



**Escola de Camins**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Camins, Canals i Ports  
UPC BARCELONATECH

**EFFECTO DE LOS NUTRIENTES EN LA  
DIVERSIDAD DE CIANOBACTERIAS Y EN LA  
PRODUCCIÓN DE CARBOHIDRATOS Y  
POLIHIDROXIBUTIRATO**

Trabajo realizado por:

**Maria Valldosera Granell**

Dirigido por:

**Enrica Uggetti y Dulce Arias**

Máster en:

**Ingeniería ambiental**

Barcelona, 15 de junio de 2018

Grupo GEMMA - Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental

**TRABAJO FINAL DE MÁSTER**

## Resumen

El incremento en las últimas décadas del uso de combustibles y productos derivados de la industria petroquímica ha derivado en el aumento de la contaminación de nuestro planeta, tanto a nivel de emisiones en la atmósfera como en la acumulación de residuos no degradables. Por ese motivo, la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de biocombustibles y biomateriales ha aumentado en los últimos años.

En el presente trabajo se estudia como los nutrientes afectan a las poblaciones de cianobacterias del suelo en la producción de carbohidratos, polímeros aptos para producir bioetanol, y a la producción de polihidroxitirato (PHB), también conocido como bioplástico. Para lograr el estudio se realizan diferentes ensayos experimentales usando fotobiorreactores cilíndricos verticales usando cultivos mixtos de cianobacterias tanto en aguas residuales como en medios sintéticos. En los experimentos se usan diferentes tiempos de retención hidráulica y distintos modos de operación, en semicontinuo y en batch.

Los resultados de los experimentos demuestran que la diversidad cianobacteriana varía en función del medio de cultivo, la alimentación, el nutriente limitado y el modo de operación. También se observa que la limitación de nutrientes permite la producción de carbohidratos de hasta el 40% y una producción de PHB que no supera el 4%. Es en los casos en que el fósforo es el nutriente limitante es cuando se consiguen estas máximas de producción.

## Resum

L'increment en les últimes dècades de l'ús de combustibles i productes derivats de la indústria petroquímica ha derivat en l'augment de la contaminació del nostre planeta, tant a nivell d'emissions atmosfèriques com en l'acumulació de residus no degradables. Per aquest motiu, la investigació i desenvolupament de noves tecnologies per a la producció de biocombustibles i biomaterials ha augmentat en els darrers anys.

En el present treball s'estudia com els nutrients afecten a les poblacions de cianobacteris del sòl en la producció de carbohidrats, polímers aptes per produir bioetanol, i com afecten a la producció de polihidroxibutirat (PHB), també conegut com bioplàstic. Per dur a terme l'estudi es realitzen diferents assaigs experimentals usant fotobiorreactors cilíndrics verticals usant cultius mixtes de cianobacteris tant en aigües residuals com en medis sintètics. En els experiments es fan servir diferents temps de retenció hidràulica i diferents maneres d'operació, en semicontinu i en batch.

Els resultats dels experiments demostren que la diversitat cianobacteriana varia en funció del medi de cultiu, de l'alimentació, del nutrient limitat i de la manera d'operació. També s'observa que la limitació de nutrients permet la producció de carbohidrats de fins al 40% i una producció de PHB que no supera el 4%. És en els casos en què el fòsfor és el nutrient limitant és quan s'aconsegueixen aquestes màximes de producció.

## Abstract

The increase in recent decades of the use of fuels and products derived from the petrochemical industry has led to an increase in the pollution of our planet, both in terms of emissions in the atmosphere and in the accumulation of non-degradable waste. For this reason, the research and development of new technologies for the production of biofuels and biomaterials has increased in recent years.

In this work we study how nutrients affect soil cyanobacterial populations in the production of carbohydrates, polymers capable of producing bioethanol, and the production of polyhydroxybutyrate (PHB), also known as bioplastic. To achieve the study, different experimental tests are carried out using vertical cylindrical photobiorreactors using mixed cultures of cyanobacteria in both wastewater and synthetic medium. In the experiments, different hydraulic retention times and different modes of operation are used, in semi-continuous and in batch.

