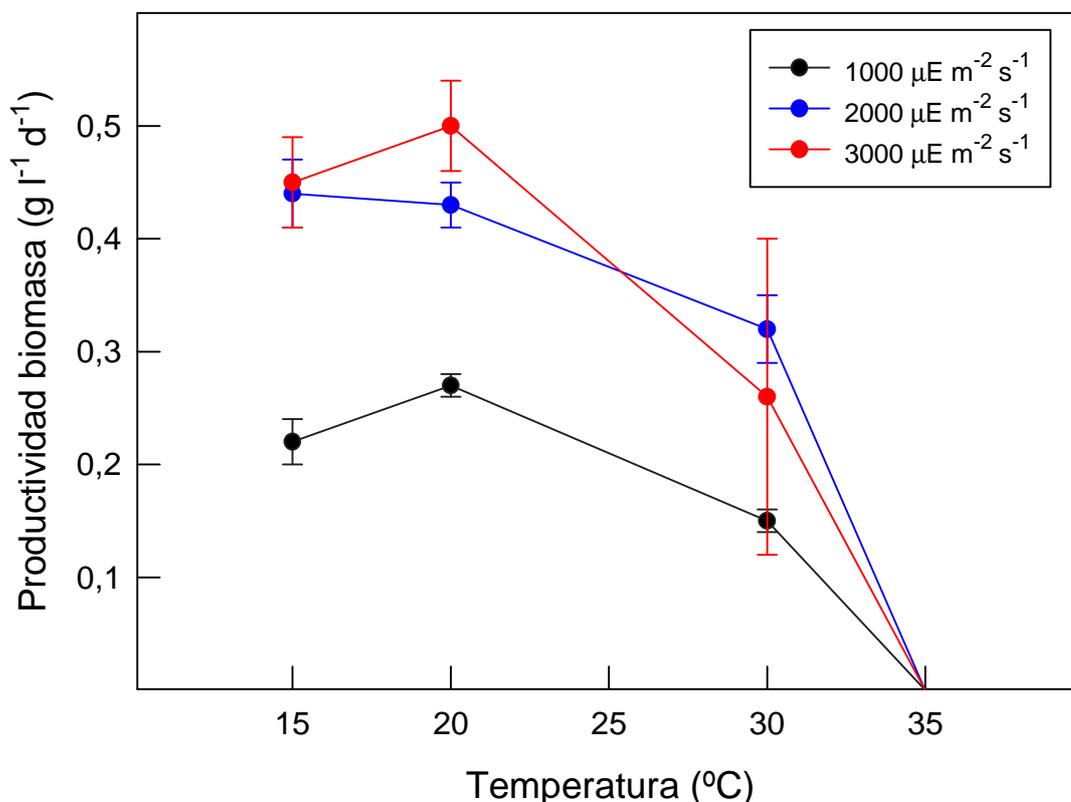


Figura 43. Productividad de biomasa de *C.vulgaris* en cultivo continuo a diferentes temperaturas e irradiancias máximas incidentes. D: $0,5 \text{ d}^{-1}$ para 1000 y $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; D: $0,4 \text{ d}^{-1}$ para $3000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Al analizar la composición de la biomasa de los cultivos sometidos a una irradiancia máxima incidente de $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quedó patente que el mayor contenido proteico se registraba a la temperatura más baja ensayada, mientras que el de lípidos era prácticamente constante, independientemente de la temperatura de cultivo. El mayor contenido en carbohidratos se encontró, sin embargo, a la temperatura más alta ensayada (30°C), condición en la que el nivel de almidón era también más elevado, representando el 40% de los carbohidratos totales. A esta

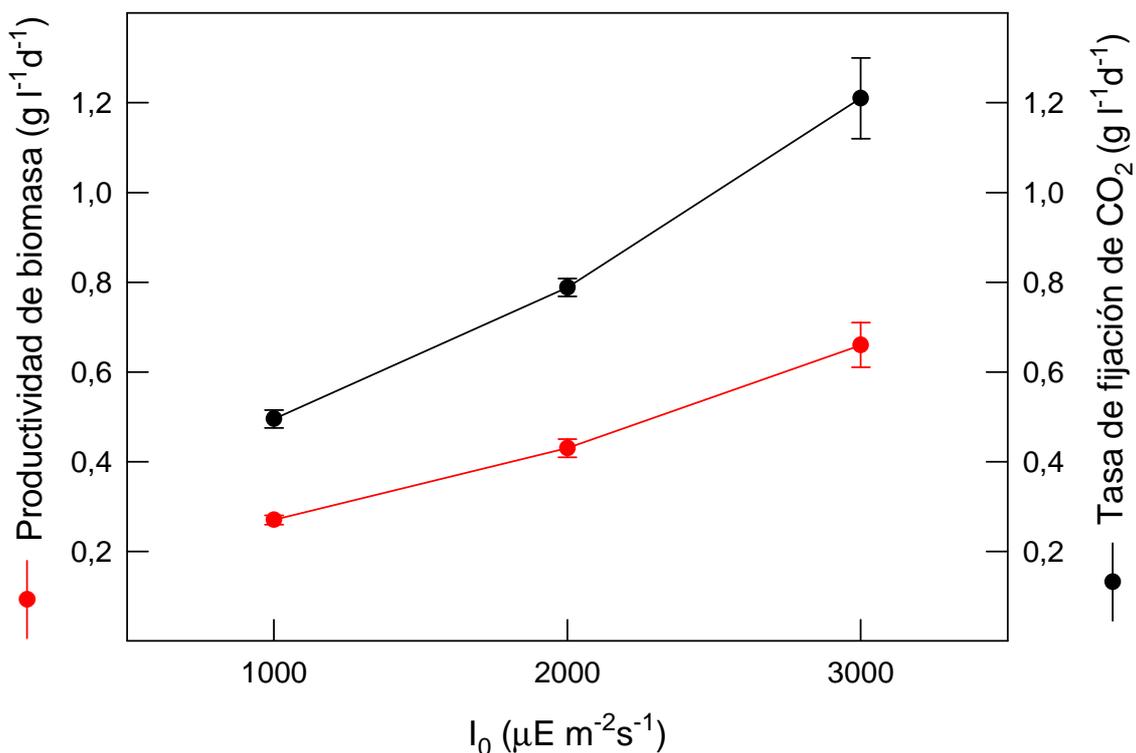


Figura 44. Rendimiento de los cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo a diferentes irradiancias máximas incidentes. Condiciones de cultivo, pH: 7,5, temperatura: 20°C, D: 0,5 d⁻¹, 20mM NO₃⁻

temperatura la productividad de almidón era, asimismo, la más alta (25 mg l⁻¹ d⁻¹) (Figura 45A).

A 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido máximo de carbohidratos se registró a 20°C, temperatura a la que era también máximo el contenido en almidón, que alcanzaba un 8% de la biomasa (Figura 45B). La productividad de almidón a 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ era igualmente máxima a 20°C, aproximándose a 30 mg l⁻¹ d⁻¹.

Como se ha descrito anteriormente, (Figura 40) a 3000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el contenido proteico era superior al 50% de la biomasa para 15 y 25°C, disminuyendo a 30°C, siendo constante el contenido lipídico a cualquier temperatura. El contenido en carbohidratos fue máximo a 30°C, representando el 25% de la biomasa y con una productividad de almidón de 20 mg l⁻¹ d⁻¹.

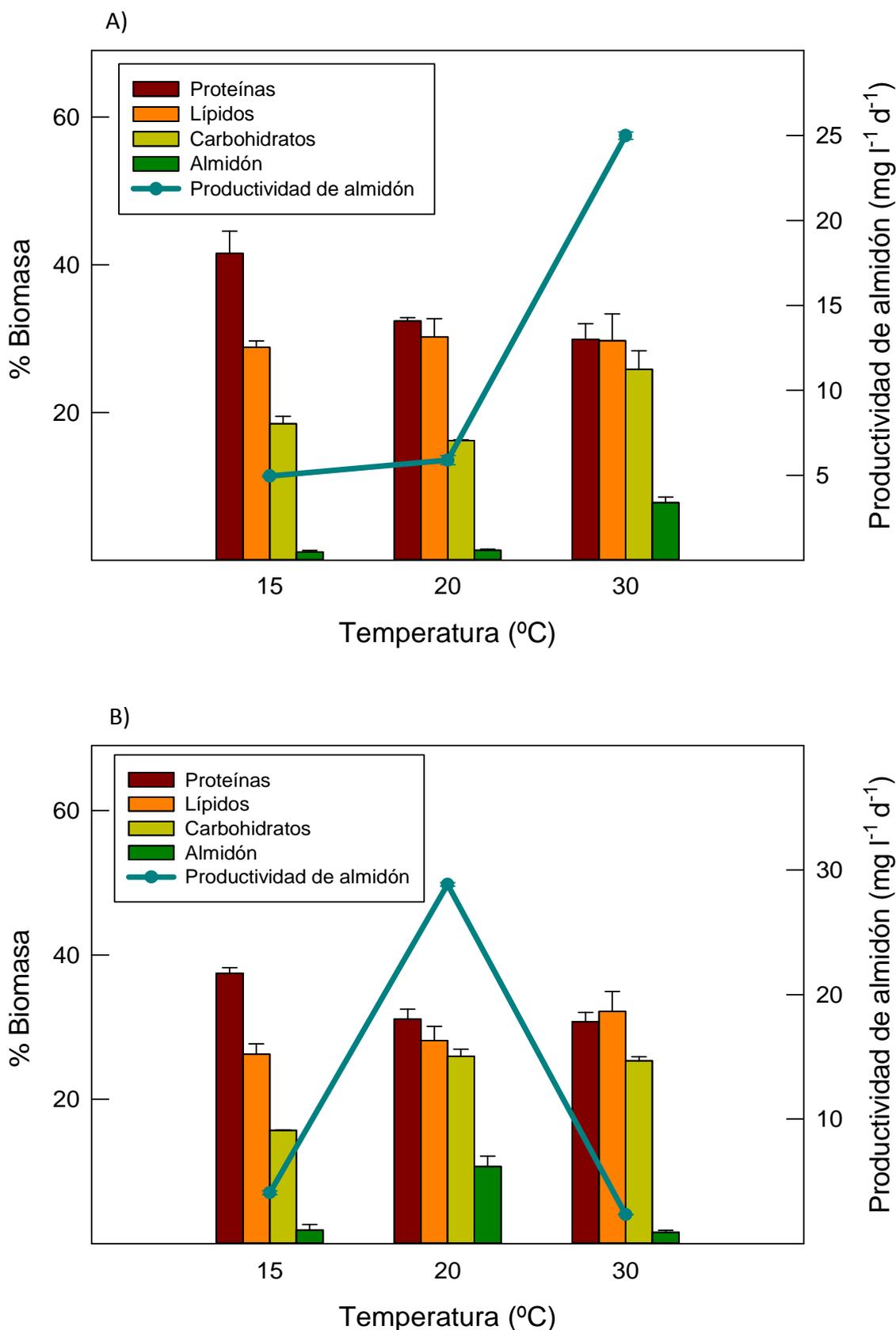


Figura 45. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo a diferentes temperaturas para valores de irradiancia máxima incidente de 1000 (A) y 2000 (B) $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes temperaturas. Las condiciones de cultivo como las descritas en Figura 43.

Efecto de la disponibilidad de NO₃⁻ sobre el cultivo continuo de Chlorella vulgaris

Una vez completada la caracterización de las variables que influyen en el crecimiento de *C.vulgaris* en fotoquimiostato y establecidas las condiciones óptimas para el cultivo en régimen continuo, se ha procedido a valorar el efecto del aporte de una fuente de nitrógeno combinado sobre el crecimiento de esta microalga.

Los cultivos se operaron a las condiciones óptimas establecidas: pH, 7,5; temperatura, 20°C; velocidad de dilución, 0,5 d⁻¹; irradiancia máxima incidente 3000 μE m⁻² s⁻¹. Los valores de concentración para el nitrato presente en el medio fresco de aporte eran: 1, 5, 10 y 20 mM.

La concentración de biomasa en el estado estacionario en los cultivos con 1, 5 y 10 mM de nitrato fue marcadamente inferior a la de aquellos con 20mM de NaNO₃. En los cultivos en que la concentración de nitrato era menor de 20 mM, el contenido en N de la correspondiente biomasa era inferior al 10%, lo que se traducía en valores de la razón C/N superiores a 5, más elevados cuanto menor era la concentración de nitrato en el medio fresco (Tabla 16). No obstante, el calor de combustión de la biomasa era análogo en todos los casos y próximo a 20 kJ g⁻¹.

Tabla 16. Biomasa acumulada y razón C/N en estado estacionario en cultivo continuo de *C.vulgaris* a diferentes concentraciones de nitrato aportado en el medio. Condiciones de cultivo: pH 7,5, temperatura 20°C, D 0,5 d⁻¹, I_{max} 3000 μE m⁻² s⁻¹

NaNO ₃ (mM)	Biomasa (g l ⁻¹)	C/N
1	0,3±0,0	8,27
5	0,8±0,1	6,78
10	0,8±0,2	5,55
20	1,4±0,1	4,96

Tomando como valor de referencia el obtenido para el caso de medios con 20 mM de nitrato, los cultivos de *C. vulgaris* con bajo aporte de nitrato vieron comprometida su productividad. Así, a 1mM ésta era un 80% inferior que a 20 mM, mientras que a 5 y 10 mM se alcanzaba una productividad del orden del 40% de la de referencia (Figura 46). En cuanto a la tasa de fijación de CO₂, los cultivos a 20 mM de nitrato asimilaban un 40% más de carbono que los cultivos a 5 y 10 mM y un 80% más que los cultivos con un aporte de nitrato de 1 mM.

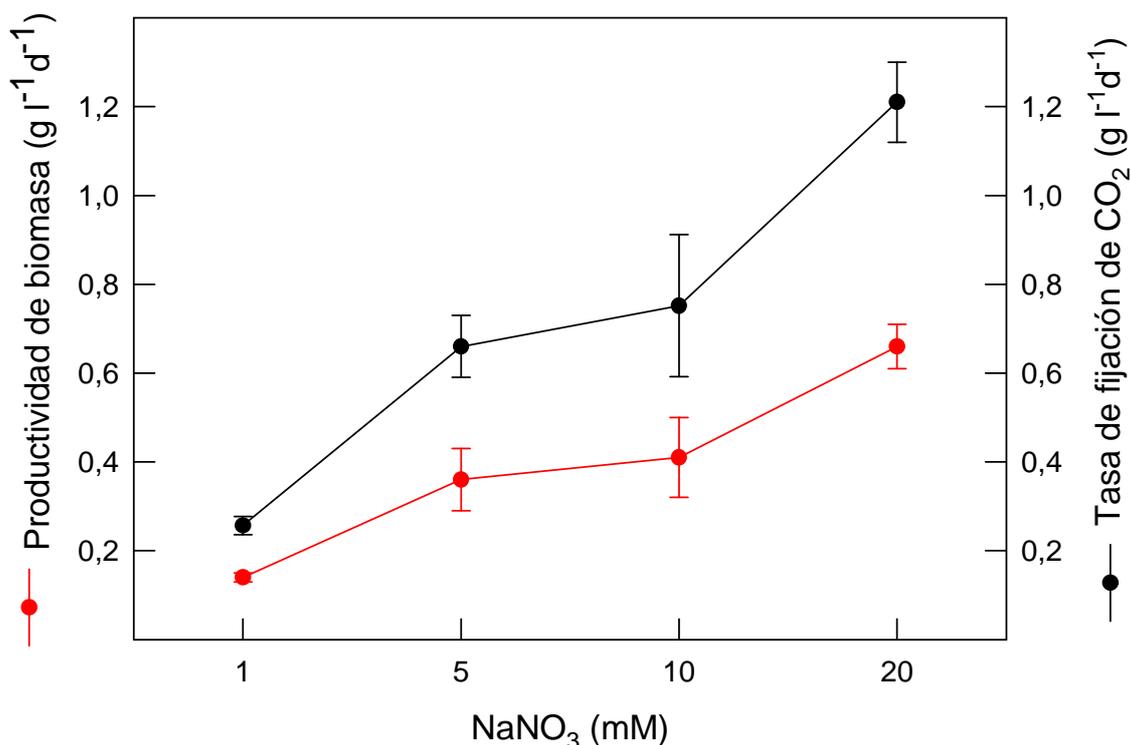


Figura 46. Productividad y tasa de fijación de CO₂ de cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo a diferentes concentraciones de NaNO₃. Condiciones de cultivo: pH 7,5, temperatura 20°C, D 0,4 d⁻¹, I_{max} 3000 μE m⁻² s⁻¹

El análisis de la varianza permitió establecer que el aporte de nitrato tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la productividad de biomasa. Así mismo, la respuesta de los cultivos al aporte de nitrato mostraba tres grupos diferentes estadísticamente 1mM, 5 y 10 mM, y 20mM de NaNO₃.

La composición de la biomasa generada se afectaba por el nivel de aporte de nitrato en el medio (Figura 47). El contenido en proteínas se hacía mayor conforme lo hacía la concentración de nitrógeno combinado. Así, a 1mM conformaban apenas el 20% de la biomasa generada, mientras que a 5mM, aumentaba al doble (40%). A concentraciones de nitrato superiores a 10mM, el contenido en proteínas alcanzó al igual que a 20mM, el 50% del total. La acumulación de lípidos estuvo más favorecida a bajo nitrato, suponiendo a 1mM, más del 40% de la biomasa. A mayor concentración de nitrato, el contenido lipídico era menor y se mantenía constante, formando entre el 20 y 25% de la biomasa generada. El contenido en carbohidratos se incrementaba a bajo aporte de nitrato, mostrando valores más bajos a altas concentraciones del mismo. El almidón, siguió la misma pauta, acumulando hasta un 20% del mismo a 1mM de NaNO₃. La productividad del mismo era máxima cuando el cultivo se operaba a 5mM de nitrato, rindiendo valores superiores a 50 mg l⁻¹ d⁻¹.

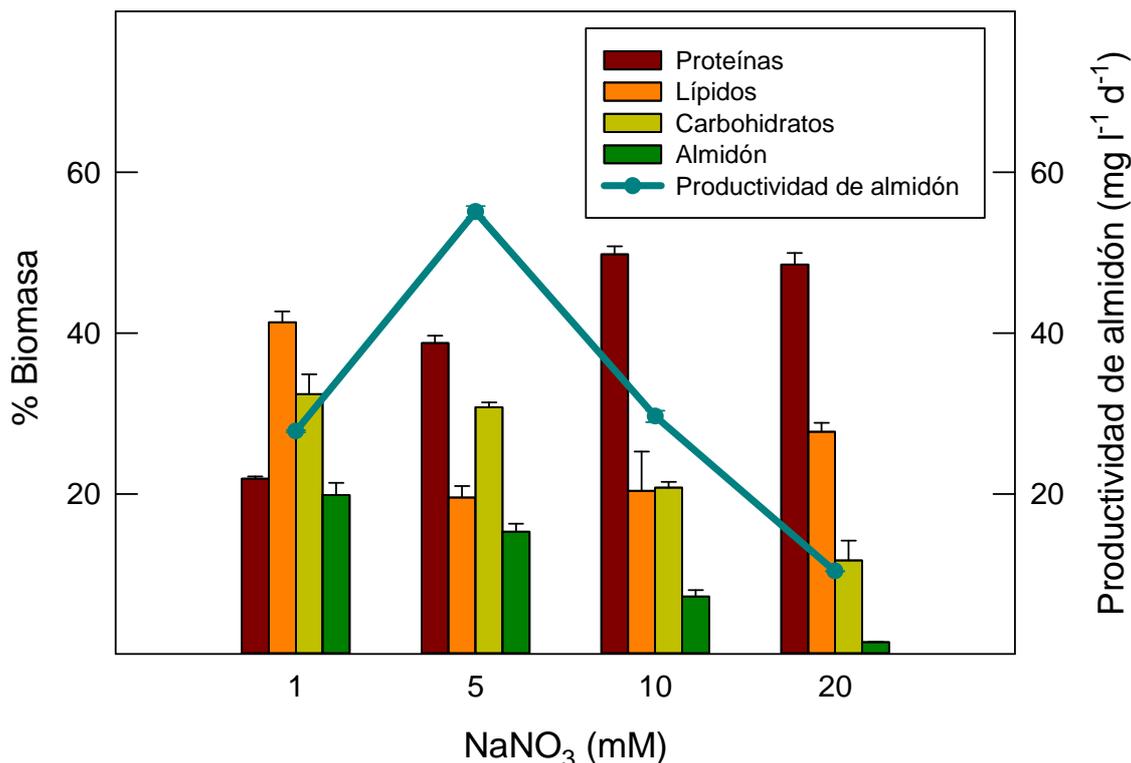


Figura 47. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de *C. vulgaris* en régimen continuo para diferentes concentraciones de nitrato en el medio de aporte. Condiciones de cultivo como las descritas en la Figura 46

Evolución de la acumulación de almidón a lo largo del periodo luminoso

En el curso de las experiencias descritas en el apartado anterior, se analizó en paralelo la evolución de los niveles de almidón a lo largo del periodo luminoso. A este fin, se tomaron muestras de biomasa antes del inicio del periodo luminoso y en distintos estadios del ciclo de luz, a los que correspondían distintos valores de irradiancia luminosa incidente analizando su contenido en almidón (Figura 48). Al final del periodo de oscuridad, el contenido en almidón de la biomasa era inferior al 3%. El nivel de celular de almidón aumentaba por efecto de la exposición a la luz, si bien lo hacía en distinta magnitud, dependiendo de la concentración de nitrato en el medio de aporte. Así, cuando la concentración de nitrógeno presente en el medio fresco era elevada (10-20 mM), el contenido en almidón se cuadruplicaba tras 12 horas de luz, alcanzando su nivel cerca del 10% de la biomasa. Cuando la disponibilidad de N era de solo 1 mM, el nivel de almidón se multiplicaba por diez en el mismo tiempo, llegando a suponer hasta un 30% de la biomasa al final del ciclo de iluminación. En el caso de 5 mM de NaNO_3 , el comportamiento era intermedio entre las dos situaciones descritas, con niveles de almidón de alrededor del 20% del peso seco tras 12 h de iluminación.

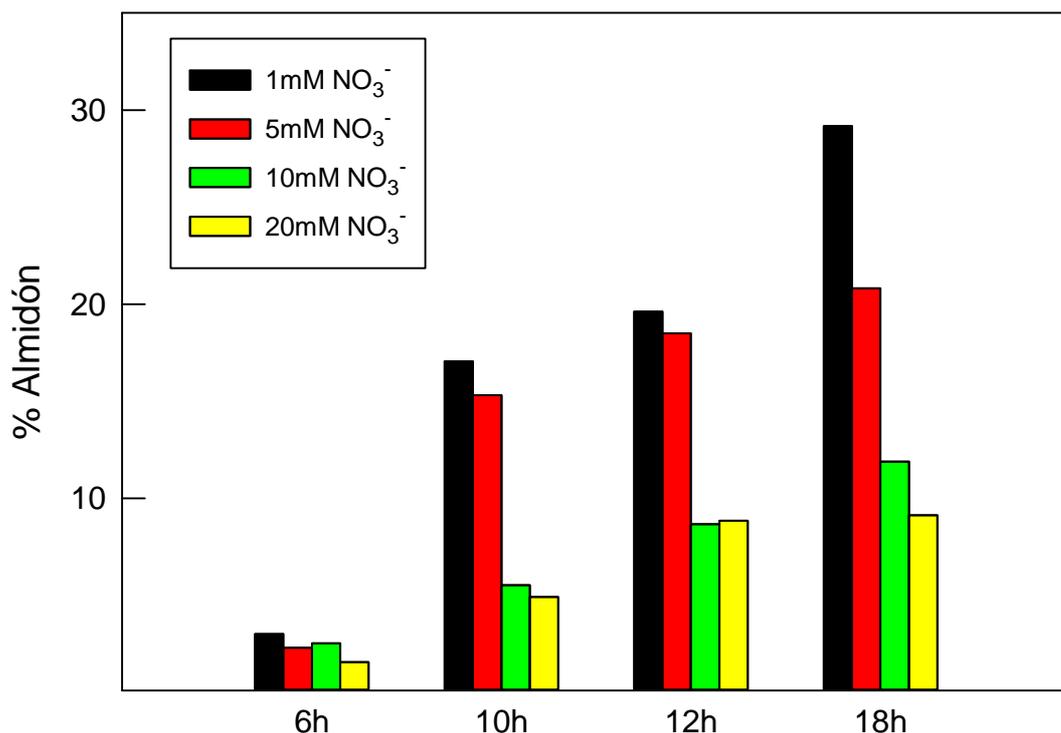


Figura 48. Evolución de la acumulación de almidón durante el periodo luminoso de cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo. Condiciones de cultivo descritas en la Figura 46

Maximización de la productividad de almidón y evolución diaria de su nivel celular

El análisis de la productividad de almidón en las distintas condiciones de cultivo ensayadas permitió derivar una combinación de valores de las variables determinantes, potencialmente óptima, que permitiría obtener el máximo rendimiento de almidón por cultivo de *C. vulgaris* operando en régimen continuo. En dichas condiciones se siguió la evolución del contenido de almidón a lo largo de un ciclo diario completo (Figura 49).

A lo largo del ciclo, el contenido en almidón nunca fue inferior al 5% del peso seco, registrado al final del periodo en oscuridad (6h), mientras que en los periodos de máxima acumulación llegaba a superar el 20% de la biomasa, correspondiendo con el final del periodo de máxima irradiancia (18h). En estas condiciones optimizadas, la productividad de almidón era de $65\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$.