The results of the experiments show that the cyanobacterial diversity varies depending on the culture medium, the feeding, the limited nutrient and the mode of operation. It is also observed that the limitation of nutrients allows the production of carbohydrates of up to 40% and a production of PHB that does not exceed 4%. It is in the cases in which phosphorus is the limiting nutrient is when these production maxims are achieved.

## Sumario

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>13</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivos generales.....	17
2.2. Objetivos particulares .....	17
<b>3. CIANOBACTERIAS</b>	<b>18</b>
3.1. Fotosíntesis.....	19
3.2. Hábitat .....	19
3.2.1. Suelo terrestre.....	20
3.2.2. Ambientes acuáticos .....	20
3.3. Anatomía y morfología.....	21
3.4. Taxonomía .....	22
<b>4. CULTIVO DE LAS CIANOBACTERIAS</b>	<b>24</b>
4.1. Condiciones de cultivo .....	24
4.2. Fotobiorreactores.....	26
4.2.1. Tipos de fotobiorreactores .....	26
4.2.2. Operación de los fotobiorreactores.....	27
4.3. Cultivo de las cianobacterias en aguas residuales para la producción de bioproductos .	28
<b>5. APLICACIONES Y USOS DE LAS CIANOBACTERIAS</b>	<b>33</b>
5.1. Metabolitos de interés farmacológico.....	33
5.2. Suplementos alimenticios .....	34
5.3. Biorremediación .....	34
5.4. Depuración de aguas residuales .....	35
5.5. Biocombustibles .....	35
5.5.1. Proceso de obtención de biocombustibles a partir de carbohidratos.....	36
5.6. Bioplásticos.....	36

5.6.1.	Proceso de formación de bioplásticos.....	38
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
6.1.	Materiales.....	39
6.1.1.	Fotobiorreactor de 30L .....	39
6.1.2.	Fotobiorreactores de 3L.....	40
6.1.3.	Equipamiento .....	41
6.1.4.	Reactivos .....	41
6.1.5.	Medio de cultivo sintético.....	41
6.1.6.	Agua residual.....	42
6.2.	Métodos analíticos.....	43
6.2.1.	Sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles.....	43
6.2.2.	Oxígeno disuelto.....	43
6.2.3.	Carbono total, orgánico e inorgánico .....	43
6.2.4.	Nitrógeno total.....	43
6.2.5.	Fósforo total .....	44
6.2.6.	pH.....	44
6.2.7.	Caracterización microbiana .....	44
6.2.8.	Cuantificación de PHB .....	45
6.2.9.	Cuantificación de carbohidratos.....	45
6.3.	Métodos experimentales.....	46
6.3.1.	Obtención y mantenimiento de cianobacterias del suelo .....	47
6.3.2.	Bloque 1.....	48
6.3.2.1.	Experimento R1 y R2 .....	48
6.3.2.2.	Experimento R3 y R4 .....	48
6.3.3.	Bloque 2.....	49
6.3.3.1.	Experimento P1 y P2.....	49
6.3.3.2.	Experimento P3 y P4.....	51
6.3.3.3.	Experimento P4 y P6.....	51
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
7.1.	Bloque 1.....	52

7.1.1.	Experimento R1 y R2 .....	52
7.1.1.1.	Análisis de los parámetros pH, oxígeno disuelto, TOC, TN y TP .....	52
7.1.1.2.	Evolución sólidos suspendidos volátiles .....	53
7.1.1.3.	Producción de carbohidratos y PHB.....	54
7.1.1.4.	Evolución y recuento de microorganismos.....	56
7.1.2.	Experimento R3 y R4 .....	59
7.1.2.1.	Análisis de los parámetros pH, oxígeno disuelto, TOC, TN y TP .....	59
7.1.2.2.	Evolución sólidos suspendidos volátiles .....	61
7.1.2.3.	Producción de carbohidratos y PBH.....	61
7.1.2.4.	Evolución y recuento de microorganismos.....	63
7.2.	Bloque 2.....	69
7.2.1.	Experimento P1 y P2 .....	69
7.2.1.1.	Evolución pH y oxígeno disuelto .....	69
7.2.1.2.	Evolución sólidos suspendidos volátiles .....	70
7.2.1.3.	Consumo de carbono inorgánico total .....	70
7.2.1.4.	Producción de carbohidratos y PHB.....	71
7.2.1.5.	Evolución y recuento de microorganismos.....	73
7.2.2.	Experimento P3 y P4 .....	77
7.2.2.1.	Evolución pH y oxígeno disuelto .....	77
7.2.2.2.	Evolución sólidos suspendidos volátiles .....	78
7.2.2.3.	Consumo de carbono inorgánico total .....	79
7.2.2.4.	Producción de carbohidratos y PHB.....	79
7.2.2.5.	Evolución y recuento de microorganismos.....	81
7.2.3.	Experimento P5 y P6 .....	86
7.2.3.1.	Evolución pH y oxígeno disuelto .....	86
7.2.3.2.	Evolución sólidos suspendidos volátiles .....	86

7.2.3.3.	Consumo de carbono inorgánico total .....	87
7.2.3.4.	Producción de carbohidratos y PHB.....	88
7.2.3.5.	Evolución y recuento de microorganismos.....	89
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>95</b>
8.1.	Bloque 1.....	95
8.2.	Bloque 2.....	96
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>98</b>
<b>10.</b>	<b>RECOMENDACIONES FUTURAS</b> .....	<b>99</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>100</b>



## Índice de figuras

<i>Figura 1: Cianobacterias observadas en microscopio óptico a) 100X, b) 1000X (Fuente propia)</i>	18
<i>Figura 2: Esquema de la fase luminosa de la fotosíntesis que se produce en los tilacoides (Universidad de Vigo, 2018)</i>	19
<i>Figura 3: Acumulación de cianobacterias y microalgas en suelo encharcado (N.D.)</i>	20
<i>Figura 4: Cianobacteria con heterociste y acineto (Higeldo, 2011)</i>	22
<i>Figura 5: Dos tipos de fotobiorreactor vertical de columna (Fuente propia)</i>	27
<i>Figura 6: Pseudanabaena sp. (Fuente propia)</i>	29
<i>Figura 7: Aphanocapsa sp. (Fuente propia)</i>	29
<i>Figura 8: Nostoc sp. formando una colonia y detalle de una cadena (Fuente propia)</i>	30
<i>Figura 9: Oscillatoria sp. (Fuente propia)</i>	30
<i>Figura 10: Tolypothrix sp. (fuente propia)</i>	31
<i>Figura 11: Rivularia sp. (fuente propia)</i>	31
<i>Figura 12: Chroococcus sp. (fuente propia)</i>	31
<i>Figura 13: Algas verdes de diferentes individuales y formando agregaciones (Fuente propia)</i>	32
<i>Figura 14: Diatomeas (Fuente propia)</i>	32
<i>Figura 15: Diferentes tipos de protozoos: a) vorticela, b) rotífero (Fuente propia)</i>	32
<i>Figura 16: Vía de producción de PHB (Balaji et al., 2013)</i>	38
<i>Figura 17: Fotobiorreactor de 30L con sistema de iluminación conectado al software</i>	39