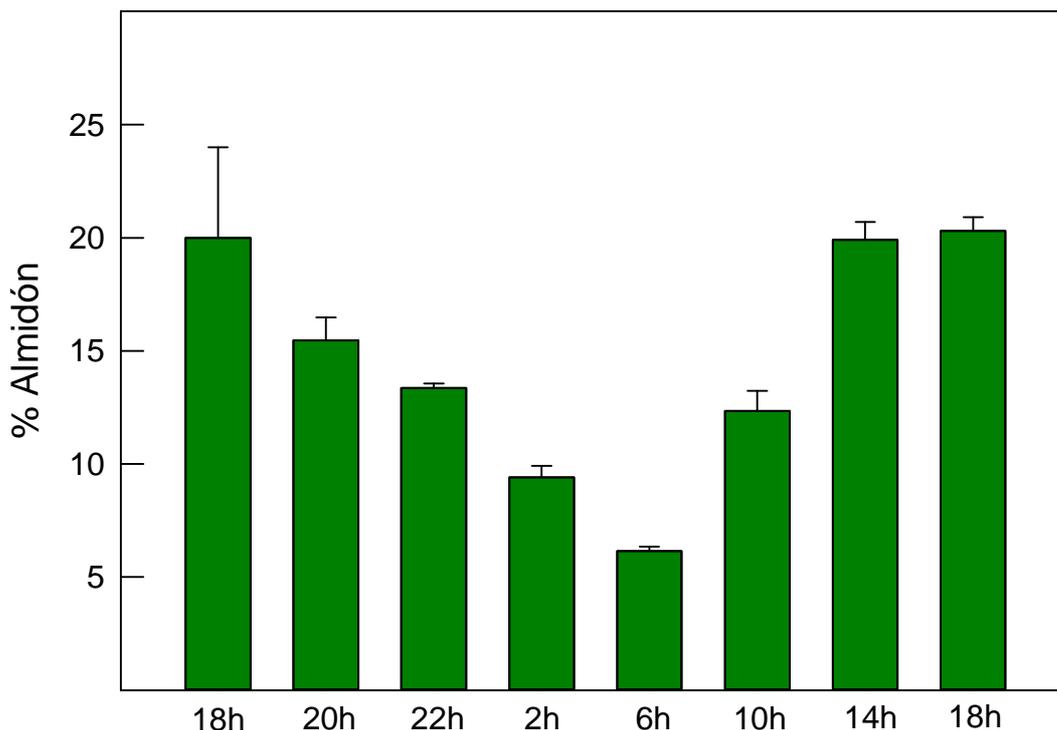


Figura 49. Evolución de la concentración de almidón en la biomasa de *C.vulgaris* cultivada en régimen continuo. Condiciones de cultivo: pH 7,5, temperatura 25°C, D 0,9d⁻¹, I_{max} 3000 μE m⁻² s⁻¹, y 5mM NO₃⁻

Modelo de crecimiento y fijación de CO₂ de Chlorella vulgaris en cultivo continuo

El tratamiento estadístico de los resultados procedentes de las experiencias realizadas con cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo, indicó que el crecimiento de la microalga en dichas condiciones estaba afectado por distintas variables, que ordenadas por grado de influencia eran: irradiancia promedio (I_{av}), temperatura, suministro específico de nitrato (SEN) y pH. Por tanto, se desarrolló un modelo atendiendo a la posible variación de estos parámetros. La estrategia fue la misma que la empleada para el caso de *S.vacuolatus*. Esto es, desarrollar un modelo que justifique las variaciones en la tasa de crecimiento según la variable más influyente (en este caso, irradiancia promedio) e ir completando y afinando secuencialmente este modelo considerando el resto de variables por orden de influencia. Es decir, el modelo propuesto para la I_{av}, se complementó con la influencia de temperatura, de SEN, y por último de pH. Hay que decir que, conforme se acumulaba la influencia de los distintos factores a la función que determinaba el crecimiento de *C.vulgaris*, los parámetros de

ajuste de las diferentes funciones, se modificaban, tratando de ajustar el comportamiento de la microalga con el propuesto por el modelo.

Definición de un modelo de crecimiento en función de la irradiancia promedio

A partir del espectro de absorción de *C.vulgaris* (Figura 50), se determinó que el valor de K_a era $0,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. A partir de los valores de irradiancia promedio calculados para los estados estacionarios alcanzado en distintas condiciones, se estableció su correlación con los valores correspondientes de velocidad de crecimiento (Figura 51).

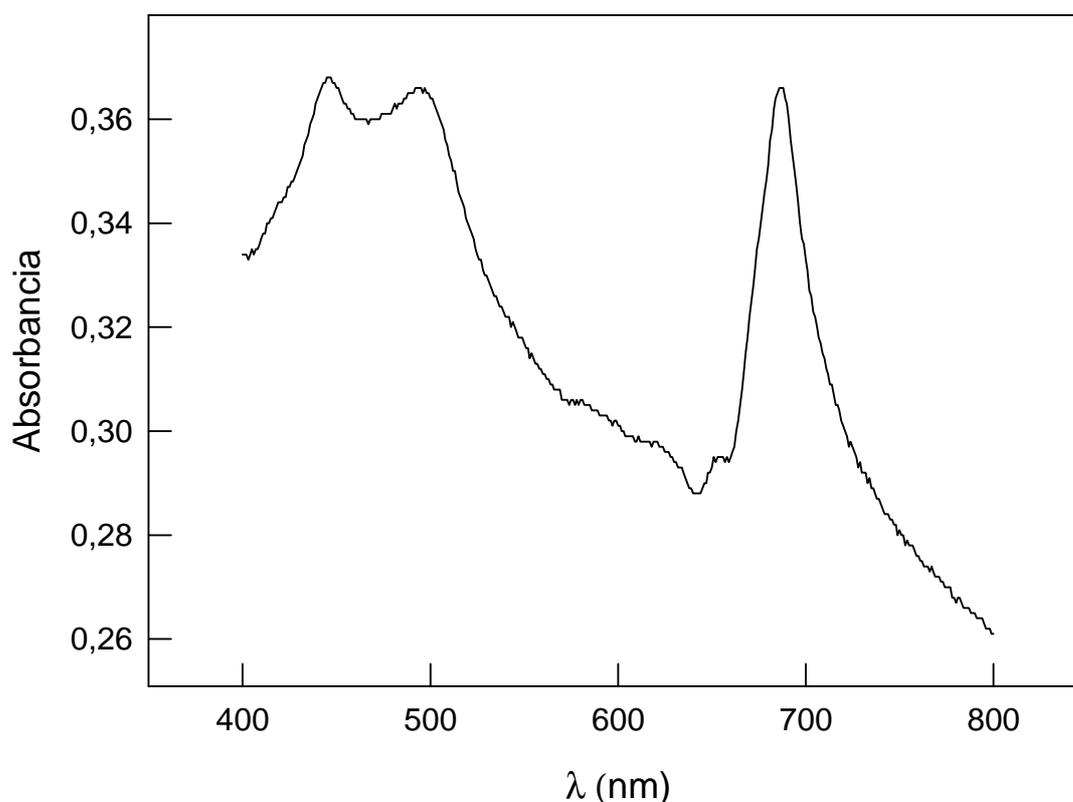


Figura 50 Espectro de absorción de *Chlorella vulgaris*

El comportamiento observado se correspondía con el modelo definido por la Ecuación 10 (página 88) (Molina-Grima 1994). Ajustando los datos experimentales a dicha ecuación por regresión no lineal se obtuvieron los siguientes parámetros característicos ($r^2=0,93$):

- $\mu_{\max}=1 \text{ d}^{-1}$
- $n=2$
- $I_k=30 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

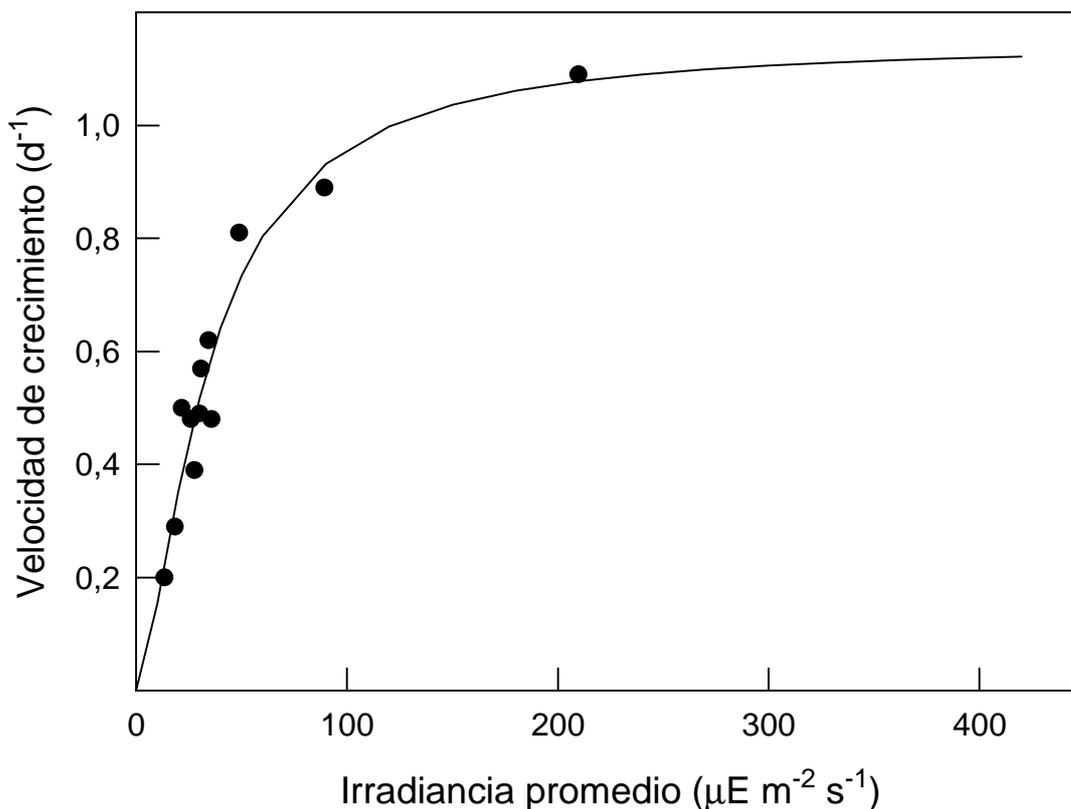


Figura 51. Variación de la velocidad específica de crecimiento con la irradiancia promedio en cultivos continuos de *Chlorella vulgaris*

El valor obtenido para la constante de semi-saturación para la irradiancia I_k , ($30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) indica una notable aidez por la luz de *C.vulgaris*.

Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia de la temperatura

Establecido un modelo de crecimiento para la variable más influyente en el crecimiento de *C.vulgaris*, era necesario complementarlo con el efecto de la siguiente variable más influyente, la temperatura, aplicando la ecuación de Arrhenius (Ecuación 11) de manera análoga al caso de *S.vacuolatus* (Ecuación 12, página 88) Los valores obtenidos mediante regresión no lineal fueron ($r^2=0,9$):

- $\mu_{\text{max}}=1,4 \text{ d}^{-1}$
- $n=2$
- $I_k=50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- $A_1=3 \cdot 10^5 \text{ d}^{-1}$
- $Ea_1=3 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$
- $A_2=1 \cdot 10^{12} \text{ d}^{-1}$
- $Ea_2=7 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$

Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia de la disponibilidad de nitrato

La siguiente variable que más influía en el comportamiento de los cultivos de *C.vulgaris* era la disponibilidad de nitrato, medida como SEN (Suministro específico de nitrato, $\text{mmol g}^{-1} \text{d}^{-1}$), y determinada por la Ecuación 13:

$$\text{SEN} = \frac{\text{NO}_3^- (\text{mM}) * D (\text{d}^{-1})}{C_b (\text{g l}^{-1})} \quad \text{Ecuación 13}$$

El efecto de SEN sobre el crecimiento de los cultivos de *C.vulgaris* se ajustaba a la Ecuación 14, en la que interviene una constante de semi-saturación para el suministro específico de nitrato, k_{sen} :

$$\mu(\text{SEN}) = \frac{\text{SEN}}{k_{\text{sen}} + \text{SEN}} \quad \text{Ecuación 14}$$

Así la función global que definía la velocidad de crecimiento era:

$$\mu(I_{\text{av}}, T, \text{SEN}) = \left(\frac{\mu_{\text{max}} \cdot I_{\text{av}}^n}{I_k^n + I_{\text{av}}^n} \right) \cdot \left(A_1 \cdot e^{\left(\frac{Ea_1}{RT}\right)} - A_2 \cdot e^{\left(\frac{Ea_2}{RT}\right)} \right) \cdot \left(\frac{\text{SEN}}{k_{\text{sen}} + \text{SEN}} \right)$$

Ecuación 15

Los valores obtenidos por regresión no lineal fueron ($r^2=0,96$):

- $\mu_{\text{max}}=1,53 \text{ d}^{-1}$
- $n=1,49$
- $I_k=35,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
- $A_1=3 \cdot 10^5 \text{ d}^{-1}$
- $Ea_1=3 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$
- $A_2=1,29 \cdot 10^{12} \text{ d}^{-1}$
- $Ea_2=6,9 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$
- $k_{\text{sen}}=2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Ajuste del modelo de crecimiento en función de la influencia del pH

El efecto del pH fue la última de las variables incorporada al modelo de crecimiento, representando una variable de menor influencia. De esta forma, el modelo final propuesto indicaba que el crecimiento de *C.vulgaris* obedece a la Ecuación:

$$\mu(I_{av}, T, SEN, pH) = \left(\frac{\mu_{max} \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n} \right) \cdot \left(A_1 \cdot e^{\left(\frac{Ea1}{RT}\right)} - A_2 \cdot e^{\left(\frac{Ea2}{RT}\right)} \right) \cdot \left(\frac{SEN}{k_{sen} + SEN} \right) \cdot \left(A_3 \cdot e^{\left(\frac{Ea3}{pH}\right)} - A_4 \cdot e^{\left(\frac{Ea4}{pH}\right)} \right)$$

Ecuación 16

Cuyos parámetros más significativos tienen los siguientes valores:

- $\mu_{max}=1,2 \text{ d}^{-1}$
- $n=1,5$
- $I_k=35,5 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
- $A_1=3,67 \cdot 10^5 \text{ d}^{-1}$
- $Ea_1=3,22 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$
- $A_2=2,97 \cdot 10^{12} \text{ d}^{-1}$
- $Ea_2=7,3 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$
- $k_{sen}=2,15 \text{ mmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$
- $A_3=4,97 \text{ d}^{-1}$
- $Ea_3=4,81 \text{ J mol}^{-1}$
- $A_4=3,27 \cdot 10^5 \text{ d}^{-1}$
- $Ea_4=109,4 \text{ J mol}^{-1}$

Los valores de μ predichos por el modelo presentaban un ajuste preciso ($r^2=0,95$) con los datos obtenidos experimentalmente (Figura 52), lo que da buena idea de la bondad del modelo propuesto.

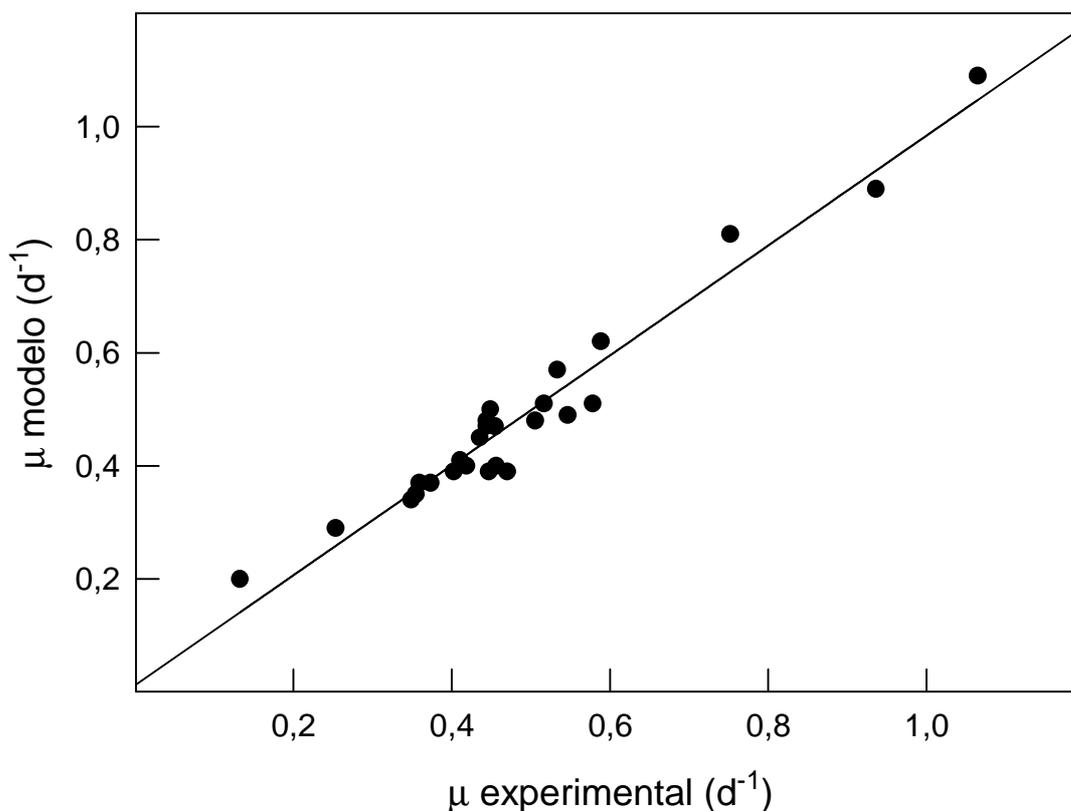


Figura 52. Ajuste entre los valores experimentales y los obtenidos mediante la Ecuación 16 para la velocidad de crecimiento de cultivos de *C.vulgaris* en régimen continuo, en distintas condiciones de irradiancia promedio, temperatura, disponibilidad de nitrato (SEN) y pH

Simulación del comportamiento de C.vulgaris en cultivo continuo

Con el modelo de crecimiento propuesto podría simularse el comportamiento de *C. vulgaris* en diferentes situaciones.

Para las condiciones de cultivo establecidas como óptimas (pH 7,5, T^a 20°C, D 0,4 d⁻¹, I_{max} 3000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 20 mM nitrato) el valor promedio determinado experimentalmente de productividad en biomasa era 0,66 g l⁻¹ d⁻¹ (ver Figura 46). El modelo recogido en la Ecuación 16 para esas mismas condiciones de pH, temperatura y disponibilidad de nitrato, predice una productividad máxima entre 0,6-0,7 g l⁻¹ d⁻¹, alcanzable a irradiancias superiores a 3000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ y velocidades de dilución entre 0,4 y 0,6 d⁻¹ (Figura 53). El modelo aplicable a la tasa de fijación de CO₂ sería equivalente a éste, ya que el efecto de las distintas variables sobre el valor de este parámetro era análogo al registrado para el crecimiento.

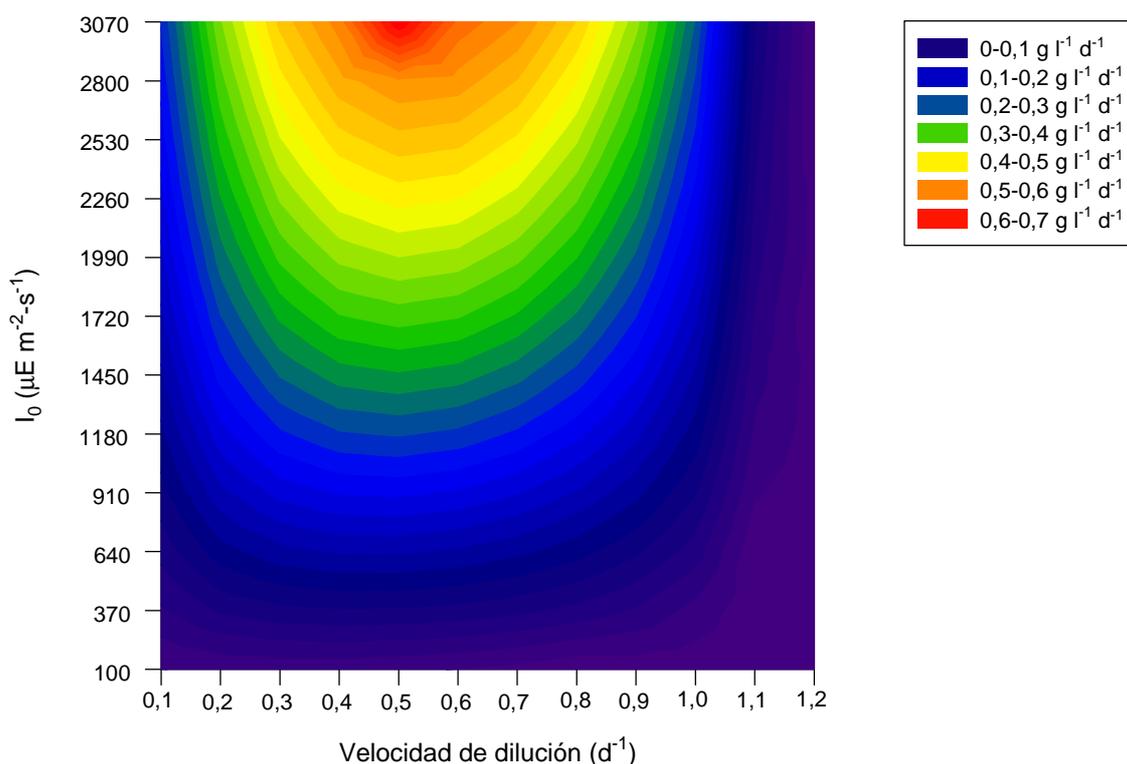


Figura 53. Predicción de la variación de la productividad de biomasa en función de velocidad de dilución e irradiancia máxima incidente en cultivos continuos de *C.vulgaris*. Simulación de acuerdo al modelo propuesto. Otras condiciones de cultivo: temperatura 20°C, NO₃⁻ 20mM, pH 7,5

Modelo para la acumulación de almidón por *C.vulgaris* en cultivo continuo

Para determinar las variables de cultivo que influían en la producción de almidón en cultivos continuos de *C.vulgaris*, se aplicó un tratamiento estadístico de los datos experimentales obtenidos. La tasa de generación de almidón en esta microalga estaba fundamentalmente determinada por la velocidad de dilución y la disponibilidad de nitrato (SEN). Por tanto, se propuso un modelo que incluyera ambas variables.

El almidón puede considerarse como un metabolito secundario cuya acumulación va asociada a condiciones de estrés y limitación en el crecimiento. Por tanto, para derivar la tasa específica de acumulación de almidón, q_p (g almidón g⁻¹ biomasa d⁻¹) se tuvo en cuenta la ecuación propuesta por Luedeking (Luedeking y Piret, 1959):

$$q_p = Y_{p/x} \cdot \mu + \beta \quad \text{Ecuación 17}$$

según la cual, esta tasa de acumulación resulta del sumatorio de dos componentes: un primer factor que es el rendimiento de almidón producido en el metabolismo primario, $Y_{p/x}$ (g almidón g biomasa⁻¹) vinculado al crecimiento de la microalga y dependiente, por tanto, de μ , y un segundo factor, β (g almidón g biomasa⁻¹ d⁻¹) que se encuentra asociado al metabolismo secundario del organismo y vinculado a situaciones de estrés, en este caso, la limitación de nitrato.

El parámetro β es función de la velocidad de dilución (D) y del suministro específico de nitrato (SEN). Así, se puede definir una función que describa la tasa de acumulación de almidón en cultivos continuos de *C. vulgaris*:

$$q_p = \left(Y_{p/x} \cdot \mu \right) + \left(a \cdot e^{(b \cdot D)} \right) + \left(\frac{\beta_{max} \cdot (SEN \cdot K_i)^m}{[(SEN \cdot K_i) + (K_s \cdot K_i) + (SEN^2)]^m} \right) \tag{Ecuación 18}$$

Dónde, K_s y K_i corresponden a las constantes de semi-saturación e inhibición para el suministro específico de nitrato (SEN) respectivamente, siendo a , b y m parámetros geométricos de ajuste. Mediante regresión no lineal se calcularon los siguientes valores para los parámetros más importantes: $Y_{p/x} = 0,016$ g g⁻¹; $a = 0,00005772$; $b = 3,18$; $\beta_{max} = 3,4$ mg almidón g biomasa⁻¹ d⁻¹; $K_i = 0,3$ mmol NO₃⁻ g⁻¹ d⁻¹; $K_s = 1,7$ mmol NO₃⁻ g⁻¹ d⁻¹; $m = 1,72$

En la Figura 54 puede observarse el ajuste entre los valores de β obtenidos a partir del modelo y los datos obtenidos experimentalmente ($r^2 = 0,84$):

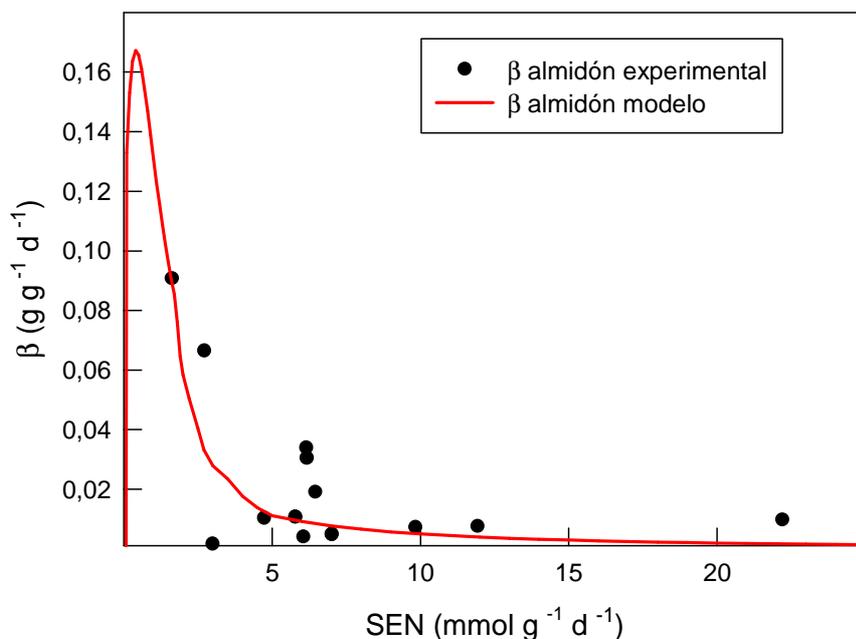


Figura 54. Variación de la tasa de acumulación de almidón (β) experimental y según el modelo propuesto

Simulación del comportamiento de los cultivos de *C.vulgaris* en relación a la acumulación de almidón

El modelo propuesto para la acumulación de almidón permite predecir el comportamiento de los cultivos de *C. vulgaris* en relación a dicha acumulación. En la combinación más adecuada de D y SEN, en las condiciones descritas como óptimas para la acumulación de almidón, el modelo predice obtener valores próximos a 0,25g almidón g biomasa⁻¹ d⁻¹ (Figura 55). La productividad de almidón en este caso sería de 50mg almidón l⁻¹ d⁻¹, cercana a los valores experimentales obtenidos.