<i>Figura 18: Fotobiorreactores de 3L con camisa de agua y con los pHmetros sumergidos y conectados a las bombas de ácido</i>	40
<i>Figura 19: a) Microscopio Elipse y b) imagen del cultivo con fluorescencia</i>	45
<i>Figura 20: a) Microscopio Motic y b) imagen del cultivo en campo brillante</i>	45
<i>Figura 21: Esquema de los experimentos realizados. R1, R2, R3 y R4 forman parte del primer bloque y P1, P2, P3, P4, P5 y P6 forman parte del segundo bloque</i>	46
<i>Figura 22: Imágenes que demuestran la diversidad microbiana en el fotobiorreactor de 30L durante los meses de experimentación; a) vista general del cultivo observada en 1000X; b) y c) vista general del cultivo observada en 500X; d) vista general del cultivo observada en 100X. Todas las observaciones se realizaron en microscopía de campo brillante</i>	47
<i>Figura 23: Imagen de los reactores P1 y P2 en operación</i>	50
<i>Figura 24: a) Evolución de OD en R1 y R2 y b) Evolución de pH en R1 y R2</i>	52
<i>Figura 25: a) Evolución de TOC en R1 y R2, b) Evolución de TN en R1 y R2 y c) Evolución de TP en R1 y R2</i>	53
<i>Figura 26: Evolución de SSV en R1 y R2</i>	54
<i>Figura 27: Producción de carbohidratos en R1 y R2</i>	55
<i>Figura 28: Producción de PHB en R1 y R2</i>	55
<i>Figura 29: a) Evolución de los microorganismos en R1 y b) Evolución de los microorganismos en R2</i>	56
<i>Figura 30: Evolución de la población de cianobacterias en R1</i>	57
<i>Figura 31: Evolución de la población de cianobacterias en R2</i>	58
<i>Figura 32: a) Evolución del OD en R3 y R4 y b) Evolución del pH en R3 y R4</i>	60

---

<i>Figura 33: a) Evolución de TOC en R3 y R4, b) Evolución de TN en R3 y R4 y c) Evolución de TP en R3 y R4</i>	61
<i>Figura 34: Evolución de los SSV en R3 y R4</i>	61
<i>Figura 35: Producción de carbohidratos en R3 y R4</i>	62
<i>Figura 36: Producción de PHB en R3 y R4</i>	63
<i>Figura 37: a) Evolución de los microorganismos en R3 y b) Evolución de los microorganismos en R4</i>	63
<i>Figura 38: Evolución de la población de cianobacterias en R3</i>	65
<i>Figura 39: Evolución del color del licor mezcla en R3</i>	66
<i>Figura 40: Evolución de la población de cianobacterias en R4</i>	67
<i>Figura 41: Evolución del color del licor mezcla en R4</i>	68
<i>Figura 42: a) Evolución del OD en P1 y P2 y b) Evolución del pH en P1 y P2</i>	69
<i>Figura 43: Evolución de los SSV en P1 y P2</i>	70
<i>Figura 44: a) Evolución del TIC en P1 y b) Evolución del TIC en P2</i>	71
<i>Figura 45: Producción de carbohidratos en P1 y P2</i>	72
<i>Figura 46: Producción de PHB en P1 y P2</i>	72
<i>Figura 47: a) Evolución de los microorganismos en P1 y b) Evolución de los microorganismos en P2</i>	73
<i>Figura 48: Evolución de la población de cianobacterias en P1</i>	74
<i>Figura 49: Evolución del color del licor mezcla en P1</i>	75
<i>Figura 50: Evolución de la población de cianobacterias en P2</i>	76

Efecto de los nutrientes en la diversidad de cianobacterias y en la producción de carbohidratos y polihidroxitirato	11
<i>Figura 51: Evolución del color del licor mezcla en P2</i>	77
<i>Figura 52: a) Evolución del OD en P3 y P4 y b) Evolución del pH en P3 y P4</i>	78
<i>Figura 53: Evolución de los SSV en P3 y P4</i>	78
<i>Figura 54: Evolución del TIC en P3 y P4</i>	79
<i>Figura 55: Producción de carbohidratos en P3 y P4</i>	80
<i>Figura 56: Producción de PHB en P3 y P4</i>	80
<i>Figura 57: a) Evolución de los microorganismos en P3 y b) Evolución de los microorganismos en P4</i>	81
<i>Figura 58: Evolución de la población de cianobacterias en P3</i>	82
<i>Figura 59: Evolución del color del licor mezcla en P3</i>	83
<i>Figura 60: Evolución de la población de cianobacterias en P4</i>	84
<i>Figura 61: Evolución del color del licor mezcla en P4</i>	85
<i>Figura 62: a) Evolución del OD en P5 y P6 y b) Evolución del pH en P5 y P6</i>	86
<i>Figura 63: Evolución de los SSV en P5 y P6</i>	87
<i>Figura 64: Evolución del TIC en P5 y P6</i>	87
<i>Figura 65: Producción de carbohidratos en P5 y P6</i>	88
<i>Figura 66: Producción de PHB en P5 y P6</i>	89
<i>Figura 67: a) Evolución de los microorganismos en P5 y b) Evolución de los microorganismos en P6</i>	89
<i>Figura 68: Evolución de la población de cianobacterias en P5</i>	91
<i>Figura 69: Evolución del color del licor mezcla en P5</i>	92