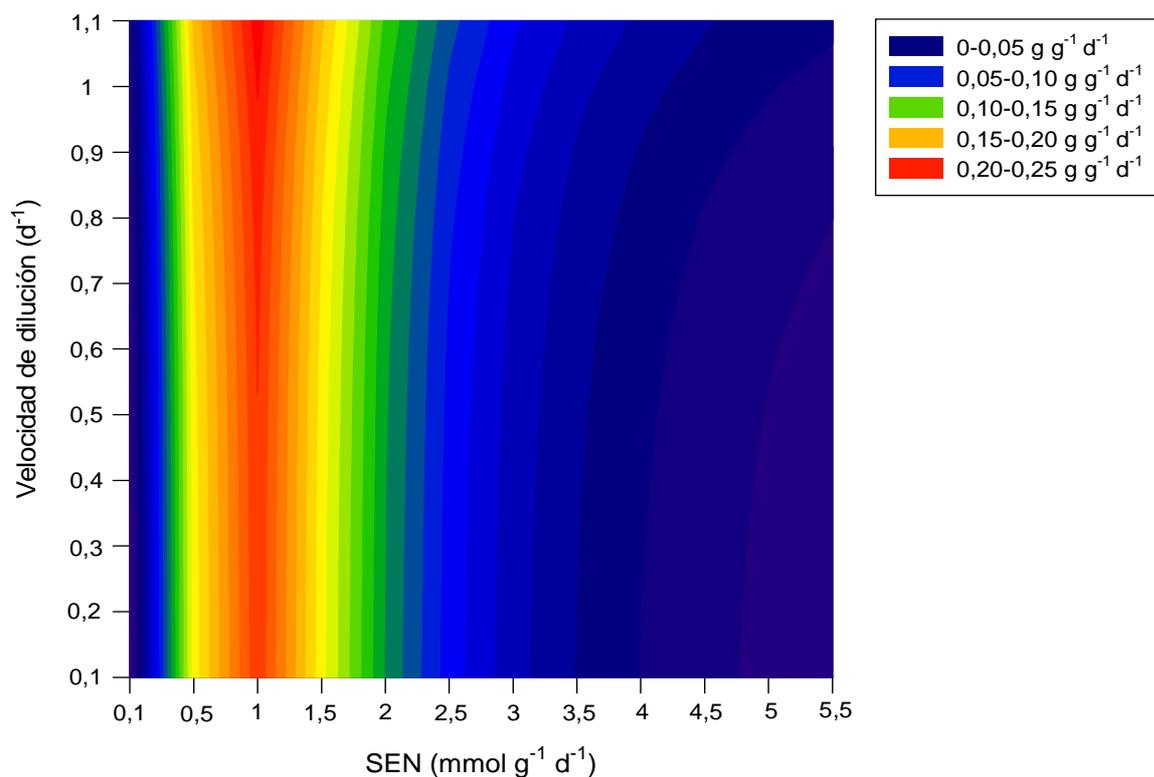


Figura 55. Simulación de la influencia de la velocidad de dilución y la disponibilidad de nitrato sobre la tasa de acumulación de almidón (g almidón g biomasa⁻¹ d⁻¹) en cultivos continuos de *Chlorella vulgaris* según el modelo propuesto. Condiciones de cultivo fijadas: temperatura: 20°C, pH: 7,5, I₀: 3000μE m⁻² s⁻¹

Efecto del suministro de CO₂ proveniente de diferentes fuentes sobre la viabilidad y eficiencia de cultivos de Chlorella vulgaris

Del mismo modo que se procedió con cultivos de *S. vacuolatus* (página 93), se ha evaluado la viabilidad de cultivos de *Chlorella vulgaris* a los que se aportaba el CO₂ como componente de una mezcla gaseosa cuya composición simulaba la de gases de escape de origen industrial. Las condiciones de cultivo fueron las óptimas para esta microalga en régimen continuo y se realizaron experiencias diluyendo con aire la mezcla gaseosa sintética aportada a los cultivos, para que contuviese entre 1% y 12% de CO₂. Previo a estas experiencias, a modo de control, se realizó un estudio en condiciones similares pero aportando a los cultivos una corriente continua de aire suplementado CO₂ puro a idénticas concentraciones. Por último, se comparó la productividad de biomasa obtenida en estas condiciones con los resultados obtenidos en condiciones en las que se aportaba a los cultivos CO₂ puro en función de la demanda, acreditada por la basificación del medio.

Efecto del suministro en continuo de aire suplementado con CO₂

Los cultivos de la microalga *C.vulgaris* procedían adecuadamente cuando se burbujaban con una corriente continua de aire suplementado con CO₂ entre 1 y el

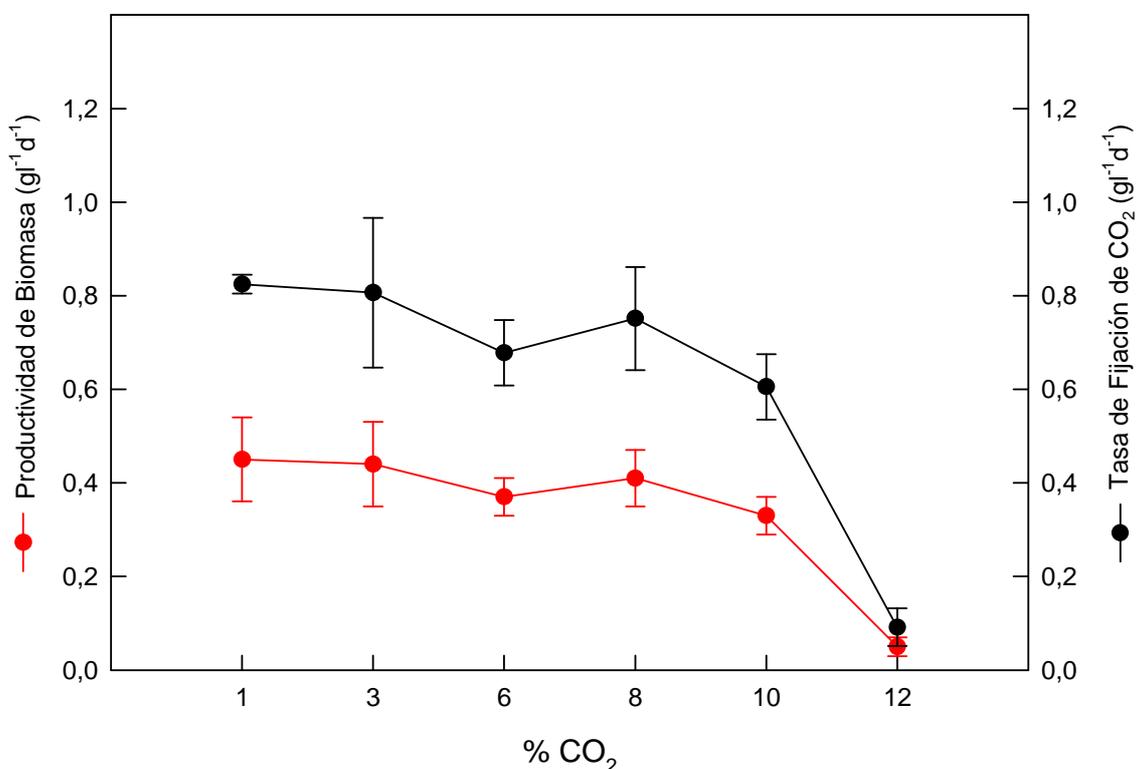


Figura 56. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ de *Chlorella vulgaris* en cultivo continuo con diferentes concentraciones de CO₂ en la corriente de gaseo en las condiciones de cultivo óptimas

10%. La productividad de estos cultivos estaba entre 0,4 y 0,5 g l⁻¹ d⁻¹. Con CO₂ al 12% la productividad era insignificante. La tasa de fijación de CO₂ se mantenía superior a 0,8g l⁻¹ d⁻¹ hasta el 8% de CO₂, disminuyendo a 0,6g l⁻¹ d⁻¹ al 10% y siendo insignificante al 12% (Figura 56).

En cuanto a la composición bioquímica de la biomasa generada, destacar que la biomasa de todos los cultivos presentaba un contenido alto en proteínas, cercano al 50% del total, independientemente del porcentaje de CO₂ utilizado. El contenido en lípidos se mantuvo constante (entre 25 y 30%) hasta el 8% de CO₂. Al 10% se observaba una ligera disminución del contenido lipídico, acompañada por un incremento del contenido de carbohidratos que se correspondía con la máxima productividad de almidón (16 mg l⁻¹ d⁻¹) (Figura 57).

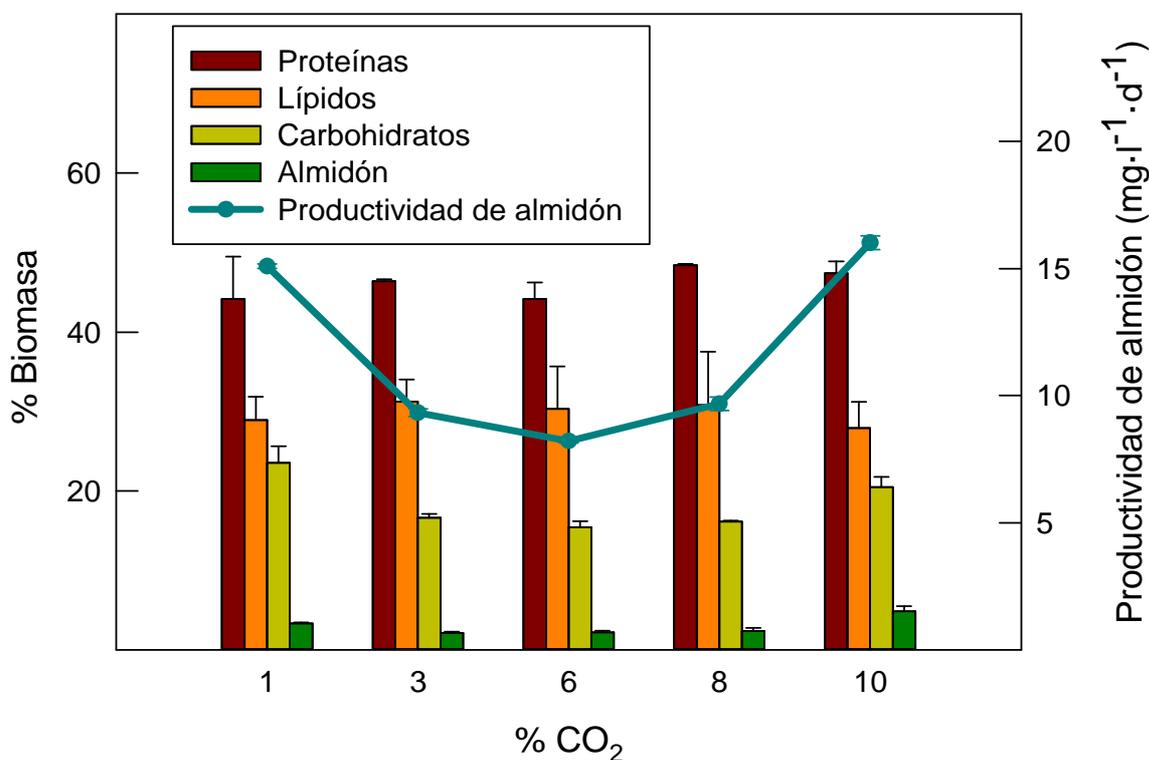


Figura 57. Composición bioquímica y productividad de almidón de la biomasa generada en cultivos continuos de *Chlorella vulgaris* con diferentes porcentajes de CO₂ en la corriente de gaseo

Efecto del suministro de mezclas de aire y gas de combustión

Se empleó la misma mezcla sintética de gases utilizada en las experiencias con *S.vacuolatus* (NO₂=0,08%; SO₂=0,06%; O₂=5%; CO₂= 12%; resto N₂), que se suministró a los cultivos de *C.vulgaris* diluída tras su mezcla con aire en la proporción adecuada. Se

analizó también la posibilidad de su empleo sin dilución alguna, pero inyectada a demanda para mantener el valor de pH preestablecido (7,5).

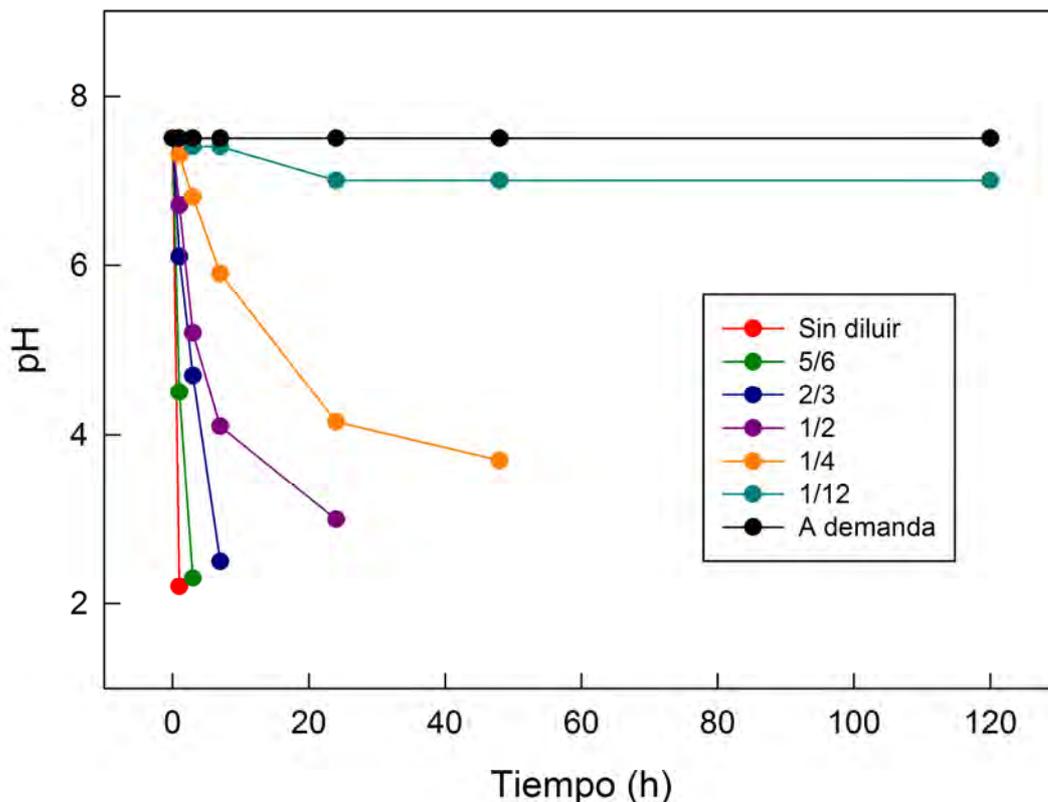


Figura 58. Evolución del pH de los cultivos de *C.vulgaris* burbujeados con una composición de gases de combustión a diferentes diluciones y a demanda

Sólo resultaron viables los cultivos de *C.vulgaris* burbujeados con la mezcla de gases diluida doce veces (aporte de CO₂ al 1%) o bien sin diluir pero con inyección a demanda. Con la mezcla diluida con aire menos de doce veces, el medio de cultivo se acidificó en pocas horas, alcanzando valores de pH inferiores a 4 (Figura 58). La acidificación es probablemente debida a la formación de ácidos sulfúrico y nítrico tras disolverse los óxidos de N y S en el agua del medio. En la Tabla 16, se muestra el rendimiento de los cultivos viables. Existía una ligera diferencia en la productividad de los cultivos a favor de aquellos que se operaban con aporte de gas a demanda para el control de pH, frente a los cultivos burbujeados de manera constante con gas diluido doce veces con aire. A su vez, la productividad registrada con aporte de mezcla sintética de gases a demanda era un 30% inferior a la obtenida cuando la demanda se satisfacía con CO₂ puro (0,66 g l⁻¹ d⁻¹), siendo más bien análoga a la registrada utilizando un suministro continuo de aire suplementado con CO₂ al 1% (0,45 g l⁻¹ d⁻¹).

Tabla 17. Productividad de biomasa y tasa de fijación de carbono en cultivos de *C.vulgaris* con aporte de CO₂ mediante pulsos de gases de combustión o una corriente continua diluida doce veces con aire

	Productividad de biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
A demanda	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,1
1/12	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1

La biomasa producida en estos cultivos poseía un alto contenido tanto en proteínas como en lípidos en ambas situaciones de aporte de gases de combustión con valores próximos al 40%. El contenido en carbohidratos apenas alcanzaba el 15% de la biomasa generada y el de almidón no superó el 3% del total (Figura 59), lo que representa una productividad de almidón del orden de 10 mg l⁻¹ d⁻¹ en ambas condiciones de cultivo.

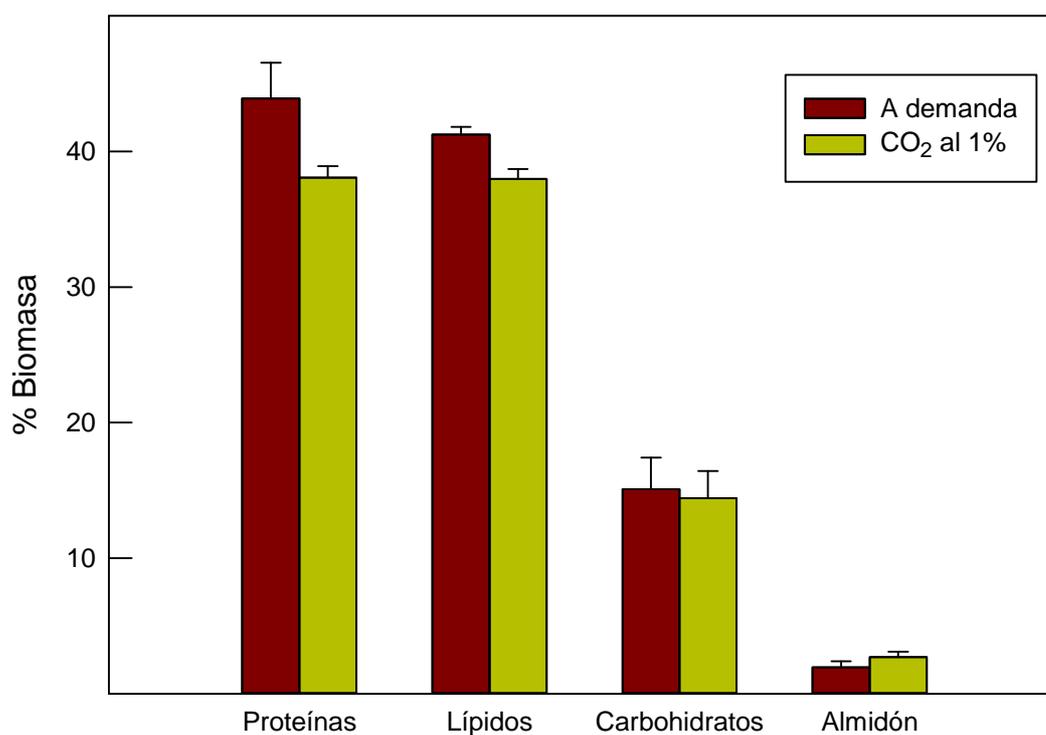


Figura 59. Composición bioquímica de la biomasa producida en cultivos continuos de *C.vulgaris* con aporte de CO₂ mediante pulsos de gases de combustión o una corriente continua diluida doce veces con aire

Eficiencia en el aprovechamiento de CO_2

Instalaciones Inabensa S.A. diseñó y montó un dispositivo que permitía medir en línea la demanda de CO_2 de los cultivo. Comparando el valor obtenido con el de carbono fijado en forma de biomasa se podría establecer la eficiencia del sistema para fijar CO_2 . Estas medidas de eficiencia en el aprovechamiento del CO_2 por parte de *C.vulgaris* se realizaron en todas las condiciones de cultivo planteadas. Sólo entre el 1 y 5% de todo el carbono que se aportaba al sistema quedaba incorporado a la biomasa. En la Figura 60 se presenta un ejemplo representativo de la demanda de CO_2 a lo largo del ciclo diario de un cultivo de *C.vulgaris* operado en condiciones óptimas.

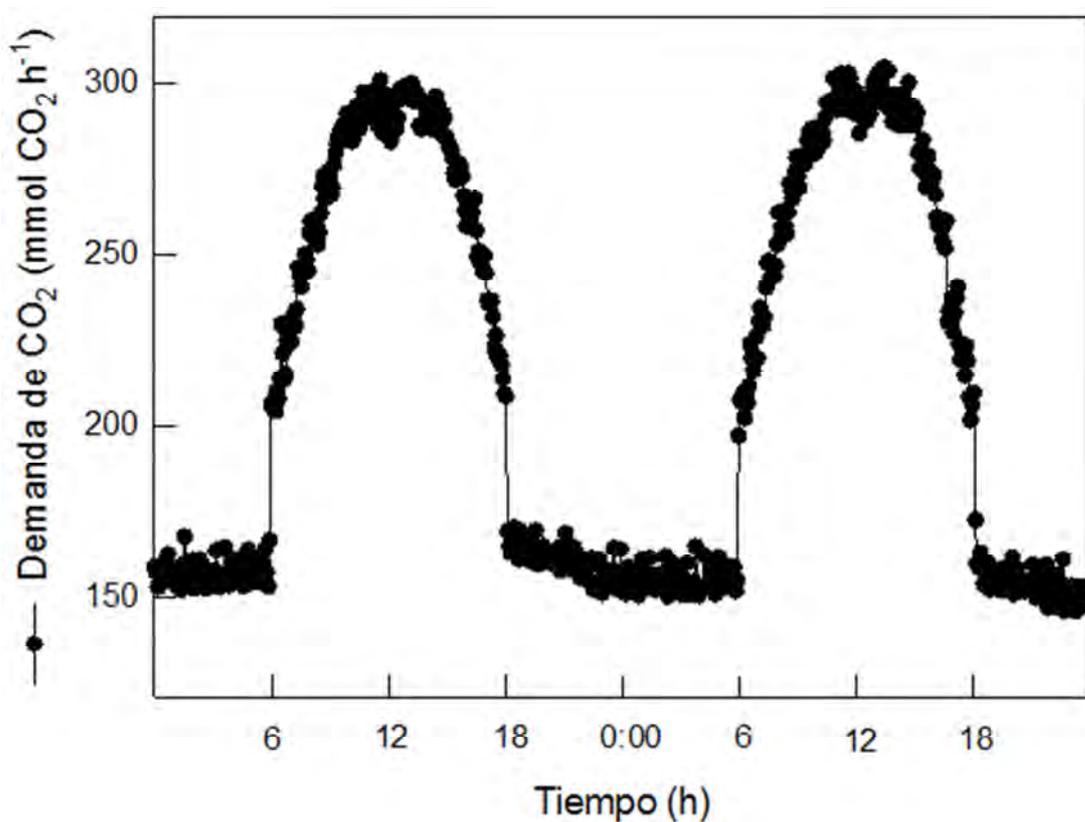


Figura 60. Demanda de CO_2 en un cultivo continuo de *C.vulgaris* operado en condiciones óptimas

CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* AL EXTERIOR

A fin de determinar el sistema más idóneo para el cultivo de *Chlorella vulgaris* a la intemperie, se analizó su productividad en régimen semicontinuo en los dos tipos de reactores ya descritos: estanque abierto y reactor plano vertical. El objetivo prioritario fue verificar la viabilidad de los sistemas, con determinación de valores para la tasa de fijación fotosintética de CO₂, sin pretender derivar condiciones de cultivo que favoreciesen la productividad de almidón.

Cultivo de *Chlorella vulgaris* en estanque abierto

Se analizó el comportamiento a lo largo de un ciclo anual de cultivos de *Chlorella vulgaris* en estanques abiertos operados en régimen semicontinuo a pH 7,5 y sin control de temperatura. La frecuencia de dilución, así como la densidad celular inicial se fue modificando dependiendo de las condiciones climáticas (Tabla 18).

Tabla 18. Frecuencia de dilución, irradiancia media incidente y temperatura media en cultivos de *C.vulgaris* operados en estanque abierto a densidad celular mínima de 0,2 g l⁻¹

Estación	Frecuencia dilución (días)	Irradiancia media incidente (MJ m ⁻² d ⁻¹)	Temperatura media (°C)
Invierno	2-3	11,1±2	12,7±5
Primavera	2-3	16,1±3	16,9±4
Verano	diarias	21,4±1	22,5±5
Otoño	2-3	5,9±2	15,5±2

Los cultivos en estanque abierto de *C.vulgaris* a una densidad celular mínima de 0,2 g·l⁻¹ fueron viables a lo largo de todo el año (Tabla 19). En situaciones de baja irradiancia los ciclos de dilución fueron de 2-3 días. En condiciones más favorables, las diluciones fueron diarias (Figura 61). El contenido en proteínas de la biomasa generada era bastante constante a lo largo del año. Sin embargo, la relación lípidos/carbohidratos si se modificaba, siendo próxima a 2 en invierno y a 1 en otoño. La productividad de almidón se mantuvo constante a lo largo del periodo estudiado, no superando los 250mg almidón m⁻² d⁻¹.

Tabla 19. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ en cultivos de *C.vulgaris* operados a densidad celular mínima de 0,2 g l⁻¹ en estanque abierto

Estación	Productividad de biomasa		Tasa de fijación de CO ₂	
	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)
Invierno	0,05±0,02	5±2	0,09±0,04	9±4
Primavera	0,06±0,02	6±2	0,11±0,04	6±2
Verano	0,07±0,04	7±4	0,13±0,07	13±7
Otoño	0,03±0,02	3±2	0,06±0,04	6±4

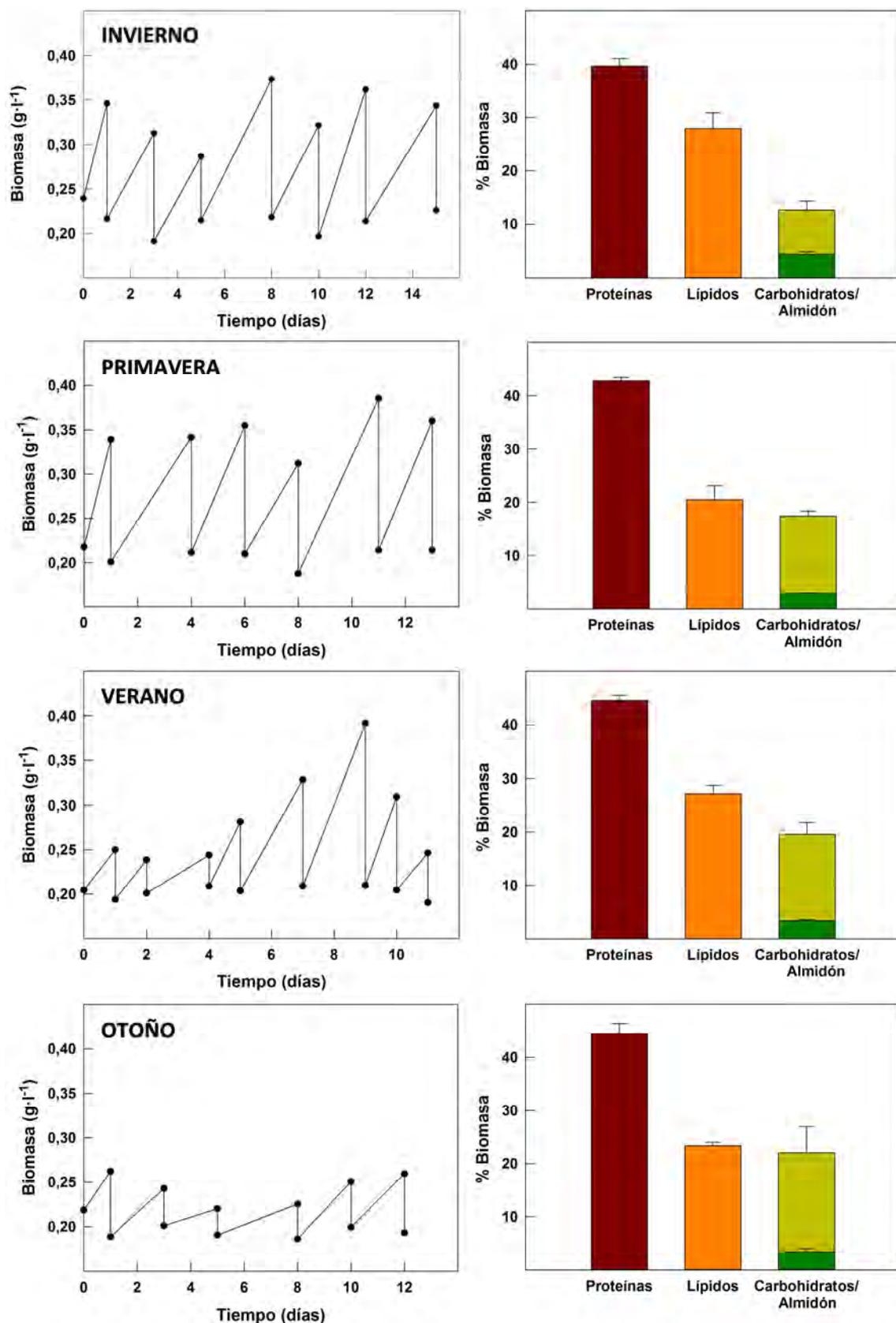


Figura 61. Evolución de la concentración de biomasa y composición bioquímica en experiencias representativas de cada estación del año de cultivos de *C.vulgaris* en estanque operados a una densidad celular mínima de 0,2 g l⁻¹

Al elevar la densidad celular mínima de los cultivos a $0,3 \text{ g l}^{-1}$, los cultivos no fueron viables en invierno pero sí tuvieron la misma productividad y composición que los operados a $0,2 \text{ g l}^{-1}$ el resto del año. Así mismo, a densidades celulares iniciales más altas, $0,4 \text{ g l}^{-1}$, solo los cultivos operados en primavera y verano fueron viables, pero ni la productividad ni la composición bioquímica sufrieron modificaciones significativas con respecto a los cultivos operados a $0,2 \text{ g l}^{-1}$.

*Cultivo de *Chlorella vulgaris* en reactor plano vertical (RPV)*

Simultáneamente a las experiencias en estanque abierto, se realizó un análisis de la productividad en cultivos de *C.vulgaris* en reactor plano vertical (RPV), a lo largo de un ciclo anual. Debido a problemas técnicos en las instalaciones no se pudieron llevar a cabo experiencias representativas del comportamiento de esta microalga en RPV en otoño.

La irradiancia incidente era especialmente limitante para la productividad de los cultivos de *C.vulgaris* en RPV. A baja irradiancia (invierno), la productividad de biomasa era menos de la mitad que la registrada en periodos de mayor irradiancia (primavera y verano). Con el fin de asegurar la viabilidad del cultivo fue necesario modificar la densidad celular mínima y la frecuencia de dilución en función de la irradiancia incidente. En condiciones en las que la irradiancia incidente era elevada, los cultivos se operaron con una densidad celular mínima de $0,8 \text{ g l}^{-1}$. A valores bajos de irradiancia, el valor de la densidad celular mínima se redujo a la mitad (Tabla 20).

Tabla 20. Densidad celular mínima, frecuencia de diluciones, irradiancia media incidente y temperatura media de cultivos semicontinuos de *C.vulgaris* en RPV

Estación	Densidad celular mínima (g l^{-1})	Frecuencia diluciones (días)	Irradiancia media incidente ($\text{MJ m}^{-2}\text{d}^{-1}$)	Temperatura media ($^{\circ}\text{C}$)
Invierno	0,4	2-3	$10,5\pm 2$	$19,8\pm 3$
Primavera	0,5	diarias	$15,6\pm 3$	$25,4\pm 2$
Verano	0,8	diarias	21 ± 1	$26,1\pm 2$

En condiciones de baja irradiancia (invierno) los cultivos presentaban una productividad de biomasa de $7 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Esta productividad se incrementaba conforme la irradiancia se hacía mayor. Así, en verano, los cultivos de *C.vulgaris* tuvieron más del doble de productividad de biomasa ($16 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) que en invierno, fijando hasta hasta $30 \text{ g de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Tabla 21). En la Figura 63 se recoge la evolución de la concentración de biomasa a lo largo de ciclos sucesivos de dilución de cultivos semicontinuos a la intemperie de *C.vulgaris*. El contenido de proteínas de la biomasa generada era constante a lo largo del año (cerca al 50%), al igual que el contenido en lípidos y carbohidratos (20 y 30%). La máxima productividad de almidón se daba en condiciones de alta irradiancia (verano), siendo aproximadamente $460 \text{ mg almidón m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

Tabla 21. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ en cultivos de *C.vulgaris* en RPV

Estación	Productividad de biomasa		Tasa de fijación de CO ₂	
	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)	(g l ⁻¹ d ⁻¹)	(g m ⁻² d ⁻¹)
Invierno	0,06±0,05	7±6	0,11±0,09	13±10
Primavera	0,08±0,02	9,2±5	0,15±0,04	17,3±5
Verano	0,14±0,07	16,2±8	0,26±0,13	30±15

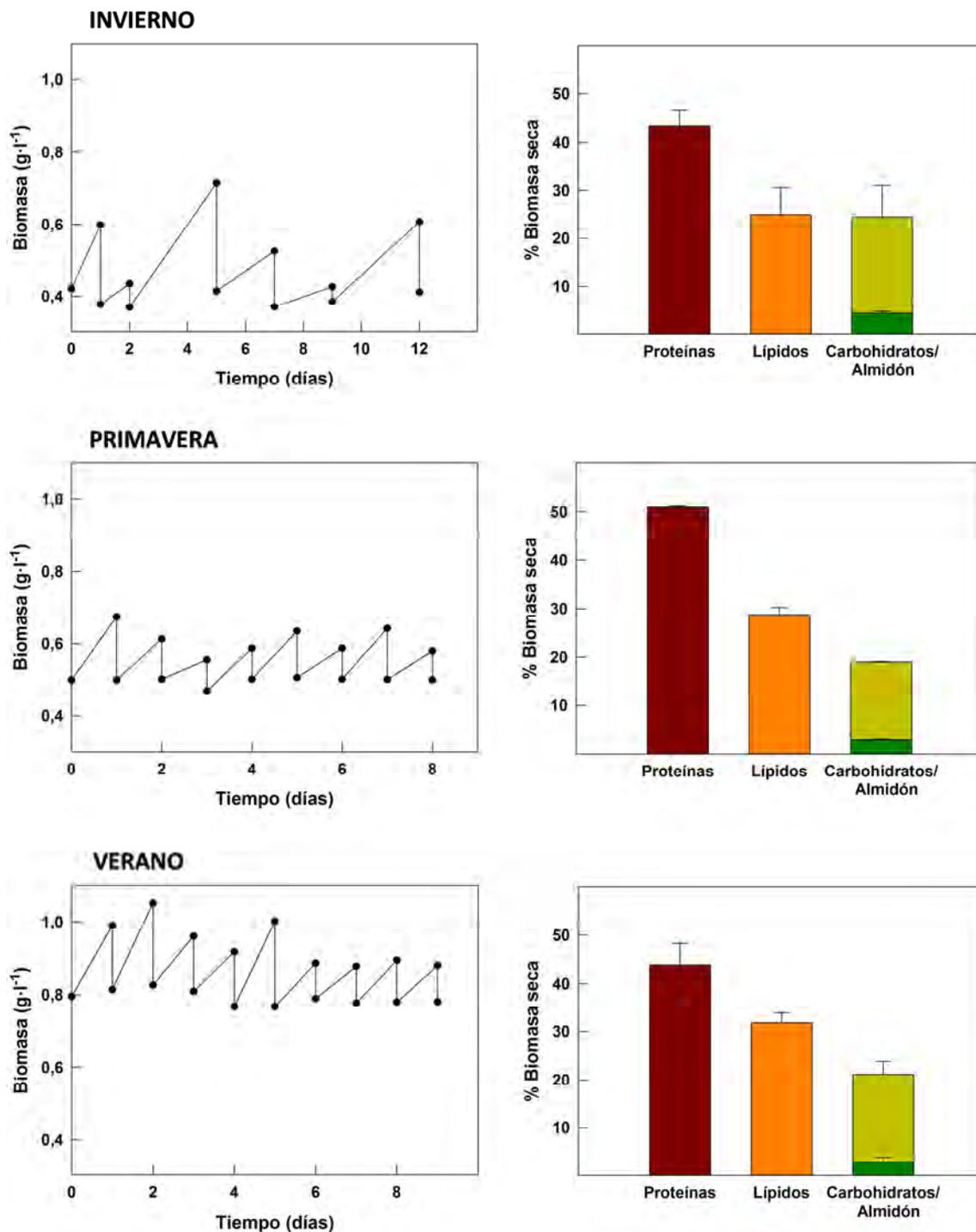


Figura 62. Evolución de la concentración de biomasa y composición bioquímica de la misma en experiencias representativas de cultivos de *C.vulgaris* operados en RPV a lo largo del año

DISCUSIÓN

Los principales criterios de preselección de estirpes para su aplicación a procesos de retirada de CO₂ fueron la capacidad relativa de generación de biomasa junto con el contenido en carbohidratos de la misma, si bien se prestó también atención a la tolerancia de los cultivos a condiciones de intemperie. Sobre estas bases se preseleccionaron las estirpes que figuran en la Tabla 1 (Materiales y Métodos).

Esta selección preliminar se basó en una revisión exhaustiva de la bibliografía especializada, en combinación con la experiencia propia del grupo. Si bien existía una amplia información al respecto, ésta era altamente diversa y heterogénea. Los valores de productividad que se encontraban en la literatura correspondían en general a cultivos de laboratorio, algunos en régimen estanco, otros en semicontinuo o continuo, sometidos a distintos valores de irradiancia, con variedad de medios de cultivo y de condiciones de pH y temperatura. No parecía oportuno elegir alguna de las especies identificadas, como elemento central de un sistema de eliminación de CO₂ acoplado a la producción de carbohidratos, sin una verificación de su potencial.

Resultaba por tanto esencial comparar el comportamiento de todas las estirpes en condiciones definidas e idénticas, para lo que se establecieron protocolos normalizados de experimentación, tanto para las condiciones de operación como de toma de muestras y de parámetros a valorar. De esta manera, se pudo obtener información contrastada sobre de la capacidad de generación de biomasa y de retirada de CO₂ para cada estirpe.

Aproximación en cultivo estanco

En una primera aproximación, se comparó el comportamiento de las distintas estirpes en régimen estanco de cultivo y bajo condiciones normalizadas. Los resultados obtenidos mostraron que *Chlorella vulgaris* y *Spirulina sp. PCC6313* tenían la tasa de crecimiento más alta (0,8 d⁻¹). Otras estirpes presentaban valores algo más bajos pero considerables, como *Chlorococcum sp.*, *Scenedesmus vacuolatus* o las del género *Anabaena*, con 0,7 d⁻¹.

En cuanto a la capacidad de fijar CO₂ durante la fase exponencial, y con la excepción de *Spirulina sp. PCC6313*, las microalgas presentaban valores superiores a las cianobacterias.

Los resultados obtenidos se comparan, en general, favorablemente con los de la literatura. La mayor tasa de fijación correspondía a *Chlorella vulgaris*, con 1,2 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹. Para algunas estirpes de *Chlorella* se han comunicado tasas de fijación de carbono de hasta 1,8 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹ (Ho et al., 2011). Sin embargo, Hang (Han et al., 2012) encontraba para *Chlorella vulgaris* tasas similares a las obtenidas en este trabajo, aunque para *Scenedesmus sp.* eran casi el doble de las aquí determinadas para

Scenedesmus vacuolatus. En cuanto a *Chlorococcum sp.*, apreciada por su elevado contenido en lípidos, el valor obtenido era inferior al de $1 \text{ g CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ encontrado en la bibliografía (Wang et al., 2008). *Porphyridium purpureum* presentaba una elevada tasa de fijación de CO_2 pero no una buena tasa crecimiento. Este resultado podría explicarse en base a la elevada viscosidad verificada para los cultivos de esta microalga. Se considera que los cultivos de *Porphyridium* son altamente viscosos por la excreción de polisacáridos (Borowitzka, 2013). Estos polisacáridos podrían ser, junto con la biomasa, el destino final del carbono fijado fotosintéticamente.

Con respecto a las cianobacterias, *Spirulina (Arthrospira)* ha sido ampliamente propuesta para la producción de biomasa asociada a la eliminación de CO_2 . De Morais ha descrito una estirpe, aislada de efluentes próximos a centrales térmicas, con una tasa específica de crecimiento de $0,44 \text{ d}^{-1}$ y una capacidad de fijación de $0,22 \text{ g CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, (de Morais y Costa, 2007) significativamente inferiores a los obtenidos en este trabajo. Los valores determinados para la tasa de crecimiento de estirpes de *Anabaena* eran elevados ($0,7 \text{ d}^{-1}$), aunque inferiores a algunos recogidos en la bibliografía (Moreno et al., 1998). No obstante, las especies del género *Anabaena* no destacaron por su capacidad de fijación fotosintética ($0,4 \text{ g CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$), si bien otros autores han citado valores de $0,7 \text{ g CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Nayak y Das, 2013) y de hasta $1,45 \text{ g CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Pires et al., 2012). Las estirpes de *Nostoc* presentaban valores muy bajos de tasa específica de crecimiento y de fijación, similares a los obtenidos por otros autores (Yu et al., 2009).

La información relativa a la biomasa producida tras 8 días de cultivo se consideró igualmente relevante, tanto bajo el punto de vista de la máxima capacidad de acumulación de biomasa, como por registrarse en una situación de alta densidad celular que implica una limitación por luz, habitual en los cultivos a la intemperie. Al finalizar la fase estacionaria, los cultivos de microalgas eran más densos que los de cianobacterias, destacando principalmente los de *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella vulgaris*, con acumulaciones de biomasa de $8,3$ y $6,6 \text{ g l}^{-1}$ respectivamente. Estos valores coincidían con los publicados por otros autores para ambas estirpes (de Morais y Costa, 2007; Ho et al., 2011; Anjos et al., 2013).

En un cultivo operado en modo estanco, el organismo crece a expensas de los nutrientes aportados inicialmente en el medio de cultivo, derivándose con el tiempo una situación de limitación de disponibilidad de dichos nutrientes. En los cultivos de microalgas, después de 8 días, el nitrógeno aportado como sal de nitrato, se encontraban en una clara situación de limitación, evidenciada por un elevado valor de la razón C/N de la biomasa (Tabla 6). En el caso de las cianobacterias la situación era diferente ya que las especies seleccionadas (exceptuando *Spirulina sp. PCC6313*) eran capaces de fijar nitrógeno atmosférico manteniendo así una baja relación C/N. En cuanto a la composición bioquímica de la biomasa generada, las cianobacterias destinaban preferentemente el C de nueva fijación a carbohidratos y proteínas, y en

mucha menor proporción a lípidos. La composición bioquímica de las cianobacterias empleadas en este trabajo no difería de la reportada por otros autores para los géneros *Anabaena*, *Nostoc* o *Spirulina* (Vargas et al., 1998; González López et al., 2009; Sydney et al., 2010). En el caso de la biomasa de las microalgas, el contenido proteico era bajo, como resultado de la limitación nitrogenada, y el C asimilado también se destinaba preferentemente a carbohidratos. Así, el contenido de éstos superaba el 30% de la biomasa en todas las especies, destacando *Porphyridium* con un 60%, similar a la publicada por Becker (Becker, 2007). Al final de la fase estacionaria, *Chlorococcum sp.* y las especies del género *Chlorella* (*Chlorella sp.* y *Chlorella vulgaris*) presentaron un contenido lipídico superior al 20% de la biomasa. Aunque Makareviciene (Makareviciene et al., 2013) ha referido hasta más del 50% de lípidos en diferentes estudios para *Chlorella vulgaris* o *Scenedesmus sp.*, otros autores restringen este contenido a porcentajes más discretos (10-30%) (Becker, 2007; Demirbas y Demirbas, 2010).

El calor de combustión determinado para todas las especies fue de unos 20 kJ g⁻¹, similar al de la madera. Si bien otros autores establecen valores de calor de combustión para el caso de *Chlorella vulgaris* similares a los obtenidos en este trabajo (Illman et al., 2000; Scragg et al., 2002), existe en la literatura un registro de 38 kJ g⁻¹ (Mallick et al., 2012). No obstante, el valor del calor de combustión de la biomasa está influenciado por su composición que, a su vez, depende de las condiciones de cultivo, lo que podría justificar esta variabilidad. La biomasa de cianobacterias, por regla general, presentaba un calor de combustión menor que la de microalgas, debido fundamentalmente a su menor contenido en lípidos. Los valores determinados en este estudio eran análogos a los publicados por otros autores para condiciones de cultivo similares (Huang et al., 2013).

Aproximación en cultivo continuo

Los resultados obtenidos en régimen estanco, aun siendo válidos para una aproximación experimental en primera instancia, tenían considerables limitaciones que reducían su potencial como criterios determinantes para la selección de un microorganismo fotosintético en un sistema de secuestro de CO₂. Por ello, debían complementarse con experiencias basadas en otras estrategias, en condiciones más cercanas a las propias de un proceso de producción industrial, como las que ofrecen los cultivos en régimen continuo.

El sistema de cultivo en régimen continuo implica el mantenimiento de estados de equilibrio, determinados por la velocidad de dilución impuesta. Cuando la velocidad específica de crecimiento iguala a la velocidad de dilución se genera un estado estacionario al que corresponde un determinado valor de densidad celular,

compensándose la generación de células por crecimiento con la dilución producida por el aporte de medio fresco (Pirt, 1975).

Los resultados obtenidos empleando ambos regímenes de operación divergían significativamente entre sí, de manera que los altos valores de tasa de fijación de CO₂ durante la fase exponencial presentados por algunas estirpes en régimen estanco, no se revalidaban en condiciones de cultivo continuo. En cualquier caso, en cultivo continuo difícilmente podrían alcanzarse niveles tan elevados de densidad de biomasa y contenido en determinados componentes celulares como en régimen estanco, a menos que la velocidad de dilución fuera extremadamente baja. Como anteriormente se razonó, el régimen estanco tiene un carácter acumulativo, pudiendo suministrar una idea del potencial máximo de un organismo respecto a fijación de CO₂, acumulación de biomasa y de alguno de sus componentes, mientras que el régimen continuo permite aproximarse a una situación real de producción.

La operación de los cultivos en régimen continuo, manifestó que estirpes que en cultivo estanco presentaban gran potencialidad, como ocurría con *Porphyridium* para la producción de carbohidratos, no refrendaba esta adecuación para un proceso de carácter industrial. Sin embargo otras, como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus vacuolatus* presentaron buenos comportamientos en ambos regímenes de operación. Los valores determinados de productividad de biomasa para ambas especies eran del orden del doble que los publicados por Gouveia (Gouveia y Oliveira, 2009), pero la mitad de los calculados por Pegallapati y (Pegallapati y Nirmalakhandan, 2013). Claramente, todos estos valores depende de las condiciones de operación y del modo en que se realizan los cálculos por tanto no se consideran irrelevantes las comparaciones con los valores publicados por otros autores.

Las cianobacterias ensayadas, con la excepción de *Nostoc punctiforme*, no alcanzaban valores elevados de generación de biomasa. De hecho, las especies del género *Anabaena* no soportaron la tasa de dilución impuesta, haciendo inviable su cultivo en este modo de operación.

La tasa de fijación de CO₂ que presentaban los cultivos continuos de microalgas era ligeramente superior a la determinada para las cianobacterias *Nostoc punctiforme*, *Nostoc PCC 9202* y *Spirulina*, aunque habría que tener en cuenta que los cultivos de cianobacterias se operaron a velocidad de dilución doble de la utilizada para microalgas, lo que repercutía en su productividad.

Otro aspecto a evaluar de cara a la selección final estaba relacionado con la capacidad de fijar N₂ de algunas cianobacterias, ya que no requerían el aporte de nitrato al medio de cultivo, reduciendo así los riesgos de contaminación por otros microorganismos, así como los costes de operación en procesos a gran escala. Su naturaleza filamentosa facilitaba la autofloculación, rasgo de gran importancia en relación a la recogida de su biomasa. Por último, la biomasa de *Nostoc* era rica en

carbohidratos (con valores que superaron en algunos casos el 30% del peso seco), si bien la fracción lipídica era menor que la presente en microalgas.

Una vez conocido el comportamiento de las estirpes de microalgas y cianobacterias preseleccionadas bajo condiciones uniformes, y tras la valoración conjunta de los resultados, se procedió a la selección de una estirpe para su posterior caracterización y cultivo al exterior. En conjunto, aplicando los criterios de selección definidos, destacaron *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus vacuolatus*, con tasas de fijación cercanas al gramo de CO₂ por litro y día, con una biomasa rica en carbohidratos, así como en lípidos, especialmente en el caso de *S.vacuolatus*. Estas propiedades, así como la existencia de experiencia previa en lo relativo al cultivo a la intemperie (Chisti, 2007) de distintas estirpes de estos géneros, justificaron la elección de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus vacuolatus* como los organismos más apropiados en relación a los objetivos de este trabajo, ciñendo la posterior experimentación a estas dos especies de microalgas.

OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES PARA CRECIMIENTO Y ELIMINACIÓN DE CO₂ POR *Scenedesmus vacuolatus* Y *Chlorella vulgaris* EN CULTIVO CONTINUO

La caracterización de ambas especies se ha realizado en régimen continuo ya que permite analizar los efectos resultantes de la modificación de una variable individual, manteniendo inalteradas las demás condiciones de cultivo. La primera variable estudiada fue el pH. La tolerancia a este factor en un intervalo amplio de valores es una característica relevante para organismos que intervengan en sistemas de retirada de CO₂ de gases de escape, ya que el contenido en SO_x y NO_x de la corriente del mismo puede variar, provocando cambios en el pH ya que al disolverse en un medio acuoso generan óxidos de azufre y nitrógeno. Por otra parte, el pH afecta al equilibrio entre las distintas formas de carbono disuelto, modificando la disponibilidad de dióxido de carbono para el cultivo (Chi et al., 2011; Van Den Hende et al., 2012). En este trabajo se ha verificado que *C. vulgaris* y *S. vacuolatus* presentaban una significativa tolerancia al pH, ambas con rendimiento óptimo a pH 7,5, y admitiendo valores de pH más extremos, como 6 o 9, sin que la productividad se redujera más del 20%. La productividad de *C. vulgaris* era ligeramente superior a la de *S. vacuolatus* en el intervalo de pH estudiado y similar a los valores publicados por otros autores (Arbib et al., 2013; Frigon et al., 2013), justificando su uso para la retirada de CO₂.

La tolerancia a la temperatura es una condición crítica en el cultivo a la intemperie, ya que su control no siempre es posible y, en cualquier caso, supone un importante factor de coste para los cultivos a gran escala (Ras et al., 2013). *S. vacuolatus* mostró su rendimiento óptimo para crecimiento y fijación de CO₂ a 30°C,

con un intervalo de tolerancia entre 25 y 35°C, con caídas en la productividad del orden del 10%, similar a los datos publicados para otras especies del mismo género, como *S. almeriensis* (Sánchez et al., 2008). *C.vulgaris*, si bien presentaba mejor rendimiento que *S. vacuolatus* dentro del intervalo térmico en el que era viable su cultivo, parecía adaptarse mejor a temperaturas moderadamente frías, como 20°C, en discordancia con la propuesta de otros autores (desde 25 a 42°C) (Wang et al., 2008; Huesemann et al., 2013; Kim y Hur, 2013). Sobre estas bases, el cultivo de *S. vacuolatus* podría ser más adecuado en zonas cálidas, mientras que el de *C. vulgaris* podría desarrollarse en zonas algo más frías.

La velocidad de dilución (D) impuesta un cultivo va a determinar tanto la concentración de biomasa obtenida como el volumen de cosechado a manipular, parámetros críticos en los procesos de producción. El intervalo de valores de velocidad de dilución admitido por *S. vacuolatus* y por *C. vulgaris* fue amplio y muy similar, dando idea de la buena adaptabilidad de la velocidad de crecimiento de ambas especies. La velocidad de dilución para la que *S. vacuolatus* presentaba la tasa de fijación de CO₂ más elevada fue de 0,6d⁻¹; aunque a valores más bajos de D la productividad de biomasa no se veía comprometida, sí lo hacía la fijación de carbono. Este resultado difería de los publicados para especies del mismo género (*Scenedesmus obliquus*) utilizadas en procesos de biomitigación de CO₂ (Lucas-Salas et al., 2013) donde la velocidad de dilución óptima se fijaba en 0,2d⁻¹.

Para *Chlorella vulgaris*, este trabajo ha puesto de manifiesto que, tanto la productividad de biomasa como la fijación fotosintética de carbono, presentaban valores máximos o próximos en un amplio intervalo de valores de velocidad de dilución, seleccionándose 0,5d⁻¹ como valor adecuado ya que permitía trabajar con volúmenes menores, más fáciles y económicos de manipular. Esta tasa de dilución mostraba coincidencia con la publicada por otros autores (Hadj-Romdhane et al., 2012), aunque Tang (Tang et al., 2012) y Cuaresma (Cuaresma et al., 2009) sugerían valores más bajos (0,33 y 0,24d⁻¹, respectivamente).

La disponibilidad de luz y la temperatura son dos factores interrelacionados que afectan marcadamente al crecimiento y rendimiento de los cultivos al exterior (Richmond, 1986). *C. vulgaris* y *S. vacuolatus* mostraban algunos comportamientos similares. Así, el tratamiento estadístico de los datos indicaba que, para ambas microalgas, la irradiancia incidente era la variable más influyente sobre la productividad y tasa de fijación de CO₂, que ambos parámetros respondían positivamente al aumento de la irradiancia (independientemente de la temperatura del cultivo) y que la disponibilidad de luz no modificaba el valor óptimo de temperatura. Sin embargo, existían algunas diferencias apreciables que podrían resultar decisivas para seleccionar el organismo más idóneo en función de las condiciones climáticas. *S. vacuolatus*, a baja temperatura, solo era viable si la irradiancia incidente era muy elevada. En el caso de *Chlorella*, la baja temperatura

tenía poco efecto sobre la productividad independientemente de la irradiancia. De forma contraria, a alta temperatura, *Chlorella* no era viable a ninguna irradiancia mientras que *Scenedesmus* mantenía su productividad pero sólo a alta luz. Atendiendo a estos resultados se podría concluir que *S. vacuolatus* sería el organismo de elección para ser utilizado en latitudes donde la irradiancia fuese elevada todo el año, minimizando el efecto negativo de la bajada de temperatura en invierno. *Chlorella* podría utilizarse en regiones de temperatura moderada sin un requerimiento muy estricto de disponibilidad de luz. Esta última observación está en consonancia con el uso extendido de especies del género *Chlorella* en latitudes templadas del planeta (Alemania, Japón, etc).

Los modelos de comportamiento de los cultivos frente a las distintas variables que gobiernan los mismos, son una poderosa herramienta para el diseño y operación de procesos eficientes utilizando microalgas (Sánchez et al., 2008). A partir de los modelos puede simularse la respuesta de cultivos de *S. vacuolatus* y *C. vulgaris*, y derivarse las condiciones óptimas de operación que maximicen la tasa de fijación de CO₂ para unas condiciones ambientales específicas.

Para el caso de *S. vacuolatus*, el modelo se ha construido con datos relativos a la influencia de la irradiancia incidente y la temperatura sobre la eficiencia de los cultivos, mientras que para *C. vulgaris*, los datos empleados recogían, además, la influencia de pH y suministro de nitrato.

S. vacuolatus presentaba una elevada tasa de crecimiento con $\mu_{\max} = 0,88\text{d}^{-1}$ y un valor de I_k relativamente bajo, inferior a $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lo que indicaba una elevada afinidad por la luz. El coeficiente de extinción de la biomasa es alto, $0,17\text{m}^2\text{g}^{-1}$, superior al determinado para otras especies de *Scenedesmus* (Sánchez et al 2008). La disponibilidad de luz, expresada como irradiancia promedio, puede ser tratada, en el caso de los cultivos de microalgas, en forma análoga a la de un nutriente cuya disponibilidad pueda ser limitante. De esta manera, la velocidad de crecimiento está influenciada por la irradiancia promedio, encontrándose fotolimitados los cultivos de *S. vacuolatus* a valores de irradiancia promedio inferiores a $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, similares a los publicados por Hanagata et al (1992) para esta misma microalga. La bondad del modelo, complementado para considerar también la influencia de la temperatura, quedaba demostrada por la excelente correlación existente entre los valores predichos y los determinados experimentalmente. A partir del mismo, podría estimarse una tasa máxima teórica para la fijación de CO₂ para *S. vacuolatus* en cultivo continuo de $1,2 \text{g CO}_2 \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$, superior a valores recogidos en la bibliografía (Ho et al., 2011; Choi et al., 2012).

El modelo propuesto para *C. vulgaris* es más completo, ya que además de la influencia de irradiancia y temperatura, recogía también la del pH y disponibilidad de nitrato sobre la productividad del cultivo. En el caso de *C. vulgaris*, el valor de la I_k era de $35,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, indicativo de una afinidad por la luz superior a la de *S. vacuolatus*. El

coeficiente de extinción de la biomasa es también muy superior, $0,6\text{m}^2\text{g}^{-1}$, indicando que la atenuación de la irradiancia en el seno del cultivo era muy fuerte. El ajuste entre los valores experimentales y los propuestos por el modelo aglutinando todas las variables es muy preciso. Los valores máximos que predice el modelo propuesto para productividad de biomasa y tasa de fijación de carbono para cultivos continuos de *C. vulgaris* eran ligeramente superiores a los de *S. vacuolatus*, aproximándose a los $0,7\text{ g biomasa l}^{-1}\text{ d}^{-1}$ y debiendo superar los $1,2\text{ g CO}_2\text{ l}^{-1}\text{ d}^{-1}$ y superiores a los descritos en la bibliografía para microalgas modelo para la eliminación de CO_2 (González López et al., 2009).

Ciertas especies de microalgas tiene la capacidad de producir niveles altos de polímeros de reserva. *C. vulgaris*, particularmente, se ha considerado un organismo adecuado para su empleo en procesos de retirada de CO_2 asociados a la producción de lípidos (especialmente triacilgliceroles) y carbohidratos fermentables (Doucha et al 2005; Douskova et al 2009).

Respecto a los carbohidratos generados fotosintéticamente, se les reconoce dos papeles esenciales, uno estructural como componentes de la pared celular, y otro como reservorio de carbono, en forma de almidón. Este compuesto, de movilización rápida, sirve para proporcionar energía metabólica de manera inmediata a los procesos que la requieren, fundamentalmente en condiciones de oscuridad. La acumulación de lípidos como reservorio de carbono se corresponde más con una situación de estrés más dilatado en el tiempo (Markou et al., 2012).

Esta capacidad para acumular sustancias de reserva ha generado un creciente interés por el potencial uso de la biomasa de microalgas para generar biocombustibles (Vunjak-Novakovic et al 2005; de Morais y Costa 2007; Ratledge y Cohen 2008). Una proporción considerable de las investigaciones están centradas en la producción de biodiesel ya que muchas microalgas son de naturaleza oleaginosa y pueden ser explotadas para este fin (Chisti 2007). De hecho, es en la actualidad una línea prioritaria de investigación que ha llevado a la secuenciación de al menos 10 genomas de diferentes microalgas para la obtención de líneas celulares en las que se acumulen preferentemente lípidos (Work et al., 2012; Liu y Benning, 2013). Sin embargo, hasta la fecha se ha prestado poca atención a la producción de almidón a partir de microalgas como materia prima para la obtención de combustible. Almidón, celulosa u otros polisacáridos acumulados por ciertas microalgas puede ser utilizados como materia prima para la producción de etanol (Huntley y Redalje 2007; Rosenberg et al 2008; Subhadra y Edwards 2010). Microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* o *Spirulina* contienen cantidades apreciables de almidón o glucógeno (>50% de su peso seco) (Ueda et al., 1996). Matsumoto et al. (Matsumoto et al., 2003) han descrito 76 especies de microalgas marinas con un contenido en carbohidratos entre el 40 y el 53%. La microalga *Chlorococum sp* también se ha considerado como una fuente interesante de etanol (Harun et al 2010). Se estima que se pueden producir

entre 50000 y 150000L de etanol por hectárea y año a partir de microalgas (Cheryl, 2010), varios órdenes de magnitud superior a la producción obtenida por otras materias primas.

Múltiples estudios han demostrado que las alteraciones en las concentraciones de nutrientes pueden modificar el crecimiento y metabolismo secundario de las microalgas (Behrens y Kyle, 1996; Hsieh y Wu, 2009). Además este crecimiento depende no solo del adecuado aporte de macronutrientes sino de algunos micronutrientes como Fe, Mn o Zn (Sunda et al., 2005).

La disponibilidad de nitrógeno en el medio, y su consecuente efecto sobre el contenido en N de la biomasa, reflejado en la razón C/N, tiene una fuerte influencia sobre el nivel celular de proteínas, carbohidratos y lípidos. En condiciones de limitación nitrogenada, se reduce el flujo del C recién fijado a proteínas y otras biomoléculas nitrogenadas, aumentando concomitantemente la síntesis de compuestos orgánicos no nitrogenados, como lípidos y carbohidratos, los cuales se almacenan como productos de reserva. Algunas microalgas almacenan preferentemente triacilgliceroles (Kumar et al 2010) y otras acumulan almidón (Rodolfi et al., 2009; Dragone et al., 2011). El alga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* acumula cantidades significativas de almidón cuando se restringe su crecimiento, bien por limitación en la disponibilidad de CO₂ cuando se cultivan en luz o bien por la falta de acetato si están en oscuridad. Esta respuesta mimetiza la acumulación de almidón en hojas y órganos de almacenamiento no fotosintéticos de plantas superiores y parece responder a control genético nuclear relacionado con cambios en actividades enzimáticas asociadas al metabolismo del almidón. Para esta microalga se han descrito acumulaciones de hasta un 45% (Hirano et al 1997). Douskova (Douskova et al., 2008) ha publicado que *Chlorella vulgaris* crecida en condiciones de limitación de fósforo, nitrógeno o azufre aumenta de manera sustancial su contenido en almidón. Pero según otros autores (Branyikova et al., 2011) cuando las células de *Chlorella* tienen una limitación en el suministro de P y N, el contenido celular en almidón aumenta un 55% y un 38% respectivamente, pero tras 20h el cultivo deja de acumular almidón y comienza a consumirlo. Por otra parte, cultivos de *Chlorella* que creciendo en condiciones óptimas acumulan un 37% de almidón, cuando se someten a condiciones de supresión de síntesis de proteína alcanzan el 70% (Doucha y Livansky, 2009). En *Scenedesmus quadricauda* la limitación de nitrógeno inhibe la replicación del ADN, la división nuclear y celular y la síntesis de proteínas mientras que la síntesis de almidón no se veía sustancialmente afectada (Ballin et al., 1988).

En la bibliografía consultada se encuentran propuestas de cultivos de *C. vulgaris* en régimen mixotrófico encaminados a la obtención de biomasa y almidón en los que se alcanza un contenido en almidón inferior al 5%, con una productividad de 15 mg l⁻¹ d⁻¹ (Abreu et al., 2012). Claramente, los costes de producción y los problemas de contaminación de estos cultivos hacen poco viable este tipo de estrategia. Todo ello

sin tener en cuenta que la fijación de CO₂ queda reducida si se utiliza una estrategia de cultivo en la que parte del carbono incorporado proviene de una fuente orgánica.

En este trabajo quedaba claramente de manifiesto que la disponibilidad de nitrógeno, medida como suministro específico de nitrato (SEN), y la velocidad de dilución, eran los factores que más afectaban a la acumulación de almidón en cultivos continuos de *C. vulgaris* refrendado, además, por el modelo de acumulación propuesto. En las condiciones óptimas determinadas, *C. vulgaris* acumulaba más del 30% de biomasa en forma de almidón, con una productividad máxima (65 mg l⁻¹ d⁻¹) más de cuatro veces superior a la del cultivo mixotrófico. No encontramos elementos de comparación en la bibliografía, respecto a la productividad de almidón en cultivos fotoautotróficos ya que en ninguno de los trabajos citados se refieren los valores alcanzados de productividad. Por otro lado, para gran parte de la bibliografía existente relativa a producción de biomasa rica en almidón por microalgas, los procedimientos empleados para su determinación no son específicos para este polisacárido, sino genéricos para carbohidratos totales, por lo que algunos de los valores publicados para contenido o productividad de almidón deben ser tomados con la debida cautela. En este trabajo se han empleado procedimientos específicos para almidón, evitando tener en cuenta los carbohidratos (principalmente celulosa) que forman parte de la pared celular. Éstos y otros carbohidratos celulares distintos del almidón podrían hacerse disponibles como sustrato para fermentación, tras un proceso adecuado de hidrólisis. Si bien este tratamiento comporta un importante coste añadido, posibilita un mayor aprovechamiento de la biomasa generada (Harun y Danquah, 2011; Gerken et al., 2012).

Uno de los objetivos principales de este trabajo se centraba en la determinación de condiciones óptimas para la acumulación de almidón por cultivos de microalgas asociada a la eliminación de CO₂. Este enfoque, con un marcado interés biotecnológico, combina la actividad de fijación fotosintética de carbono con la generación de biomasa apropiada para fines energéticos. A tal fin se ha determinado, para *C. vulgaris*, la acumulación y productividad de almidón en cada condición de cultivo. Atendiendo a estos resultados, las condiciones óptimas para dicha acumulación no coincidían con aquellas que maximizaban la tasa de fijación fotosintética de CO₂. Por tanto, si se desea implementar un sistema de retirada de CO₂ ligado a la producción de almidón se debería llegar a un compromiso entre ambos objetivos, en el que, a pesar de verse reducida ambas capacidades respecto de sus correspondientes límites máximos, los rendimientos netos de fijación de carbono y producción de almidón fuesen aceptables y económicamente viables.

Las condiciones ambientales también juegan un papel importante en la composición de la biomasa. La alta intensidad de luz tiende a aumentar la producción de polisacáridos (Friedman et al., 1991). Se ha demostrado que la síntesis de

carbohidratos al exterior es significativamente superior en los días soleados (Tredici et al., 1991).

La síntesis de almidón en *C. vulgaris* está claramente influenciada por la luz, encontrándose los valores de acumulación más altos en situaciones de máxima irradiancia incidente. Branyikova et al (2011) sugieren que el factor con mayor impacto sobre la síntesis de almidón en *Chlorella sp.* es la irradiancia disponible como combinación de la concentración de biomasa y la irradiancia incidente. Según estos autores, el contenido en almidón de la biomasa se multiplica por cinco al pasar de 215 a 330 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Nuestro estudio sobre la acumulación de almidón a lo largo del ciclo diario mostraba que los valores máximos se obtenían al final del periodo de iluminación. Por tanto, estaría justificado diseñar estrategias de cosechado de la biomasa que coincidiesen con este momento del día para optimizar la productividad de almidón a la intemperie. Resultados similares, también con *Chlorella* pero cultivada a la intemperie en reactores de capa fina, han sido publicados por Branyikova et al (2011) con contenidos máximos de almidón del 18% al comienzo de la tarde y mínimos, 10%, al inicio de la mañana.

Para que la productividad de biomasa de microalgas sea máxima es necesario suplementar al cultivo con una cantidad suficiente de dióxido de carbono (Benemann, 1993) ya que el contenido atmosférico, junto a la limitación en la transferencia de masa, no permite sustentar un crecimiento activo. El CO_2 representa una parte sustancial de los costos de operación de los sistemas de producción de microalgas (Kadam, 1997). Para su reducción se han propuesto diversas aproximaciones utilizando gases con un alto contenido en CO_2 procedentes de incineradoras de residuos (Wang et al., 2008), centrales eléctricas de carbón (Maeda, 1995; Kadam, 2002) o de keroseno (Chae et al., 2006), calderas de gas natural (Doucha et al., 2005), o mezclas de gases de combustión simuladas (Brown, 1996). La mayor parte de estos gases residuales contienen más de un 15% de CO_2 , suficiente para sustentar la producción de microalgas a gran escala. Desde otro punto de vista, los cultivos de microalgas pueden considerarse una de las aproximaciones más efectivas para fijar CO_2 (de Morais y Costa, 2007) contribuyendo a su retirada de las fuentes emisoras y por tanto a la calidad medioambiental (Nigam y Singh, 2011).

La mayor parte de los estudios se han centrado en evaluar la tolerancia de distintas microalgas a concentraciones elevadas de dióxido de carbono sin prestar demasiada atención al posible uso de la biomasa generada (Douskova et al., 2009) y sin tomar en consideración que la concentración de CO_2 en la fase gaseosa no refleja necesariamente la concentración a la que está expuesta la microalga ya que ésta depende de la transferencia de materia y del pH del medio (Kumar et al., 2011).

Diversas especies de microalgas pueden crecer con altas concentraciones de CO_2 (Wang et al., 2008) y moderados niveles de SO_x y NO_x (Matsumoto et al., 2003). El flujo al que se pueda inyectar el gas va a depender de la irradiancia y temperatura del

cultivo (Doucha et al 2005). Las especies más utilizadas en estos estudios han sido *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis* y *Chlorococcum* empleando concentraciones de CO₂ que van desde el nivel atmosférico al 100% (Seckbach et al., 1970; Kurano et al., 1995). *Chlorococcum littorale*, una microalga marina, mostraba una excepcional tolerancia a altas concentraciones de CO₂, por encima del 60% (Satoh et al., 2004). De Morais y Costa (2007) también han publicado que *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella kessleri* y *Spirulina sp.* exhiben buena tolerancia a altos contenidos de CO₂ (superiores al 18%). Especies aisladas de ambientes extremos pueden crecer rápidamente y tolerar condiciones de alto CO₂ como *Thermosynechococcus elongatus* que crece con 20% de CO₂ (Eberly y Ely, 2012). Varios experimentos han revelado que la regulación de los fotosistemas I y II, la producción de ATP y la homeostasis de pH se mantienen en condiciones de alto CO₂ en especies que toleran elevadas proporciones de este gas pero no en especies sensibles (Demidov et al., 2000) pero, en cualquier caso, se desconocen hasta la fecha los procesos que hacen posible que estas células crezcan en condiciones de alto CO₂ (Baba y Shiraiwa, 2012).

El aporte adecuado de CO₂ para asegurar el máximo crecimiento es aproximadamente de un 5% para *Chlorella* (Nielsen, 1995). De forma general, el crecimiento de microalgas y cianobacterias se inhibe a altas concentraciones de CO₂.

Como ya se ha comentado, el uso de gases de escape viene justificado como medida de abaratamiento de costes para la producción de biomasa acoplada a la eliminación de CO₂. Estos gases tienen una composición heterogénea con presencia en algunos casos de compuestos altamente tóxicos y ácidos como NO_x y SO_x, responsables de la rápida acidificación del medio de cultivo. En este trabajo se ha evaluado la capacidad tanto de *S. vacuolatus* como *C. vulgaris* de emplear, como adecuada fuente de carbono, el CO₂ proveniente de gases de combustión de centrales térmicas de generación de electricidad. A tal fin, se utilizó una mezcla de gases preparada “ad hoc” de composición similar a la de las emisiones de una central térmica que emplea carbones bituminosos como combustible fósil para la producción del vapor de agua necesario generar energía eléctrica y que contenía, entre otras sustancias, 12% de CO₂, 0,06% de SO₂ o 0,08% de NO₂.

Previamente se analizó la tolerancia de estas microalgas al suministro en continuo de distintas concentraciones de dióxido de carbono puro. *C. vulgaris* mostraba una excelente respuesta a gaseo constante con diferentes concentraciones de CO₂ puro, siendo su cultivo viable hasta un 10% de dióxido de carbono en la corriente general de gas. *S. vacuolatus* era más restrictiva que *C. vulgaris*, ya que sus cultivos sólo eran viables cuando se gaseaban en continuo con un 1% de CO₂ puro.

Respecto al uso de la mezcla de gases de combustión, *S.vacuolatus* toleraba estos efluentes cuando la corriente estaba diluida 12 veces, conteniendo por tanto un 1% de CO₂. En estas condiciones, *S.vacuolatus* presentaba la misma productividad de biomasa y tasa de fijación de carbono que cuando se burbujeaba con 1% de CO₂ puro o

cuando se hacía a demanda, con valores de asimilación de carbono de 1,2 g de CO₂ por litro de cultivo y día y productividades de 0,7 g biomasa l⁻¹ d⁻¹. Estos valores de productividad de biomasa y de fijación de carbono estaban próximos (0,8 g biomasa l⁻¹ d⁻¹) a los descritos para especies de *Scenedesmus* aisladas en ambientes extremos, si bien, las condiciones de cultivo diferían a las de este trabajo (de Morais y Costa, 2007) y eran muy superiores a los 0,5 g de CO₂ l⁻¹ d⁻¹ referenciados por Ho et al (2010) para *Scenedesmus obliquus*. Por otro lado, *C.vulgaris* a pesar de admitir un rango más amplio de porcentajes de CO₂ puro, era igualmente restrictiva en cuanto al origen de la fuente de carbono, tolerando exclusivamente mezcla de gases de combustión diluida 12 veces o a demanda sin dilución. Su capacidad de fijación de carbono en todos los casos se veía mermada, siendo un 25% (0,9 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹) menor que el máximo determinado en este trabajo (1,2 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹).

Las especies del género *Chlorella* han sido ampliamente estudiadas y utilizadas en procesos de biomitigación de gases de origen industrial (Van Den Hende et al., 2012), aunque las condiciones de cultivo, los valores para la asimilación de carbono y los contenidos en óxidos nitrosos y sulfurosos son muy heterogéneos, como queda recogido en revisiones recientes (Pires et al., 2012), donde se reportan tasas de fijación de carbono en especies del género *Chlorella* con valores que van desde 0,6 hasta 14 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹. Cabe destacar las experiencias llevadas a cabo por Douskova (Douskova et al., 2009), utilizando como fuente de carbono el CO₂ proveniente de gases de escape de una incineradora municipal, con una composición muy heterogénea (NO_x, SO_x, Hg...), donde se mostraba que el cultivo de *C.vulgaris* era viable rindiendo unos valores de fijación de carbono superiores a los aquí determinados (4,4 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹). Los resultados presentados por Keffer (Keffer y Kleinheinz, 2002) se aseguran también un efecto nulo sobre el crecimiento de *C.vulgaris* de los óxidos nitrosos y sulfurosos.