*Figura 70: Evolución de la población de cianobacterias en P6* \_\_\_\_\_ 93

*Figura 71: Evolución del color del licor mezcla en P6* \_\_\_\_\_ 94

## Índice de tablas

*Tabla 1: Propiedades físicas de PHB y PP. Adaptado de Balaji et al. (2013)* \_\_\_\_\_ 37

*Tabla 2: Componentes del medio de cultivo BG-11 y sus variantes* \_\_\_\_\_ 41

*Tabla 3: Características del agua residual usada en cada experimento* \_\_\_\_\_ 42

## Agradecimientos

A Dulce, por ser guía y compañera durante estos meses.

A Enrica, por darme esta oportunidad.

A los compañeros del Grupo GEMMA, por hacerme sentir como en casa.

A los compañeros del máster y del piso, por haber creado una bonita familia en Barcelona.

Als meus pares.

A l'àvia, que va poder veure-ho començar però no acabar.

## 1. Introducción

En las últimas décadas se ha producido un aumento del uso de combustibles y productos derivados de la industria petroquímica y otras fuentes de energía no renovables. Esta práctica tiene como consecuencias la contaminación del planeta. Las emisiones de contaminantes a la atmósfera, sobretodo derivadas de los combustibles fósiles, ha aumentado en los últimos tiempos y la cantidad de residuos acumulados, entre ellos el plástico, es cada vez mayor. Los plásticos se han convertido en uno de los materiales más usados a nivel mundial y su acumulación, debida a la incorrecta gestión, deriva en grandes amenazas para los seres vivos (Balaji, 2013).

Debido a los efectos negativos que comportan sobre el planeta y a modo de reemplazarlos, han sido sujeto de estudio y desarrollo energías alternativas como los biocombustibles y el biogás, así como nuevas tecnologías sostenibles para obtener bioproductos, como los bioplásticos, con emisiones de carbono neutras a la atmósfera.

En este contexto, se ha prestado especial atención a las cianobacterias debido a su capacidad de sintetizar una gran variedad de compuestos bioactivos y otros metabolitos valiosos. Las cianobacterias son capaces de sintetizar y almacenar polisacáridos como los carbohidratos y la capacidad de acumular polihidroxibutirato (Arias *et al.*, 2018). Por ese motivo, los microorganismos que realizan la fotosíntesis oxigénica, incluidas las cianobacterias y las microalgas, han atraído la atención como una fuente de carbono alternativa para las biorrefinerías (Aikawa *et al.*, 2014).

El glucógeno, procedente de los carbohidratos, constituye el sustrato principal y más adecuado para la generación de biocombustibles, principalmente a través de la fermentación anaeróbica, la digestión anaeróbica y las tecnologías de biohidrógeno (Aikawa *et al.*, 2015). En comparación con otras plantas o algas verdes que producen carbohidratos, producir glucógeno mediante las cianobacterias es ventajoso ya que éstas, al no disponer de pared celular de celulosa, no requieren pretratamientos adicionales que encarecen la extracción del producto (Nozzi *et al.*, 2013).

Por otro lado, el polihidroxibutirato (PHB) es un poliéster sintetizado que al ser biodegradable y tener unas características similares a las del plástico, se considera como una alternativa prometedora a los plásticos derivados del petróleo. Además se obtiene por procesos fotoautótrofos en los que las cianobacterias captan el dióxido de carbono, un gas de efecto invernadero, de modo



que se evita su emisión a la atmosfera (Balaji, 2013). A pesar de que su obtención más común se realiza por procesos fermentativos, éstos requieren la adición de una gran cantidad de carbono orgánico exógeno y un suministro continuo de oxígeno. Por este motivo, actualmente la producción de PHB bacteriano resulta mucho más cara que la de los plásticos tradicionales (Panda, 2006).