En la mayor parte de los trabajos dirigidos a analizar el uso de microalgas para depurar gases contaminantes no se hace alusión al destino final de la biomasa, es decir, a la productividad de sus componentes celulares. En este trabajo se ha demostrado que la utilización de gases de combustión diluidos convenientemente permite obtener una biomasa de *Scenedesmus* con más de un 50% proteína y 30% de lípidos. En el caso de los cultivos de *Chlorella* se han registrado productividades de 10 mg de almidón l⁻¹ d⁻¹, bastante inferiores a las obtenidas con CO₂ puro inyectado a demanda. Se han comunicado valores de contenido en almidón de hasta un 34% de la biomasa generada (Maršálková et al., 2010). De nuevo se trata de cultivos estancos, si bien a la intemperie, que utilizan el CO₂ contenido en gases de escape.

Cultivos al exterior de *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella vulgaris*

La adecuada elección del sistema para la producción de microalgas a gran escala es un aspecto clave en el proceso de eliminación de CO₂. Se han desarrollado multitud de diseños, desde sistemas abiertos a biorreactores cerrados; estos últimos

permiten un mejor control del proceso y mayores productividades. Además, pueden construirse en una disposición vertical, reduciendo los requerimientos de espacio (Pulz et al., 2001). Sin embargo los costes de construcción, de operación y mantenimiento resultan muy elevados. Puesto que el objetivo básico de este trabajo es la retirada de CO₂, los costes del reactor deben ser bajos y la eficiencia energética elevada, aunque ello implique una reducción en la productividad de biomasa (Muñoz y Guieysse, 2006). Con estas consideraciones, para el presente estudio se compararon estanques abiertos y reactores planos operados a la intemperie, para evaluar su potencial respecto a la retirada de CO₂.

Aunque los estudios en laboratorio han permitido establecer las condiciones óptimas para maximizar la fijación de dióxido de carbono por ambas microalgas, los estudios al exterior requieren un nuevo esfuerzo de optimización. Para ambos tipos de reactor se ajustó la densidad celular mínima y la frecuencia de dilución, en función de la época del año, para conseguir un uso eficiente de la luz, ya que la irradiancia incidente es un parámetro que no se puede controlar en los sistemas a la intemperie. Otro factor clave en los cultivos al exterior, la temperatura, estuvo controlada en el RPV dentro de unos márgenes y sin control en los sistemas abiertos. Sólo el pH se ajustó al óptimo establecido.

La primera información destacable de este estudio al exterior fue la acusada diferencia en la capacidad de retirar CO₂ que presentan los cultivos a la intemperie respecto a la obtenida en las columnas de burbujeo, mantenidas bajo estricto control, dentro del laboratorio. Las tasas de fijación se reducían un orden de magnitud para las dos especies de microalgas y en ambos sistemas de cultivo. Este resultado es de especial interés porque a menudo se hacen extrapolaciones a grandes superficies y periodos anuales, del potencial de las microalgas para generar un determinado producto, a partir de datos en pequeño volumen y condiciones controladas.

Otro aspecto clave puesto de manifiesto en los cultivos al exterior es la diferente susceptibilidad de las microalgas a contaminaciones por otros organismos. Entre los patógenos con capacidad para infectar microalgas se han descrito virus, bacterias, protozoos, hongos (Elbrächter y Schnepf, 1998; Brussaard, 2004; Mayali y Azam, 2004). Se ha detectado contaminación por virus en más de 50 especies de microalgas (Nagasaki et al., 2005), incluyendo algunos que infectan a especies de microalgas responsables de afloramientos masivos. En las dos últimas décadas se han identificado muchas bacterias algicidas, la mayor parte de ellas gram-negativas (Doucette et al., 1998). Parece que su efecto dañino se debe a la liberación de ectoproteasas (Mitsutani et al., 2001). Los protistas descritos como parásitos de microalgas son zooflagelados, amebas y euglenas (Schweikert y Schnepf, 1997). El género *Amoebophrya* es el más infectivo (Park et al., 2004). La presencia de protozoos puede comprometer seriamente la viabilidad del cultivo (Subashchandrabose et al., 2013). Los hongos más genéricamente implicados en asociaciones parasitarias con

microalgas pertenecen al filum *Chytridiomycota*, denominados comúnmente como quítridos (Ibeling et al., 2004). Estos parásitos tienen un amplio rango de huéspedes (Gutman et al., 2009) y causan una alta mortalidad en poblaciones de microalgas de agua dulce o marina (Van Donk, 1989). Se han descrito contaminaciones por estos hongos en sistemas de cultivo al exterior de *Scenedesmus obliquus* (Abeliovich y Dikbuck, 1977). Su eliminación resulta complicada y costosa (Letcher et al., 2013) ya que requiere el uso de fungicidas.

Estos episodios de contaminación se han manifestado en los cultivos de *C. vulgaris* y *S. vacuolatus* tanto en estanques abiertos como en RPV. Este hecho ha resultado especialmente dramático en el caso de *Scenedesmus* que durante la experimentación sufrió continuas infecciones por el quítrido *Paraphysoderma sedebokerensis* haciendo inviable su cultivo y por tanto reconsiderando su selección inicial como organismo idóneo para procesos de retirada de CO₂. Gutman et al (2009) han descrito episodios de infección por este mismo quítrido en varias microalgas, algunas explotadas comercialmente como es el caso de *Haematococcus pluvialis*. Los datos referenciados de cultivo al exterior de alguna especie de *Scenedesmus* (*S.obliquus*) corresponden a sistemas tubulares cerrados (Hulatt y Thomas, 2011).

Sin embargo, los cultivos de *Chlorella vulgaris* solo resultaron infectados ocasionalmente por protozoos que, aunque reducían la productividad, no afectaban la viabilidad. Este hecho justifica la elección definitiva de esta microalga para el propósito de este trabajo y permiten enfatizar la necesidad de verificar en cultivos al exterior, en condiciones reales de producción, el uso potencial de una microalga para cualquier aplicación práctica. *C. vulgaris* ha sido ampliamente utilizada en sistemas masivos de producción al aire libre por su adaptabilidad a condiciones ambientales cambiantes y su alta tasa de crecimiento que la hacen competitiva en relación a algunos contaminantes. Esta capacidad de adaptación a las condiciones de exterior se ha reflejado en los resultados de este trabajo donde ha sido posible cultivar la microalga tanto en estanques abiertos como en RPV a lo largo de todo el año a pesar de las fluctuaciones en luz y temperatura.

La Figura 63 resume el comportamiento de los cultivos de *C.vulgaris* en estanque abierto en un ciclo anual correspondiente a la latitud de la ciudad de Sevilla. Cuando la irradiancia incidente es baja, los cultivos deben operarse a una densidad celular mínima menor que en condiciones de alta irradiancia. Por tanto, la operación de los cultivos al exterior debe ser modulada en función de la situación ambiental.

Realizando un promedio anual, en estanque abierto, *Chlorella vulgaris* es capaz de fijar unos 11 g de CO₂ por metro cuadrado y día. Este valor es el doble del obtenido en nuestro grupo con la cianobacteria *Anabaena ATCC 33047*, en el mismo diseño de reactor y mismo emplazamiento (Clares, 2011), superior a la obtenida con *Dunaliella salina* (García-González et al., 2003) y del mismo orden que la publicada para *Muriellopsis* sp (Blanco et al., 2007). Considerando un tiempo de operación anual

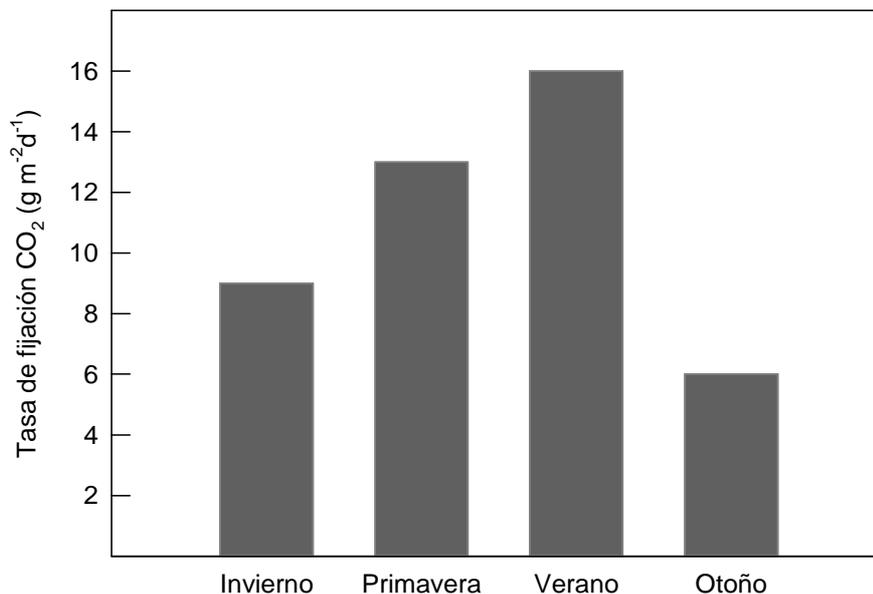


Figura 63. Evolución de la fijación de CO₂ a lo largo de un ciclo anual de cultivos de *C.vulgaris* en estanque abierto. Cada punto representa el valor promedio de las experiencias llevadas a cabo en cada estación (4-5 experiencias)

aproximado de 300 días (paradas de limpieza, etc) se pueden estimar rendimientos de 3,3 Kg de CO₂ m⁻² año⁻¹ no muy alejados del valor máximo de 6 Kg de CO₂ m⁻² año⁻¹ propuesto por algunos autores (Borowitzka, 2010).

En cultivos al exterior cobra especial importancia el diseño del reactor, cuyo principal objetivo es maximizar la utilización de la luz manteniendo una elevada relación entre el volumen de cultivo y la superficie ocupada, además de una adecuada distribución de nutrientes y transferencia de masa y gases (Acién Fernández, 2013). En este sentido, el reactor plano vertical utilizado en este trabajo tenía mayor relación volumen/superficie que el estanque abierto, además del control de temperatura, uno de los aspectos más favorables en este reactor.

La tasa de fijación de CO₂ de los cultivos de *C.vulgaris* en RPV era el doble que en estanques abiertos, con valores mínimos de 15 g CO₂ m⁻² d⁻¹ y máximos de 30 g CO₂ m⁻² d⁻¹, en las mejores condiciones de iluminación (Figura 64). A pesar que, por problemas en la instalación, no se pudo completar el estudio anual, el valor promedio calculado fue de 6 kg de CO₂ m⁻² año⁻¹ para 300 días de operación, similar al obtenido por nuestro grupo para *Anabaena ATCC 33047* (Clares, 2011), o publicado para *Nanochloropsis sp* (Zhang et al., 2001).

Aun asumiendo que el emplazamiento geográfico de los reactores es distinto, así como sus dimensiones, y por tanto las comparaciones deben ser tomadas con precaución, los datos de productividad volumétrica de *C.vulgaris* a lo largo del año en

RPV son similares a los obtenidos por Ugwu (Ugwu, 2008) para *Nannochloropsis* y por Rodolfi (Rodolfi, 2009) para diferentes estirpes de *Chlorella* y *Scenedesmus*.

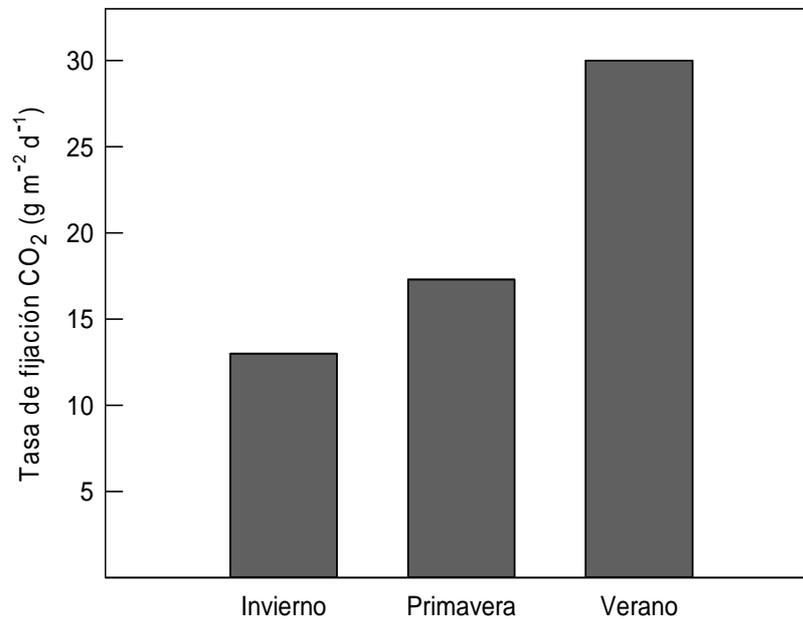


Figura 64 Evolución de la fijación de CO₂ a lo largo de un ciclo anual de cultivos de *C.vulgaris* en RPV. Cada punto representa el valor promedio de las experiencias llevadas a cabo en cada estación (4-5 experiencias)

El rendimiento de cada uno de los reactores podría mejorarse introduciendo modificaciones: en el caso de los estanques, aportando elementos de control de temperatura, en el caso de los RPV reduciendo el paso de luz o mejorando el sistema de aireación (Richmond y Cheng-Wu, 2001).

De acuerdo con los resultados que aquí se presentan, el reactor más adecuado para el cultivo de *Chlorella vulgaris* es el RPV ya que, además de su elevada capacidad de fijación de CO₂, presenta ventajas adicionales como un bajo consumo energético, gran capacidad de mezcla, moderado coste de construcción, simplicidad de manejo y susceptibilidad de escalado. Tomando estas consideraciones en su conjunto, el RPV puede suponer una opción de interés como sistema de cultivo para su aplicación a la retirada de CO₂ presente en gases de chimenea acoplada a la producción de una materia orgánica con alto contenido en almidón a partir de microalgas.

CONCLUSIONES

1. De entre once cianobacterias y microalgas, *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella vulgaris* son las especies cuyas características son las más adecuadas para destinarlas a la generación de biomasa rica en carbohidratos con CO₂ como fuente de carbono.
2. El régimen de operación en continuo es el más idóneo para conseguir la mayor eficiencia en los cultivos de microalgas. Para *Scenedesmus vacuolatus*, en condiciones óptimas, se alcanzan valores de 0,6 g l⁻¹ d⁻¹ para la productividad de biomasa y de 1,2 g l⁻¹ d⁻¹ para la tasa de fijación de CO₂. Su facilidad para flocular es una ventaja añadida para la elección de *Scenedesmus vacuolatus* como el organismo potencialmente más adecuado al propósito de este trabajo.
3. El principal factor condicionante tanto del crecimiento de *Chlorella vulgaris*, como de la producción de biomasa y fijación de CO₂ por sus cultivos es la irradiancia promedio, seguido en importancia por temperatura, disponibilidad de nitrógeno y pH. Operando en las condiciones fijadas como óptimas, la productividad resultante es de 0,7 g biomasa l⁻¹ d⁻¹, siendo la tasa de fijación de CO₂ de 1,3 g l⁻¹ d⁻¹.
4. La generación de modelos de comportamiento respecto a distintas variables permite predecir la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ de los cultivos en función de dichas variables. El modelo propuesto, tanto para *Scenedesmus vacuolatus* como para *Chlorella vulgaris*, asigna los mayores valores de productividad para el valor más elevado de irradiancia incidente máxima (3000 μE m⁻² s⁻¹) y para una velocidad de dilución de 0,5 d⁻¹. Los valores predichos son análogos a los registrados experimentalmente.
5. Resulta factible cultivar *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella vulgaris* utilizando como fuente de carbono el CO₂ contenido en mezclas de gases que simulan emisiones de origen industrial. Sin embargo, para garantizar la viabilidad de los cultivos, dicha mezcla gaseosa debe bien diluirse convenientemente con aire o suministrarse a pulsos en respuesta a la demanda del cultivo, monitorizada como aumento del pH del medio.
6. El almidón sintetizado por *Chlorella vulgaris* representa un valioso producto del metabolismo fotosintético, de clara aplicación práctica. Las variables que condicionan la acumulación de este metabolito en cultivos en régimen continuo en fotoquimiostato son la velocidad de dilución y el suministro específico de nitrato.
7. Las condiciones que más favorecen la acumulación de almidón por *Chlorella vulgaris* son: pH, 7,5; temperatura, 25°C; velocidad de dilución, 0,9d⁻¹; irradiancia incidente máxima, 3000 μEm⁻²d⁻¹; y nitrato en el medio fresco, 5mM. Así puede alcanzarse una productividad de 50 mg almidón l⁻¹ d⁻¹, aunque este valor podría ser aún más alto si la recogida de biomasa se hace coincidir con el final del periodo de máxima irradiancia.

8. Los cultivos al exterior de *Scenedesmus vacuolatus* son sensibles a contaminación por diversos microorganismos, lo que puede comprometer la utilización de esta microalga en procesos que requieran que se cultive en sistemas abiertos.
9. En las condiciones climáticas predominantes en Sevilla, *Chlorella vulgaris* puede cultivarse a lo largo de todo el año, tanto en estanques abiertos sin control de temperatura como en reactores planos verticales atemperados, sin problemas de contaminación.
10. El reactor plano vertical ofrece mayor rendimiento que los estanques abiertos para el cultivo a la intemperie de *Chlorella vulgaris*. La tasa promedio anual de fijación de carbono es de 8 g de CO₂ m⁻² d⁻¹ en estanque abierto, siendo 2,5 veces mayor en el reactor plano vertical, por lo que este último sistema parece idóneo para su empleo en procesos de captación del CO₂ presente en emisiones industriales.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del Carbono.....	22
Figura 2. El efecto invernadero.	23
Figura 3. Incremento de la concentración de los principales GEI en la atmósfera durante los últimos 1000 años..	24
Figura 4. Evolución de las emisiones de CO ₂ (Gt año ⁻¹) según sectores en los últimos 35años.	25
Figura 5. Predicción de emisiones globales de GEI según los diferentes escenarios futuros planteados por el IPCC.....	26
Figura 6. Sistemas de captura de CO ₂	29
Figura 7. Distribución oceánica de la productividad primaria de fitoplancton.....	32
Figura 8. Procesos de producción de energía usando biomasa microalgar.....	40
Figura 9. Usos y aplicaciones del cultivo de microalgas como biorrefinerías.....	41
Figura 10. Fotobiorreactores abiertos.....	44
Figura 11. Fotobiorreactores semicerrados y cerrados	47
Figura 12. Microfotografías de las cianobacterias preseleccionadas	57
Figura 13. Microfotografías de las microalgas preseleccionadas.....	58
Figura 14. Cultivo estanco en cámara climatizada	59
Figura 15. Esquema de fotoquimiostato	60
Figura 16. Fotografía de fotoquimiostato	60
Figura 17. Cultivo en estanque de 1m ²	61
Figura 18. Cultivo en reactor plano vertical	62

Figura 19 Correlación entre productividad de biomasa determinada por peso seco y por TOC.....	64
Figura 20. Decantación de cultivos densos de <i>S. vacuolatus</i> (A) y <i>C. vulgaris</i> (B).....	78
Figura 21. Efecto del pH sobre la productividad de biomasa y la tasa de fijación de CO ₂ de <i>S.vacuolatus</i> en cultivo continuo.....	80
Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ de <i>S.vacuolatus</i> en cultivo continuo.....	81
Figura 23. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ de <i>S.vacuolatus</i> en cultivo continuo.....	82
Figura 24. Efecto conjunto de temperatura e irradiancia sobre la productividad de biomasa de <i>S.vacuolatus</i> en cultivo continuo.....	83
Figura 25. Espectro de absorción de <i>Scenedesmus vacuolatus</i>	85
Figura 26. Efecto de la irradiancia promedio sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>S.vacuolatus</i> en cultivo continuo	87
Figura 27 Ajuste entre valores experimentales y del modelo basado en irradiancia promedio para <i>S.vacuolatus</i>	86
Figura 28. Ajuste entre valores experimentales y del modelo basado en irradiancia promedio y temperatura para <i>S.vacuolatus</i>	88
Figura 29 Simulación del efecto combinado de irradiancia y temperatura sobre la concentración de biomasa de cultivos de <i>S. vacuolatus</i> en régimen continuo para una tasa de dilución de 0,5 d ⁻¹	89
Figura 30. Simulación de la influencia de la irradiancia y temperatura sobre la productividad de biomasa (A) y la tasa de fijación de CO ₂ (B) de cultivos de <i>S. vacuolatus</i> en régimen continuo para una tasa de dilución de 0,5d ⁻¹	90
Figura 31. Aspecto de un cultivo de <i>S.vacuolatus</i> en condiciones óptimas de operación (A) y usando gases de escape con CO ₂ al 12% (B) como fuente de C	92

Figura 32. Composición bioquímica de cultivos en régimen continuo de <i>S.vacuolatus</i> burbujeados continuamente con aire enriquecidos con CO ₂ puro o combinado con otros gases de combustión.....	93
Figura 33. Composición bioquímica de cultivos en régimen continuo de <i>S.vacuolatus</i> burbujeados con aire enriquecido con CO ₂ puro o combinado con otros gases de combustión a demanda.....	94
Figura 34. Evolución de los cultivos semicontinuos en estanque abierto de <i>S.vacuolatus</i> representativo de experiencias viables en diferentes estaciones	95
Figura 35. Evolución de la concentración de biomasa de los cultivos de <i>S.vacuolatus</i> en RPV. Composición bioquímica de la biomasa generada	97
Figura 36. Aspecto de cultivos de <i>S.vacuolatus</i> contaminados.....	98
Figura 37. Efecto del pH sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo	100
Figura 38. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo a diferentes valores de pH..	101
Figura 39. Efecto de la temperatura sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo	102
Figura 40. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo a diferentes temperaturas	103
Figura 41. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo.....	104
Figura 42. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo a diferentes velocidades de dilución	105
Figura 43. Productividad de biomasa de <i>C.vulgaris</i> en cultivo continuo a diferentes temperaturas e irradiancias máximas incidentes	106
Figura 44. Rendimiento de los cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo a diferentes irradiancias máximas incidentes	107

Figura 45. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo a diferentes temperaturas para valores de irradiancia máxima incidente de 1000 (A) y 2000 (B) $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a diferentes temperaturas.....	108
Figura 46. Productividad y tasa de fijación de CO_2 de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo a diferentes concentraciones de NaNO_3	110
Figura 47. Composición bioquímica y productividad de almidón de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo para diferentes concentraciones de nitrato en el medio de aporte	111
Figura 48. Evolución de la acumulación de almidón durante el periodo luminoso de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo	112
Figura 49. Evolución de la concentración de almidón en la biomasa de <i>C.vulgaris</i> cultivada en régimen continuo.....	113
Figura 50. Espectro de absorción de <i>Chlorella vulgaris</i>	114
Figura 51. Variación de la velocidad específica de crecimiento con la irradiancia promedio en cultivos continuos de <i>Chlorella vulgaris</i>	115
Figura 52. Ajuste entre valores experimentales y del modelo basado en irradiancia promedio, temperatura, disponibilidad de nitrato (SEN) y pH para <i>C.vulgaris</i>	118
Figura 53. Predicción de la variación de la productividad de biomasa en función de velocidad de dilución e irradiancia máxima incidente en cultivos continuos de <i>C.vulgaris</i>	119
Figura 54. Variación de la tasa de acumulación de almidón (β) experimental y según el modelo propuesto	120
Figura 55. Simulación de la influencia de la velocidad de dilución y la disponibilidad de nitrato sobre la tasa de acumulación de almidón en cultivos continuos de <i>Chlorella vulgaris</i> según el modelo propuesto	121
Figura 56. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO_2 de <i>Chlorella vulgaris</i> en cultivo continuo con diferentes concentraciones de CO_2 en la corriente de gaseo en condiciones de cultivo óptimas	122

Figura 57. Composición bioquímica y productividad de almidón de la biomasa generada en cultivos continuos de <i>Chlorella vulgaris</i> con diferentes porcentajes de CO ₂ en la corriente de gaseo.....	123
Figura 58. Evolución del pH de los cultivos de <i>C.vulgaris</i> burbujeados con una composición de gases de combustión a diferentes diluciones y a demanda	124
Figura 59. Composición bioquímica de la biomasa producida en cultivos continuos de <i>C.vulgaris</i> con aporte de CO ₂ mediante pulsos de gases de combustión o una corriente continua diluida doce veces con aire	125
Figura 60. Demanda de CO ₂ en un cultivo continuo de <i>C.vulgaris</i> operado en condiciones óptimas.....	126
Figura 61. Evolución de la concentración de biomasa y composición bioquímica en experiencias representativas de cada estación del año de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en estanque operados a una densidad celular mínima de 0,2 g l ⁻¹	128
Figura 62. Evolución de la concentración de biomasa y composición bioquímica de la misma en experiencias representativas de cultivos de <i>C.vulgaris</i> operados en RPV a lo largo del año	130
Figura 63. Evolución de la fijación de CO ₂ a lo largo de un ciclo anual de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en estanque abierto.....	148
Figura 64. Evolución de la fijación de CO ₂ a lo largo de un ciclo anual de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en estanque abierto.....	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los reactores abiertos y cerrados para el cultivo de microalgas al exterior	48
Tabla 2. Relación de especies para este estudio	57
Tabla 3. Tasa de crecimiento y de fijación de CO ₂ (fase exponencial) y acumulación de biomasa (final fase estacionaria) de las estirpes ensayadas en las condiciones básicas empleadas	73
Tabla 4. Contenido en carbohidratos totales en cultivo estanco al final de la fase exponencial y estacionaria.	74
Tabla 5. Viscosidad de los cultivos al final de la fase estacionaria.....	74
Tabla 6. Composición bioquímica, calor de combustión y relación C/N para cada estirpe en cultivo estanco.....	75
Tabla 7. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ en estado estacionario de cultivos continuos.....	76
Tabla 8. Composición bioquímica, calor de combustión y eficiencia fotosintética en estado estacionario de cultivo continuo	76
Tabla 9. Composición de gases típica a la salida de un proceso de combustión de una central térmica de 450MW	91
Tabla 10. Productividad de cultivos continuos de <i>S.vacuolatus</i> burbujeados continuamente con aire enriquecido con CO ₂ puro o combinado con otros gases de combustión.....	93
Tabla 11. Productividad de cultivos burbujeados con aire enriquecido con CO ₂ puro o combinado con otros gases de combustión a demanda.....	94
Tabla 12. Variables de operación de cultivo semicontinuo en estanque abierto de <i>S.vacuolatus</i>	95
Tabla 13. Variables de operación de cultivo semicontinuo en estanque abierto de <i>S.vacuolatus</i>	96

Tabla 14. Variables de operación de cultivos semicontinuos en RPV de <i>S.vacuolatus</i> ..	96
Tabla 15. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ en cultivos de <i>S.vacuolatus</i>	96
Tabla 16. Biomasa acumulada y razón C/N en estado estacionario en cultivo continuo de <i>C.vulgaris</i> a diferentes concentraciones de nitrato aportado en el medio	109
Tabla 17. Productividad de biomasa y tasa de fijación de carbono en cultivos de <i>C.vulgaris</i> con aporte de CO ₂ mediante pulsos de gases de combustión o una corriente continua diluida doce veces con aire	125
Tabla 18. Frecuencia de dilución, irradiancia media incidente y temperatura media en cultivos de <i>C.vulgaris</i> operados en estanque abierto	127
Tabla 19. Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ en cultivos de <i>C.vulgaris</i> operados en estanque abierto	127
Tabla 20. Densidad celular mínima, frecuencia de diluciones, irradiancia media incidente y temperatura media de cultivos semicontinuos de <i>C.vulgaris</i> en RPV.....	129
Tabla 21. . Productividad de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ en cultivos de <i>C.vulgaris</i> en RPV.....	130

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Eficiencia asimilación de CO ₂	69
Ecuación 2. Velocidad específica de crecimiento.....	69
Ecuación 3. Productividad de biomasa en cultivo continuo	70
Ecuación 4. Tasa de fijación de CO ₂	70
Ecuación 5. Productividad de biomasa en cultivo semicontinuo.....	70
Ecuación 6. Eficiencia fotosintética	70
Ecuación 7. Irradiancia promedio.....	84
Ecuación 8. Valor de K _a	85
Ecuación 9. Ecuación crecimiento bacteriano de Monod.....	86
Ecuación 10. Aplicación de la ecuación de Monod al crecimiento de microorganismos fotosintéticos.....	86
Ecuación 11. Ecuación de Arrhenius.....	87
Ecuación 12. Modelo de crecimiento de cultivos continuos de <i>S.vacuolatus</i> basado en la irradiancia promedio (I _{av}) y la temperatura (°C)	88
Ecuación 13. Disponibilidad de nitrato en cultivos continuos medida como SEN.....	116
Ecuación 14. Efecto de SEN sobre el crecimiento de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo.....	116
Ecuación 15. Modelo de crecimiento de cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo en función de I _{av} , T y SEN.....	116
Ecuación 16. Modelo de crecimiento de los cultivos de <i>C.vulgaris</i> en régimen continuo en función de I _{av} , T ,SEN, pH.....	117
Ecuación 17. Tasa específica de acumulación de almidón, q _p	119

Ecuación 18. Tasa de acumulación de almidón en cultivos en régimen continuo de *C. vulgaris* 120

REFERENCIAS

- Abdulqader, G., L. Barsanti, M. R. Tredici (2000). "Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu." Journal of Applied Phycology **12**(3-5): 493-498.
- Abeliovich, A., S. Dikbuck (1977). "Factor affecting infection of *Scenedesmus obliquus* by a *Chytridium* sp. in sewage oxidation ponds." Applied and Environmental Microbiol **34**(6): 832-836.
- Abreu, A. P., B. Fernandes, A. A. Vicente, J. Teixeira, G. Dragone (2012). "Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source." Bioresource technology **118**: 61-66.
- Ación Fernández, F. G., D. O. Hall, E. Cañizares Guerrero, K. Krishna Rao, E. Molina Grima (2003). "Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor." Journal of biotechnology **103**: 137-152.
- Ación Fernández, F. G., C. V. Gonzalez-Lopez, J. M. Fernandez Sevilla, E. Molina Grima (2012). "Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal?" Applied microbiology and biotechnology **96**(3): 577-586.
- Ación Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J.M., Molina Grima, E. (2013). "Photobioreactors for the production of microalgae." Rev Environ Sci Biotechnol **12**: 131-151.
- Ahmad, F., A. U. Khan, A. Yasar (2013). "The potential of *Chlorella vulgaris* for wastewater treatment and biodiesel production." **45**(461-465).
- Angermayr, S. A., K. J. Hellingwerf, P. Lindblad, M. J. de Mattos (2009). "Energy biotechnology with cyanobacteria." Current opinion in biotechnology **20**(3): 257-263.
- Anjos, M., B. D. Fernandes, A. A. Vicente, J. A. Teixeira, G. Dragone (2013). "Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*." Bioresource technology **139**: 149-154.
- Anthoff, D., R. Hahn (2010). "Government failure and market failure: on the inefficiency of environmental and energy policy." Oxford Review of Economic Policy **26**(2): 197-224.
- Arbib, Z., J. Ruiz, P. Álvarez-Díaz, C. Garrido-Pérez, J. Barragan, J. A. Perales (2013). "Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photobioreactors treating urban wastewater in long-term operation." Ecological Engineering **57**: 226-235.
- Arnon, D. I. (1974). "Photochemical activity and components of membrane preparations from blue green algae. I. Coexistence of two photosystems in

relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin." Biochimica et biophysica acta **357**(2): 231-245.

Aursand, P., M. Hammer, S. T. Munkejord, Ø. Wilhelmsen (2013). "Pipeline transport of CO₂ mixtures: Models for transient simulation." International Journal of Greenhouse Gas Control **15**: 174-185.

Baba, M., Y. Shiraiwa (2012). "High-CO₂ response mechanisms in microalgae." Najafpour M (Ed) Advances in Photosynthesis: "Fundamental aspects": 299-305.

Balaji, S., K. Gopi, B. Muthuvelan (2013). "A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics." Algal Research **2**(3): 278-285.

Ballin, G., J. Doucha, V. Zachleder, I. Setlik (1988). "Macromolecular synthesis and the course of cell cycle events in the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* under nutrient starvation: Effect of nitrogen starvation." Biol Plant **30**: 81-91.

Banerjee, C., P. Gupta, S. Mishra, G. Sen, P. Shukla, R. Bandopadhyay (2012). "Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting." International Journal of Biological Macromolecules **51**(4): 456-461.

Bangash, R. F., A. Passuello, M. Sanchez-Canales, M. Terrado, A. López, F. J. Elorza, G. Ziv, V. Acuña, M. Schuhmacher (2013). "Ecosystem services in Mediterranean river basin: Climate change impact on water provisioning and erosion control." Science of the Total Environment **458-460**: 246-255.

Barbi, F., L. da Costa Ferreira (2013). "Risks and political responses to climate change in Brazilian coastal cities." Journal of Risk Research.

Barker, D. J., S. A. Turner, P. A. Napier-Moore, M. Clark, J. E. Davison (2009). "CO₂ Capture in the Cement Industry." Energy Procedia **1**(1): 87-94.

Becker, E. W. (2004). "Microalgae in Human and Animal Nutrition." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing.

Becker, E. W. (2007). "Micro-algae as a source of protein." Biotechnology advances **25**: 207-210.

Behrenfeld, M. J., R. T. O'Malley, D. A. Siegel, C. R. McClain, J. L. Sarmiento, G. C. Feldman, A. J. Milligan, P. G. Falkowski, R. M. Letelier, E. S. Boss (2006). "Climate-driven trends in contemporary ocean productivity." Nature **444**(7120): 752-755.

- Behrens, P. W., D. J. Kyle (1996). "Microalgae as a source of fatty acids." J Food Lipids **3**: 259-272.
- Benemann, J. R. (1993). "Utilization of carbon dioxide from fossil fuel-burning power plants with biological systems." Energy Conversion and Management **34**: 9-11.
- Berberoğlu, H., N. Barra, L. Pilon, J. Jay (2008). "Growth, CO₂ consumption and H₂ production of *Anabaena variabilis* ATCC 29413-U under different irradiances and CO₂ concentrations." Journal of Applied Microbiology **104**(1): 105-121.
- Blanco, A. M., J. Moreno, J. A. Del Campo, J. Rivas, M. G. Guerrero (2007). "Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds." Applied Microbiology and Biotechnology, **73**: 1259-1266.
- Blatti, J. L., J. Michaud, M. D. Burkart (2013). "Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel." Current opinion in chemical biology **17**(3): 496-505.
- Borowitzka, M. A. (1992). "Comparing carotenogenesis in *Dunaliella* and *Haematococcus*: implications for commercial production strategies." Profiles on biotechnology. Villa, T.G. y Abalde, J. (eds). Servicio de publicaciones. Universidad de Santiago: 301-310.
- Borowitzka, M. A. (1999). "Commercial applications of algae." Abstracts of 8th International conference on applied algology Montecatini Terme: 129.
- Borowitzka, M., A., Moheimani, N., R. (2010). "Sustainable biofuels from algae." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **18**(1): 13-25.
- Borowitzka, M. A. (2013). "High-value products from microalgae—their development and commercialisation." Journal of Applied Phycology **25**(3): 743-756.
- Borowitzka, M., A., Moheimani, N., R. (2010). "Sustainable biofuels from algae." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **18**(1): 13-25.
- Bosma, R., W. A. van Spronsen, J. Tramper, R. H. Wijffels (2003). "Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae." Journal of Applied Phycology **15**: 143-153.
- Branyikova, I., B. Marsalkova, J. Doucha, T. Brahyik, K. Bisova, V. Zachleder, M. Vitova (2011). "Microalgae, novel highly efficient starch producers." Biotech Bioengin **108**(4): 766-776.
- Brennan, L., P. Owende (2010). "Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products." Renewable and Sustainable Energy Reviews **14**(2): 557-577.

- Breuer, G., P. P. Lamers, D. E. Martens, R. B. Draaisma, R. H. Wijffels (2013). "Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*." Bioresource Technology **143**: 1-9.
- Brown, L. M. (1996). "Uptaken of Carbon Dioxide from flue gas by microalgae." Energy Convers. Mgmt. **37, 6-8**: 1363-1367.
- Brussaard, C. (2004). "Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry." Appl. Environ. Microb. **70**: 1506-1513.
- Bührs, T. (2010). "Emissions trading, equity, and sustainability: The case for allocating entitlements to "individuals-in-community"." Local Environment **15(9)**: 817-830.
- Burlew, J. S. (1953). "Algal culture from laboratory to pilot plant." Ed. Burlew, J.S. Carnegie Institution of Washington, Washington DC.
- Carver, S. M., C. J. Hulatt, D. N. Thomas, O. H. Tuovinen (2011). "Thermophilic, anaerobic co-digestion of microalgal biomass and cellulose for H₂ production." Biodegradation **22(4)**: 805-814.
- Castanier, S., G. Metayer-Levrel, J. P. Perthuisot (1999). "Ca-carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view." Sedimentary Geology **126**: 9-23.
- Castelvecchi, D. (2009). "Carbono, sinónimo de vida, se originó en las estrellas." Investigación y ciencia **Nº 398**.
- Chae, S. R., S. T. Kang, Y. Watanabe, H. S. Shin (2006). "Development of an innovative vertical submerged membrane bioreactor (VSMBR) for simultaneous removal of organic matter and nutrients." Water Research **40(11)**: 2161-2167.
- Chaumont, D. (1993). "Biotechnology of algal biomass production: A review of systems for outdoor mass culture." Journal of Applied Phycology **5(6)**: 593-604.
- Cheryl (2010). " Algae becoming the new biofuel of choice." <http://duelingfuels.com/biofuels/non-food-biofuels/algae-biofuel.php#more-1>.
- Chi, Z., J. V. O'Fallon, S. Chen (2011). "Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture." Trends in biotechnology **29(11)**: 537-541.
- Chisti, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." Biotechnology advances **25(3)**: 294-306.
- Choi, W., G. Kim, K. Lee (2012). "Influence of the CO₂ absorbent monoethanolamine on growth and carbon fixation by the green alga *Scenedesmus* sp." Bioresource technology **120**: 295-299.

- Chowdhury, T. R., R. P. Dick (2013). "Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands." Applied Soil Ecology **65**: 8-22.
- Clares, M. E. (2011). "Generación de materia orgánica acoplada a la eliminación de CO₂ por *Anabaena sp. ATCC 33047* y su utilización para la remoción de cadmio." Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.
- Converti, A., A. Lodi, A. Del Borghi, C. Solisio (2006). "Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. ." Biochemical Engineering Journal **32**: 13-18.
- Coward, T., J. G. M. Lee, G. S. Caldwell (2013). "Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass." Algal Research **2**(2): 135-144.
- Craig, J., U. Biffi, R. F. Galimberti, K. A. R. Ghorji, J. D. Gorter, N. Hakhoo, D. P. Le Heron, J. Thurow, M. Vecoli (2013). "The palaeobiology and geochemistry of Precambrian hydrocarbon source rocks." Marine and Petroleum Geology **40**: 1-47.
- Cuaresma, M., M. Janssen, C. Vílchez, R. H. Wijffels (2009). "Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance." Biotechnology and bioengineering **104**(2): 352-359.
- Das, D. (2001). "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature." International Journal of Hydrogen Energy **26**: 13-28.
- De la Rosa, M. A., M. Hervás, A. Serrano, M. Losada (1990). "Fotobioquímica." Ed. Síntesis.
- de Morais, M. G., J. A. V. Costa (2007). "Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp.* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor." Journal of biotechnology **129**(3): 439-445.
- de Morais, M. G., J. A. V. Costa (2007). "Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide." Energy Conversion and Management **48**(7): 2169-2173.
- Del Campo, J. A., M. García-González, M. G. Guerrero (2007). "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives." Applied Microbiology and Biotechnology **74**(6): 1163-1174.
- Demidov, E., I. Iwasaki, A. Satoh, N. Kurano, S. Miyachi (2000). "Short-term Responses of Photosynthetic Reactions to Extremely High-CO₂ Stress in a "High-CO₂" Tolerant Green Alga, *Chlorococcum littorale* and an Intolerant Green Alga *Stichococcus bacillaris*." Russian journal of plant Physiology **47**(5): 622-631.

- Demirbas, A.,M. F. Demirbas (2010). "Algae Energy (Algae as a new Source of Biodiesel)." Ed. Springer.
- Detraz, N.,L. Windsor (2013). "Evaluating Climate Migration: Population movement, insecurity and gender." International Feminist Journal of Politics.
- Dexter, J.,P. Fu (2009). "Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production." Energy and Environmental Science **2**(8): 857-864.
- Dhillon, R. S.,G. V. Wuehlisch (2013). "Mitigation of global warming through renewable biomass." Biomass and Bioenergy **48**: 75-89.
- Dinakaran, J.,K. S. Rao (2012). "Carbon sequestration in terrestrial vegetation and soils: A Review." Phytomorphology: An International Journal of Plant Morphology **62**(3-4): 177-188.
- Dirix, J., W. Peeters, J. Eyckmans, P. T. Jones,S. Sterckx (2013). "Strengthening bottom-up and top-down climate governance." Climate Policy **13**(3): 363-383.
- DOE (1999). "Carbon sequestration. State of the Science." Department of Energy USA.
- Dono, G., R. Cortignani, L. Doro, L. Giraldo, L. Ledda, M. Pasqui,P. P. Roggero (2013). "An Integrated Assessment of the Impacts of Changing Climate Variability on Agricultural Productivity and Profitability in an Irrigated Mediterranean Catchment." Water Resources Management: 1-16.
- Doucette, G. J., M. Kodama, S. Franca,S. Gallacher (1998). "Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxigenesis and cytology." Anderson DM, Cenbella AD, Hallegraeff GM (eds) Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI Series 41. Springer, Berlin Heidelberg New York: 619-647.
- Doucha, J., F. Straka,K. Livansky (2005). "Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin layer photobioreactor." Journal of Applied Phycology **17**: 403-412.
- Doucha, J.,K. Livansky (2008). "Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers." Applied microbiology and biotechnology **81**(3): 431-440.
- Doucha, J.,K. Lívanský (2008). "Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity." Journal of Applied Phycology **21**(1): 111-117.
- Doucha, J.,K. Lívanský (2011). "Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters." Journal of Applied Phycology **24**(1): 35-43.

- Douskova, I., J. Doucha, J. Machat, P. Novak, D. Umysova, M. Vitova, V. Zachleder (2008). "Microalgae as a means for converting flue gas CO₂ into biomass with a high content of starch." Bioenergy: challenges and opportunities international conference and exhibition on bioenergy. Guimarães, Portugal, April 6th–9th.
- Douskova, I., J. Doucha, K. Livansky, J. Machat, P. Novak, D. Umysova, V. Zachleder, M. Vitova (2009). "Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs." Applied Microbiology and Biotechnology **82**(1): 179-185.
- Dow, K., Dowing, T. E. (2006). "The Atlas of Climate Change (mapping the world's greatest challenge)." Ed. Earthscan.
- Dragone, G., B. D. Fernandes, A. P. Abreu, A. A. Vicente, J. A. Teixeira (2011). "Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae." Applied Energy **88**(10): 3331-3335.
- Duarte, C. M. (2009). "Cambio global. Impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra." Ed. Catarata. CSIC.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." Analytical Chemistry **28**(3): 350-356.
- Dunne, J. P., R. J. Stouffer, J. G. John (2013). "Reductions in labour capacity from heat stress under climate warming." Nature Climate Change **3**(6): 563-566.
- Dylan, A. (2012). "Rethinking sustainability on planet Earth: A time for new framings." Electronic Green Journal **1**(34).
- Eberly, J. O., R. L. J. I. M. B.-. Ely (2012). "Photosynthetic accumulation of carbón storage gompounds under CO₂ enrichment by thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates*." J Ind Microbiol Biotechnol **39**(6): 843-850.
- Elbrächter, M., E. Schnepf (1998). "Parasites of harmful algae." Anderson DM, Cenbella AD, Hallegraeff GM (eds) Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI Series 41. Springer, Berlin Heidelberg New York: 354-369.
- Elliott, L. G., C. Feehan, L. M. L. Laurens, P. T. Pienkos, A. Darzins, M. C. Posewitz (2012). "Establishment of a bioenergy-focused microalgal culture collection." Algal Research **1**(2): 102-113.
- Ellis, E. C., J. O. Kaplan, D. Q. Fuller, S. Vavrus, K. G. K., P. H. Verburg (2013). "Used planet: A global history." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(20): 7978-7985.

- Ergas, S. J., N. P. Van der Steen (2013). "Preface." Rev Environ Sci Biotechnol **12**: 115-117.
- Eriksen, N. T. (2008). "The technology of microalgal culturing." Biotechnology Letters **30**: 1525-1536.
- Erisman, J. W., J. N. Galloway, S. Seitzinger, A. Bleeker, N. B. Dise, A. M. Roxana Petrescu, A. M. Leach, W. de Vries (2013). "Consequences of human modification of the global nitrogen cycle." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **368**(1621).
- Esteban, G. F., T. Fenchel, B. J. Finlay (2010). "Mixotrophy in ciliates." Protist **161**(5): 621-641.
- Falkowski, P., R. J. Scholes, E. Boyle, J. Canadell, D. Canfield, J. Elser, N. Gruber, K. Hibbard, P. Högberg, S. Linder, F. T. Mackenzie, B. Moore, T. Pedersen, S. Rosenthal, Y. Seitzinger, V. Smetacek, W. Steffen (2000). "The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System." Science **290** (5490): 291-296.
- Falkowski, P., J. A. Raven (1997). "Aquatic photosynthesis." ED. Blackwell Science.
- Fleck-Schneider, P., F. Lehr, C. Posten (2007). "Modelling of growth and product formation of *Porphyridium purpureum*." Journal of biotechnology **132**(2): 134-141.
- Fon Sing, S., A. Isdepsky, M. A. Borowitzka, N. R. Moheimani (2011). "Production of biofuels from microalgae." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **18**(1): 47-72.
- Franco, M. C., M. F. Buffing, M. Janssen, C. V. Lobato, R. H. Wijffels (2012). "Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions." Journal of Applied Phycology **24**(4): 693-699.
- Friedman, O., Z. Dubinsky, S. Arad (1991). "Effect of light intensity on growth and polysaccharide production in red and blue-green rhodophyta unicells." Bioresour Technol **38**: 105-110.
- Frigon, J. C., F. Matteau-Lebrun, R. Hamani Abdou, P. J. McGinn, S. J. B. O'Leary, S. R. Guiot (2013). "Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion." Applied Energy **108**: 100-107.
- Gao, G. (2013). "Research status and oil & gas geology significance of carbonate rock stylonite." Natural Gas Geoscience **24**(2): 218-226.
- García-González, M., J. C. Manzano, J. Moreno, M. G. Guerrero (2000). "Biotecnología del cultivo de *Dunaliella salina* en el litoral andaluz." Pesca y acuicultura. Junta de Andalucía **16/00**.

- García-González, M., J. Moreno, J. P. Cañavate, V. Anguis, A. Prieto, J. C. Manzano, F. J. Florencio, M. G. Guerrero (2003). "Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain." Journal of Applied Phycology **15**: 177-184.
- García-Guerrero, M., J. Moreno Fernández, M. García González, A. Martínez Blanco, F. G. Acién Fernández, E. Molina Grima (2006). "Method of fixing carbon dioxide using a culture of cyanobacteria." Patente P200501126, W06070056ES.
- Gerken, H. G., B. Donohoe, E. P. Knoshaug (2012). "Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production." Planta.
- Glazer, A. N. (1994). "Phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores." J.Appl.Phycol. **6**: 105-122.
- González López, C. V., F. G. Acién Fernández, J. M. Fernández Sevilla, J. F. Sánchez Fernández, M. C. Cerón García, E. Molina Grima (2009). "Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047 in CO₂ removal processes." Bioresource Technology **100**(23): 5904-5910.
- Gouveia, L., A. C. Oliveira (2009). "Microalgae as a raw material for biofuels production." Journal of industrial microbiology & biotechnology **36**(2): 269-274.
- Gressel, J. (2008). "Transgenics are imperative for biofuel crops." Plant Science **174**: 246-263.
- Grobbelaar, J. U. (1994). "Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations." Journal of Applied Phycology **6**(331-335).
- Grobbelaar, J. U. (2009). "Factors governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate." Journal of Applied Microbiology **21**: 489-492.
- Gudin, C., C. Thepenier (1986). "Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae." Adv.Biotechnol.Processes **6**: 73-110.
- Guillard, R. R. L., J. H. Ryther (1962). "Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea*." Canadian Journal of Microbiology **8**(2): 229-239.
- Gutman, J., A. Zarka, S. Boussiba (2009). "The host-range of *Paraphysoderma sedebokerensis*, a chytrid that infects *Haematococcus pluvialis*." European Journal of Phycology **44**(4): 509-514.
- Hadj-Romdhane, F., P. Jaouen, J. Pruvost, D. Grizeau, G. Van Vooren, P. Bourseau (2012). "Development and validation of a minimal growth medium for recycling *Chlorella vulgaris* culture." Bioresource technology **123**: 366-374.

- Han, W., C. Li, X. Miao, G. Yu (2012). "A novel miniature culture system to screen CO₂-sequestering microalgae." Energies **5**(11): 4372-4389.
- Harder, R., H. von Witsh (1942). "Uber massenkultur von diatomeen." Ber.Bot.Ges. **60**: 146-152.
- Harun, R., B. Liu, M. K. Danquah (2011). "Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass." Progress in Biomass and Bioenergy Production.
- Harun, R., M. K. Danquah (2011). "Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production." Chemical Engineering Journal **168**(3): 1079-1084.
- Hasan, S., G. Gupta, S. Anand, H. Kaur (2013). "Climate change and energy systems - An overview." International Journal of Applied Engineering Research **8**(12 SPL): 72-79.
- Henrard, A. A., M. G. de Morais, J. A. Costa (2011). "Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium sp.*" Bioresource technology **102**(7): 4897-4900.
- Herbert, D., P. P.J., S. R.E. (1971). "Chemical analysis of microbial cells. En:." Methods in Microbiology, vol. 5B (Eds.: J.R.Norris & D.W.Ribbons), Academic
- Ho, S. H., C. Y. Chen, D. J. Lee, J. S. Chang, D. J. Lee, J. S. Chang (2011). "Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems-a review." Biotechnology advances **29**(2): 189-198.
- Houghton, R. A. (2007). "Balancing the Global Carbon Budget." Annual Review of Earth and Planetary Sciences **35**(1): 313-347.
- Hsieh, C. H., W. T. Wu (2009). "Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation." Bioresour Technol **100**: 3921-3926.
- <http://earthobservatory.nasa.gov/>.
- <http://edgar.jrc.ec.europa.eu/> (2013).
- <http://science.energy.gov/ber/>.
- <http://unfccc.int/2860.php>.
- <http://www.esrl.noaa.gov/>.
- <http://www.iea.org>. (2013).

http://www.nature.com/news/global-carbon-dioxide-levels-near-worrisome-milestone-1.12900_

Hu, Q., H. Guterman, A. Richmond (1996). "A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs." Biotechnology and Bioengineering **51**: 51-60.