Debido a que la mayoría de estudios relacionados con la producción de PHB y carbohidratos mediante cianobacterias se han basado en cultivos puros o genéticamente modificados utilizando sustratos estériles, el costo de producción es elevado y tampoco permite la competencia con los combustibles i plásticos tradicionales (Arias *et al.*, 2018). Por ese motivo, se buscan enfoques alternativos a los cultivos para que sean más sostenibles en la producción de los metabolitos. Diferentes autores (Van den Hende, 2016; Arias *et al.*, 2017) demuestran que una alternativa al uso de cultivos puros con sustratos estériles podría ser el uso de cultivos mixtos de aguas residuales dominados por cianobacterias. Sin embargo, la producción de metabolitos en este tipo de cultivo sigue siendo limitada.

En estudios recientes de estrategias de acumulación de estos metabolitos se ha demostrado que las concentraciones intracelulares de PHB o glucógeno en cianobacterias podrían mejorarse modificando factores ambientales y de cultivo tales como la temperatura, el pH, la disponibilidad de carbono inorgánico, la concentración de nutrientes y la disponibilidad de luz (Khajepour, 2015). Entre estas condiciones, la limitación de nutrientes es el enfoque más utilizado y se ha demostrado que la falta de nitrógeno y fósforo en los medios de alimentación conduce a un aumento tanto de PHB como de contenido de carbohidratos (Arias *et al.*, 2018).

Por ese motivo y siguiendo la línea de estudio de los artículos revisados, lo que se pretende conseguir en ese trabajo es identificar como afecta la limitación de nutrientes, en concreto el nitrógeno y el fósforo, en las poblaciones de cianobacterias y como esta limitación afecta en la producción de carbohidratos y PHB por parte de estas cianobacterias tanto en aguas residuales como en medios sintéticos.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos generales

El objetivo general del presente trabajo es el de evaluar las dinámicas microbianas en un sistema dominado por cianobacterias del suelo tanto en un proceso de tratamiento de aguas residuales como en medios sintéticos con el fin de ver su efecto sobre la producción de polímeros, bajo diferentes condiciones y modos de operación.

Para la realización de dicho objetivo el trabajo se dividió en dos partes.

### 2.2. Objetivos particulares

En una primera parte (bloque 1), el objetivo es el de estudiar los efectos que producen los nutrientes en las dinámicas microbianas en un proceso de tratamiento de aguas residuales con cianobacterias del suelo y su efecto en la producción de carbohidratos y PHB. Para ello se realizan dos experimentos llevados a cabo en dos reactores operados en modo semicontinuo en los que se les modifica la carga de nutrientes del efluente y los tiempos de retención hidráulica.

En la segunda parte (bloque 2), se busca determinar el efecto de la limitación de fósforo (P) y nitrógeno (N) en las dinámicas microbianas y en la producción de polímeros (carbohidratos y PHB) en un reactor batch con condiciones de exceso de carbono. Para conseguirlo se realizan tres experimentos compuestos por dos reactores cada uno.

### 3. Cianobacterias

Las cianobacterias (figura 1) son microorganismos procariotas fotosintéticos que forman parte del dominio de las bacterias y son capaces de sintetizar clorofila. Se han caracterizado por su capacidad de formar la ficocianina, un pigmento que le da el color azulado. Por ese motivo las cianobacterias también son conocidas como algas verdeazuladas (Whitton y Potts, 2000).

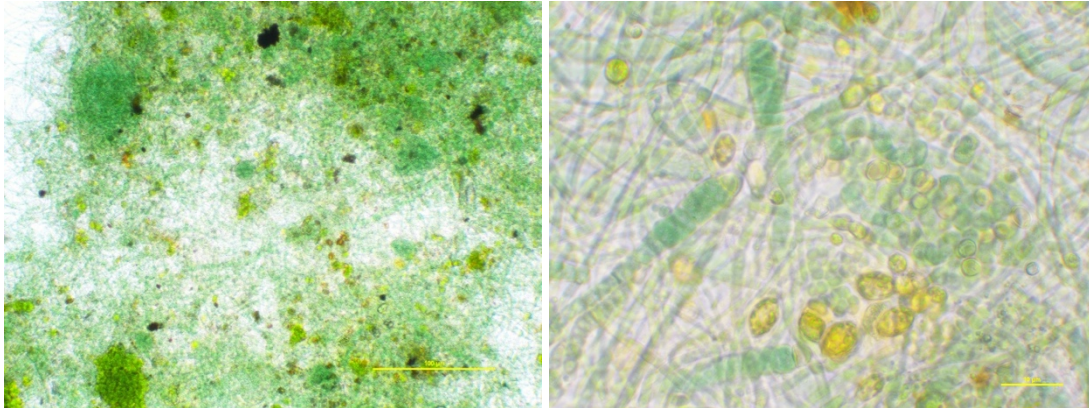


Figura 1: Cianobacterias observadas en microscopio óptico a) 100X, b) 1000X (Fuente propia)

La mayoría de las cianobacterias son fotoautótrofas aeróbicas. Sus procesos de vida requieren solo agua, dióxido de carbono, sustancias inorgánicas y luz. La fotosíntesis es su principal modo de metabolismo energético. En el ambiente natural, sin embargo, se sabe que algunas especies pueden sobrevivir largos períodos en completa oscuridad.

Las cianobacterias pueden ser consideradas el grupo más importante de organismos que se han originado en nuestro planeta ya que han sido cruciales en la evolución de los seres vivos en la Tierra. Sus adquisiciones evolutivas determinaron el camino evolutivo de todo el resto de organismos. Podría decirse que son los predecesores de todo el reino vegetal (Peleato, 2011).

Las cianobacterias son de gran interés en la biotecnología. Su capacidad para fijar el dióxido de carbono gracias a la fotosíntesis los convierte en microorganismos realmente aptos para la producción industrial y ecológica de diferentes productos químicos y biocombustibles. Además, en comparación con las bacterias heterotróficas, tienen unos requerimientos nutricionales menos complejos y son eficientes en la conversión de luz solar en biomasa en comparación con las plantas. Esta característica hace que el costo de producción de su biomasa sea menor (Lau *et al.*, 2015).

### 3.1. Fotosíntesis

Las cianobacterias realizan la fotosíntesis oxigénica, una modalidad de fotosíntesis en el que el agua es el donante primario de electrones y que, por lo tanto, se libera oxígeno como subproducto. Éstas poseen dos tipos de centros de reacción, PS I y PS II, en su aparato fotosintético (Mur, Skuberg y Utkilen, 1999).

Los pigmentos fotosintéticos de las cianobacterias se encuentran en los tilacoides (figura 2) que se encuentran libres en el citoplasma cerca de la periferia celular. Los colores de las celdas varían de azul verdoso a violeta rojo. El verde de la clorofila generalmente está enmascarado por carotenoides y pigmentos accesorios (ficobiliproteínas).