Hu, Q. (2004). "Environmental effects on cell composition." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing: 83-96.

Huang, H. J., X. Z. Yuan, H. N. Zhu, H. Li, Y. Liu, X. L. Wang, G. M. Zeng (2013). "Comparative studies of thermochemical liquefaction characteristics of microalgae, lignocellulosic biomass and sewage sludge." Energy **56**: 52-60.

Huesemann, M. H., J. Van Wagenen, T. Miller, A. Chavis, S. Hobbs, B. Crowe (2013). "A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds." Biotechnology and bioengineering **110**(6): 1583-1594.

Hulatt, C. J., D. N. Thomas (2011). "Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude." Bioresource technology **102**(12): 6687-6695.

Huntley, M. E., D. G. Redalje (2007). "CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **12**: 573-608.

Ibeling, B. W., A. De Bruin, M. Kagami, M. Rijkeboer, M. Brehm, E. Van Donk (2004). "Host parasite interactions between freshwater phytoplankton and chytrid fungi (Chytridiomycota)." J Phycol **40**: 437-453.

Illman, A. M., A. H. Scragg, S. W. Shales (2000). "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium." Enzyme and Microbial Technology.

IPCC, I. P. f. C. C. (2005). "Special report on carbon dioxide capture and storage."

IPCC, I. P. f. C. C. (2007). "Climate Change 2007: Synthesis Report."

Ismail, O. M., O. F. Dakhly, M. N. Ismail (2011). "Influence of some bacteria strains and algae as biofertilizers on growth of bitter orange seedlings." Australian Journal of Basic and Applied Sciences **5**(11): 1285-1289.

Israelsson, P. H., A. C. Chow, E. E. Adams (2010). "An updated assessment of the acute impacts of ocean carbon sequestration by direct injection." International Journal of Greenhouse Gas Control **4**(2): 262-271.

- Kadam, K. L. (1997). "Plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation." Economic impact of different process options. Energy Conversion Manag. **38**: 505-510.
- Kadam, K. L. (2002). "Environmental implications of power generation via coal-microalgae cofiring." Energy **27**(10): 905-922.
- Keffer, J. E., G. T. Kleinheinz (2002). "Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in a photobioreactor." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **29**(5): 275-280.
- Khan, S. A., M. Z. H. Rashmi, S. Prasad, U. C. Banerjee (2009). "Prospects of biodiesel production from microalgae in India." Renewable and Sustainable Energy Reviews **13**: 2361-2372.
- Kim, D. G., S. B. Hur (2013). "Growth and fatty acid composition of three heterotrophic *Chlorella* species." Algae **28**(1): 101-109.
- Kim, S. K., Y. D. Ravichandran, S. B. Khan, Y. T. Kim (2008). "Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms." Biotechnology and Bioprocess Engineering **13**(5): 511-523.
- Knoope, M. M. J., A. Ramírez, A. P. C. Faaij (2013). "A state-of-the-art review of techno-economic models predicting the costs of CO₂ pipeline transport." International Journal of Greenhouse Gas Control **16**: 241-270.
- Kochert, G. (1978). "Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods." Ed. J.A.Hellebust & J.S.Craigie. Cambridge University Press, Cambridge: 95-97.
- Koop, G., L. Tole (2013). "Forecasting the European carbon market." Journal of the Royal Statistical Society. Series A: Statistics in Society **176**(3): 723-741.
- Kuhlman, T., J. Farrington (2010). "What is sustainability?" Sustainability **2**(11): 3436-3448.
- Kumar, K., C. N. Dasgupta, B. Nayak, P. Lindblad, D. Das (2011). "Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria." Bioresource Technology **102**(8): 4945-4953.
- Kurano, N., H. Ikemoto, H. Miyashita, T. Hasegawa, H. Hata, M. S. (1995). "Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis."
- Lakaniemi, A. M., C. J. Hulatt, K. D. Wakeman, D. N. Thomas, J. A. Puhakka (2012). "Eukaryotic and prokaryotic microbial communities during microalgal biomass production." Bioresource technology **124**: 387-393.

- Lal, R. (2001). The potential of soils of the tropics to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect. **76**: 1-30.
- Lal, R. (2008). "Carbon sequestration." Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences **363**(1492): 815-830.
- Lal, R. (2013). "Enhancing ecosystem services with no-till." Renewable Agriculture and Food Systems **28**(02): 102-114.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, M. M. Cox (1995). "Principios de Bioquímica. Segunda Edición." Worth Publishers, Inc. New York. USA.
- Letcher, P. M., S. Lopez, R. Schmieder, P. A. Lee, C. Behnke, M. J. Powell, R. C. McBride (2013). "Characterization of *Amoebophilidium protococcarum*, an Algal Parasite New to the Cryptomycota isolated from an Outdoor Algal Pond Used for the Production of Biofuel." PloS one **8**(2).
- Lin, T.P, T. Caspar, C. Somerville (1988). "Isolation and Characterization of a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh Lacking ADPglucose Pyrophosphorylase Activity." Plant Physiol **86**: 1131-1135.
- Liu, B., C. Benning (2013). "Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself." Current opinion in biotechnology **24**(2): 300-309.
- Losada, M., M. A. Vargas, M. A. De la Rosa, F. J. Florencio (1998). "Los elementos y moléculas de la vida." Ed. Rueda.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lucas-Salas, L. M., M. Castrillo, D. Martínez (2013). "Effects of dilution rate and water reuse on biomass and lipid production of *Scenedesmus obliquus* in a two-stage novel photobioreactor." Bioresource Technology **143**: 344-352.
- Luedeking, R., E. L. Piret (1959). "A Kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH."
- Maeda, K. (1995). "CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae." Energy Convers. Manag. **36**: 717-720.
- Makareviciene, V., S. V., V. Andruleviciute (2013). "Biodiesel fuel from microalgae-promising alternative fuel for the future: a review." Rev Environ Sci Biotechnol **12**: 119-130.
- Malkin, R., K. Niyogi (2000). "Photosynthesis." Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

- Mallick, N., S. Mandal, A. K. Singh, M. Bishai, A. Dash (2012). "Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **87**(1): 137-145.
- Markou, G., I. Angelidaki, D. Georgakakis (2012). "Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels." Applied Microbiology and Biotechnology **96**(3): 631-645.
- Maršálková, B., M. Širmerová, M. Kuřec, T. Brányik, I. Brányiková, K. Melzoch, V. Zachleder (2010). "Microalgae *Chlorella sp.* as an Alternative Source of Fermentable Sugars." Chemical engineering transactions volume 21, 2010 **21**: 1279-1284.
- Masojídek, J., M. Koblížek, G. Torzillo (2004). "Photosynthesis in microalgae." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing: 20-39.
- Matsumoto, M., Y. Hiroko, S. Nobukazu, O. Hiroshi, M. Tadashi (2003). "Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production." Appl Biochem Biotech Bioengin **105**: 247-254.
- Mayali, X., F. Azam (2004). "Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms." J Eukaryot Microbiol **51**(139-144)
- McHenry, M. P. (2013). "Hybrid microalgal biofuel, desalination, and solution mining systems: Increased industrial waste energy, carbon, and water use efficiencies." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **18**(1): 159-167.
- Miranda, J. R., P. C. Passarinho, L. Gouveia (2012). "Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production." Applied microbiology and biotechnology **96**(2): 555-564.
- Mitra, D., J. van Leeuwen, B. Lamsal (2012). "Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products." Algal Research **1**(1): 40-48.
- Mitsutani, A., I. Yamasak, H. Kitaguchi, J. Kato, S. Ueno, Y. Ishida (2001). "Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas sp* strain A25 by two-dimensional electrophoresis." Phycologia **40**: 286-291.
- Molina Grima, E., F. Garcia Camacho, J. A. Sanchez Perez, J. M. Fernandez Sevilla, F. G. Acién Fernandez, A. Contreras Gomez (1994). "A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **61**(2): 167-173.

- Molina Grima, E., J. Fernández, A. F. G., Y. Chisti (2001). "Tubular photobioreactor desing for algal cultures." Journal of Biotechnology **2**: 113-131.
- Molina Grima, E., F. G. Acien Fernández, A. Robles Medina (2004). "Downstream Processing of Cell-mass and Products." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing.
- Morales, E., M. Rodríguez, D. García, C. Loreto, E. Marco (2002). "Crecimeinto, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂." Interciencia **7**: 373-378.
- Moreno, J., H. Rodríguez, M. A. Vargas, J. Rivas, M. G. Guerrero (1995). "Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains." Journal of Applied Phycology **7**(1): 17-23.
- Moreno, J., M. A. Vargas, H. Olivares, J. Rivas, M. G. Guerrero (1998). "Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture." Journal of biotechnology **60**(3): 175-182.
- Moreno-Garrido, I. (2008). "Microalgae immobilization: current techniques and uses." Bioresource technology **99**(10): 3949-3964.
- Muñoz, R., B. Guieysse (2006). "Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review." Water Res **40**: 2799-2815.
- Nagasaky, K., Y. Tomaru, Y. Takao, K. Nishida, Y. Shirai, H. Suzuki, T. Nagumo (2005). "Previously unknown virus infects marine diatom." Appl Environ Microbiol **71**: 3528-3535.
- Nayak, B. K., D. Das (2013). "Improvement of carbon dioxide biofixation in a photobioreactor using *Anabaena* sp. PCC 7120." Process Biochemistry.
- Nema, P., S. Nema, P. Roy (2012). "An overview of global climate changing in current scenario and mitigation action." Renewable and Sustainable Energy Reviews **16**(4): 2329-2336.
- Nielsen, E. S. (1995). "Carbon dioxide as carbon source and narcotic in photosynthesis and growth of *Chlorella pyrenoidosa*." Physiologia Plantarum **8**(2): 317-335.
- Nigam, P. S., A. Singh (2011). "Production of liquid biofuels from renewable soruces." Progress in Energy and Combustion Science **37**: 52-68.

- Olson, K. R. (2013). "Soil organic carbon sequestration, storage, retention and loss in U.S. croplands: Issues paper for protocol development." Geoderma **195-196**: 201-206.
- Orandi, S.,D. M. Lewis (2013). "Biosorption of heavy metals in a photo-rotating biological contactor - A batch process study." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(11): 5113-5123.
- Oreskes, N. (2004). "The scientific consensus on Climate Change." Science **306**: 1686.
- Orr, J. C., V. J. Fabry, O. Aumont, L. Bopp, S. C. Doney, R. A. Feely, A. Gnanadesikan, N. Gruber, A. Ishida, F. Joos, R. M. Key, K. Lindsay, E. Maier-Reimer, R. Matear, P. Monfray, A. Mouchet, R. G. Najjar, G. K. Plattner, K. B. Rodgers, C. L. Sabine, J. L. Sarmiento, R. Schlitzer, R. D. Slater, I. J. Totterdell, M. F. Weirig, Y. Yamanaka, A. Yool (2005). "Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms." Nature **437**(7059): 681-686.
- Ozaki, K.,E. Tajika (2013). "Biogeochemical effects of atmospheric oxygen concentration, phosphorus weathering, and sea-level stand on oceanic redox chemistry: Implications for greenhouse climates." Earth and Planetary Science Letters.
- Pal, R., A. Gupta, A. Tripathi (2011). "Impact of environmental factors on the biomass production of spirulina in different conditions." Vegetos **24**(2): 142-148.
- Pandey, D., M. Agrawal, J. S. Pandey (2011). "Carbon footprint: current methods of estimation." Environmental monitoring and assessment **178**(1-4): 135-160.
- Park, M. G., W. Yih, D. W. Coats (2004). "Parasites and phytoplankton, with special emphasis on dinoflagellate infections." J Eukaryot Microbiol **51**: 145-155.
- Patel, S., A. Goyal (2013). "Current and prospective insights on food and pharmaceutical applications of spirulina." Current Trends in Biotechnology and Pharmacy **7**(2): 681-695.
- Pegallapati, A. K., N. Nirmalakhandan (2013). "Internally illuminated photobioreactor for algal cultivation under carbon dioxide-supplementation: Performance evaluation." Renewable Energy **56**: 129-135.
- Pérez de las Heras, B. (2013). "Beyond Kyoto: The EU's Contribution to a More Sustainable World Economy." European Law Journal **19**(4): 577-591.
- Perez-Garcia, O., F. M. Escalante, L. E. de-Bashan, Y. Bashan (2011). "Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products." Water research **45**(1): 11-36.

- Pires, J. C. M., M. C. M. Alvim-Ferraz, F. G. Martins, M. Simões (2012). "Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept." Renewable and Sustainable Energy Reviews **16**(5): 3043-3053.
- Pirt, S. J. (1975). "Principles of microbe and cell cultivation." John Pirt (ed.) Blackwell Scientific Publications.
- Pirt, S. J., Y. K. Lee, M. R. Walach, M. W. Pirt, H. H. Balyuzi, M. J. Bazin (1983). "A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance." J.Chem.Tech.Biotechnol. **33B**: 35-58.
- Ponce-Reyes, R., E. Nicholson, P. W. J. Baxter, R. A. Fuller, H. Possingham (2013). "Extinction risk in cloud forest fragments under climate change and habitat loss." Diversity and Distributions **19**(5-6): 518-529.
- Potvin, G., Z. Zhang (2010). "Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review." Biotechnology advances **28**(6): 910-918.
- Prasanna, R., S. Triveni, N. Bidyarani, S. Babu, K. Yadav, A. Adak, S. Khetarpal, M. Pal, Y. S. Shivay, A. K. Saxena (2013). "Evaluating the efficacy of cyanobacterial formulations and biofilmed inoculants for leguminous crops." Archives of Agronomy and Soil Science. Press, London: 209-344.
- Prasanna, R., S. Triveni, N. Bidyarani, S. Babu, K. Yadav, A. Adak, S. Khetarpal, M. Pal, Y. S. Shivay, A. K. Saxena (2013). "Evaluating the efficacy of cyanobacterial formulations and biofilmed inoculants for leguminous crops." Archives of Agronomy and Soil Science. Press, London: 209-344.
- Price, G. D., M. R. Badger, F. J. Woodger, B. M. Long (2008). "Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating- mechanism (CCM): Functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants." Journal of experimental botany **59**(7): 1441-1461.
- Pulz, O., N. Gerbsch, R. Buchholz (1995). "Light energy supply in plate-type and light diffusing optical fiber bioreactors." Journal of Applied Phycology **7**: 145-149.
- Pulz, O., K. Scheibenbogen (1998). "Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input." Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology **59**: 123-152.
- Pulz, O., K. Scheibenbogen, W. Gross (2001). "Biotechnology with cyanobacteria and microalgae." Rehm H.-J., Reed G, editors. Biotechnology. Weinheim: Wiley-VCH. **10**: 105-136.
- Ras, M., J. P. Steyer, O. Bernard (2013). "Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production." Rev Environ Sci Biotechnol **12**: 153-164.

- Richmond, A. (1986). "Cell response to environmental factors." Handbook of microalgal mass culture. Ed: Richmond, A. CRC-Boca Ratón, Florida.
- Richmond, A., Z. Cheng-Wu (2001). "Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nanochloropsis sp.* outdoors." Journal of Biotechnology **85**: 259-269.
- Richmond, A. (2004). "Handbook of microalgal culture (Biotechnology and Applied Phycology)." Ed. Blackwell Publishing.
- Rippka, R. (1979). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." Journal of General Microbiology **111**(1): 1-61.
- Rodolfi, L., G. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M. Tredici (2009). "Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor." Biotechnol Bioeng **102**: 100-112.
- Roger, P. (2004). "N₂-fixing Cyanobacteria as Biofertilizers in Rice Fields." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing.
- Ruffing, A. M. (2011). "Engineered cyanobacteria: Teaching an old bug new tricks." Bioengineered Bugs **2**(3): 136-149.
- Sánchez Mirón, A., A. Contreras Gómez, F. García Camacho, E. Molina Grima, Y. Chisti (1999). "Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae." Journal of Biotechnology **70**(249-270).
- Sánchez, J. F., J. M. Fernández-Sevilla, F. G. Acien, M. C. Cerón, J. Pérez-Parra, E. Molina-Grima (2008). "Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: Influence of irradiance, dilution rate and temperature." Applied Microbiology and Biotechnology **79**(5): 719-729.
- Sarmiento, J. L., M. Gloor, N. Gruber, C. Beaulieu, A. R. Jacobson, S. E. Mikaloff Fletcher, S. Pacala, K. Rodgers (2010). "Trends and regional distributions of land and ocean carbon sinks." Biogeosciences **7**(8): 2351-2367.
- Satoh, A., N. Kurano, S. Harayama, S. Miyachi (2004). "Effects of chloramphenicol on photosynthesis, protein profiles and transketolase activity under extremely high CO₂ concentration in an extremely-high-CO₂-tolerant green microalga *Chlorococcum littorale*." Plant Cell Physiology **45**(12): 1857-1862.
- Schweikert, M., E. Schnepf (1997). "Light and electron microscopical observations on *Pirsonia punctigerae* spec nov., a nanoflagellate feeding on the marine centric diatom *Thalassiosira punctiger*." Eur J Protistol **33**: 1268-1177.

- Scragg, A. H., A. M. Illman, A. Carden, S. W. Shales (2002). "Growth of microalgae with increased caloric values in a tubular bioreactor." Biomass and Bioenergy.
- Seckbach, J., F. A. Baker, P. M. Shugarman (1970). "Algae Thrive under Pure CO₂." Nature **227**(5259): 744-745.
- Shen, Y., T. Oki, N. Utsumi, S. Kanae, N. Hanasaki (2008). "Projection of future world water resources under SRES scenarios: Water withdrawal." Hydrological Sciences Journal **53**(1): 11-33.
- Sialve, B., N. Bernet, O. Bernard (2009). "Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable." Biotechnology advances **27**(4): 409-416.
- Siegenthaler, U., T. F. Stocker, E. Tonnin, D. Lüthi, J. Schwander, B. Stauffer, D. Raynaud, J.-M. Barnola, H. Fischer, V. Masson-Delmotte, J. Jouzel (2005). "Stable Carbon Cycle–Climate Relationship During the Late Pleistocene." Science **310** N° **5752**: 1313-1317.
- Sierra, E., F. G. Ación, J. M. Fernández, J. L. García, C. González, E. Molina (2008). "Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae." Chemical Engineering Journal **138**(1–3): 136-147.
- Singh, J. S., V. C. Pandey, D. P. Singh (2011). "Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development." Agriculture, Ecosystems and Environment **140**(3-4): 339-353.
- Singh, U. B., A. S. Ahluwalia (2012). "Microalgae: a promising tool for carbon sequestration." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **18**(1): 73-95.
- Skjånes, K., C. Rebours, P. Lindblad (2013). "Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process." Critical Reviews in Biotechnology **33**(2): 172-215.
- Smith, P., P. J. Gregory (2013). "Climate change and sustainable food production." Proceedings of the Nutrition Society **72**(1): 21-28.
- Sorci, G., S. Cornet, B. Faivre (2013). "Immunity and the emergence of virulent pathogens." Infection, Genetics and Evolution **16**: 441-446.
- Stigson, P., A. Hansson, M. Lind (2012). "Obstacles for CCS deployment: An analysis of discrepancies of perceptions." Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change **17**(6): 601-619.
- Stroeve, J., M. M. Holland, W. Meier, T. Scambos, M. Serreze (2007). "Arctic sea ice decline: Faster than forecast." Geophysical Research Letters **34**(9).

- Stryer, L., J. M. Berg, J. L. Tymoczko (2002). "Bioquímica, 5ª Edición." W.H. Freeman and Company, New York. Ed. Reverté S.A.
- Subashchandrabose, S. R., B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu (2013). "Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation." Environment international **51**: 59-72.
- Sunda, W. G., N. M. Price, F. M. N. Morel (2005). "Trace metal ion buffers and their use in culture studies." Andersen RA (ed). Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier.: 35-63.
- Sydney, E. B., W. Sturm, J. C. de Carvalho, V. Thomaz-Soccol, C. Larroche, A. Pandey, C. R. Soccol (2010). "Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae." Bioresource Technology **101**(15): 5892-5896.
- Tang, H., M. Chen, S. N.K., S. O. Salley (2012). "Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor." Biotechnology and bioengineering **109**(10): 2468-2474.
- Thomas, N. V., S. K. Kim (2013). "Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals." Marine drugs **11**(1): 146-164.
- Torzillo, G., P. Carozzi, B. Pushparaj, E. Montaini, R. Materassi (1993). "A two plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*." Biotechnology and Bioengineering **42**(7)(491-498).
- Tredici, M. R., P. Carozzi, C. Z. G., R. Materassi (1991). "A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria." Bioresour Technol **38**: 153-159.
- Tredici, M. R., R. Materassi (1992). "From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms." Journal of Applied Phycology **4**: 221-231.
- Tredici, M. R. (2004). "Mass production of microalgae: Photobioreactors." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing.
- Ueda, R., S. Hirayama, K. Sugata, H. Nakayama (1996). "Process for the production of ethanol from microalgae." US Patent 5,578,472.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. (2008). "Photobioreactors for mass cultivation of algae." Bioresource technology **99**(10): 4021-4028.
- Van Den Hende, S., H. Vervaeren, N. Boon (2012). "Flue gas compounds and microalgae: (bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities." Biotechnology advances **30**(6): 1405-1424.

- Van Donk, E. (1989). "The role of fungal parasites in phytoplankton succession." Sommer U (ed) Plankton ecology: succession in plankton communities. Springer, Berlin Heidelberg New York: 171-194.
- Van Etten, J. L., D. D. Dunigan (2012). "Chloroviruses: not your everyday plant virus." Trends in plant science **17**(1): 1-8.
- Vanhala, P., A. Repo, J. Liski (2013). "Forest bioenergy at the cost of carbon sequestration?" Current Opinion in Environmental Sustainability **5**(1): 41-46.
- Vanthoor-Koopmans, M., R. H. Wijffels, M. J. Barbosa, M. H. Eppink (2013). "Biorefinery of microalgae for food and fuel." Bioresource technology **135**: 142-149.
- Vargas, M. A., H. Rodríguez, J. Moreno, H. Olivares, J. A. Campo, R. Del, J., M. G. Guerrero (1998). "Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria." Journal of Phycology **34**(5): 812-817.
- Vega, L. F. (2010). "El CO₂ como recurso. De la captura a los usos industriales." Ed. Fundación Gas Natural.
- Volkart, K., C. Bauer, C. Boulet (2013). "Life cycle assessment of carbon capture and storage in power generation and industry in Europe." International Journal of Greenhouse Gas Control **16**: 91-106.
- Vonshak, A., G. Torzillo (2004). "Environmental stress physiology." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing: 57-82.
- Voss, M., H. W. Bange, J. W. Dippner, J. J. Middelburg, J. P. Montoya, B. Ward (2013). "The marine nitrogen cycle: Recent discoveries, uncertainties and the potential relevance of climate change." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **368**(1621).
- Vunjak-Novakovic, G., Y. Kim, X. Wu, I. Berzin, J. C. Merchuk (2005). "Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas: Mathematical Modeling and Pilot-Plant Studies." Ind. Eng. Chem. Res. **44**(6154-6163).
- Walker, T. L., S. Purton, D. K. Becker, C. Collet (2005). "Microalgae as bioreactors." Plant cell reports **24**(11): 629-641.
- Wang, B., Y. Li, N. Wu, C. Q. Lan (2008). "CO₂ bio-mitigation using microalgae." Applied Microbiology and Biotechnology **79**(5): 707-718.
- Wang, Q., X. Chen (2013). "Rethinking and reshaping the climate policy: Literature review and proposed guidelines." Renewable and Sustainable Energy Reviews **21**: 469-477.

- Wang, Y., D. Duanmu, M. H. Spalding (2011). "Carbon dioxide concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*: inorganic carbon transport and CO₂ recapture." Photosynthesis research **109**(1-3): 115-122.
- Work, V. H., S. D'Adamo, R. Radakovits, R. E. Jinkerson, M. C. Posewitz (2012). "Improving photosynthesis and metabolic networks for the competitive production of phototroph-derived biofuels." Current opinion in biotechnology **23**(3): 290-297.
- Yoo, C., S.-Y. Jun, J.-Y. Lee, C.-Y. Ahn, H.-M. Oh (2010). "Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide." Bioresource technology **101** (1): 571-74.
- Yu, H., S. Jia, Y. Dai (2009). "Growth characteristics of the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultivation." Journal of Applied Phycology **21**(1): 127-133.
- Yuan-Kun, L., S. Hui (2004). "Basic culturing techniques." Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing: 40-56.
- Zarrouk, C. (1966). "Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*." Ph.D.Thesis. Université de Paris, Paris.
- Zhang, K., S. Miyachi, N., Kurano (2001). "Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency." Applied Microbiology and Biotechnology **55**: 428-433.

Nombre de archivo: TESIS DOCTORAL RGC.docx
Directorio: C:\Users\Rafa\Documents
Plantilla: C:\Users\Rafa\AppData\Roaming\Microsoft\Plantillas\Normal.dotm
Título:
Asunto:
Autor: Rafa
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 2/4/2014 3:08:00 PM
Cambio número: 2
Guardado el: 2/4/2014 3:08:00 PM
Guardado por: Rafa
Tiempo de edición: 0 minutos
Impreso el: 2/4/2014 3:12:00 PM
Última impresión completa
Número de páginas: 196
Número de palabras: 44.248 (aprox.)
Número de caracteres: 252.219 (aprox.)