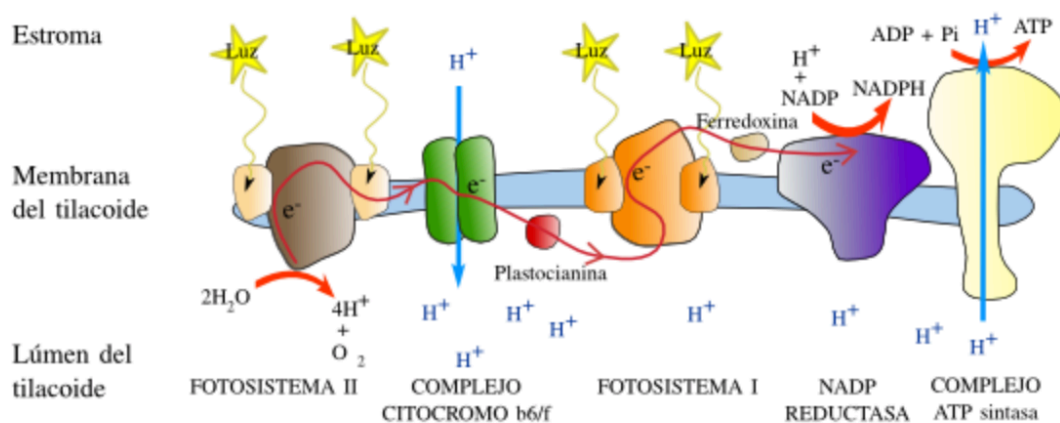


Figura 2: Esquema de la fase luminosa de la fotosíntesis que se produce en los tilacoides (Universidad de Vigo, 2018)

La capacidad de crecimiento continuo fotosintético en presencia de oxígeno, junto con tener agua como donante de electrones para la reducción de CO<sub>2</sub>, permite a las cianobacterias colonizar una amplia gama de nichos ecológicos (Whitton y Potts, 2000).

### 3.2. Hábitat

Debido a la antigüedad de las cianobacterias, éstas han sido capaces de colonizar ambientes muy diferentes. Pueden encontrarse en aguas continentales o marinas, suelos, cortezas de árboles, charcos, catacumbas, cubiertas de barcos, refrigeradores de aires acondicionados, duchas, desagües, cisternas, refrigeradores, aguas residuales... (Peleato, 2011).

Otra característica notable es su capacidad para sobrevivir temperaturas extremadamente altas y bajas. Las cianobacterias son habitantes de fuentes termales, de arroyos de montaña, de lagos árticos y antárticos y de la nieve y el hielo (Mur *et al.*, 1999).

### 3.2.1. Suelo terrestre

Las especies que son capaces de vivir en el suelo y otros hábitats terrestres tanto húmedos (figura 3) como áridos. Tienen un papel importante en los procesos funcionales de los ecosistemas, participan en la oxigenación del suelo, y en el ciclo de los nutrientes, son fijadoras del nitrógeno libre (Whitton y Potts, 2000). Además, tienen una capacidad impresionante para colonizar sustratos infértiles, como la ceniza volcánica, la arena del desierto y las rocas (Mur *et al.*, 1999).



Figura 3: Acumulación de cianobacterias y microalgas en suelo encharcado (N.D.)

Las cianobacterias también forman asociaciones simbióticas con animales y plantas. Existen relaciones simbióticas con, por ejemplo, hongos, briófitos, pteridófitos, gimnospermas y angiospermas (Mur *et al.*, 1999).

### 3.2.2. Ambientes acuáticos

Los hábitats prominentes de las cianobacterias son ambientes límnicos (agua dulce) y marinos (halófilas). Florecen en agua salada, salobre o fresca, en manantiales fríos y calientes, y en ambientes donde no pueden existir otras microalgas. La mayoría de las formas marinas crecen a lo largo de la costa como vegetación bentónica en la zona entre las marcas de marea alta y baja. Las cianobacterias son uno de los principales componentes del plancton marino y, por lo tanto, tienen una distribución global (Mur *et al.*, 1999).

También existen varias especies de agua dulce que son capaces de resistir concentraciones relativamente altas de cloruro de sodio. Las localidades de agua dulce con diversos estados tróficos son los hábitats prominentes de las cianobacterias. Numerosas especies característicamente habitan, y en ocasiones pueden dominar, aguas cercanas a la superficie (zona fótica) y zonas profundas (zona eufótica) de los lagos. También hay cianobacterias que colonizan las superficies uniéndose a rocas o sedimentos, a veces formando esteras que pueden desgarrarse y flotar hacia la superficie (Whitton y Potts, 2000).

### **3.3. Anatomía y morfología**

Comparado con otros procariontes, las cianobacterias pueden ser de tamaño más grande y poseen una compleja morfología. Pueden ser unicelulares, filamentosas, ramificadas o no, coloniales... y con gran variación en el tamaño. Pueden también formar colonias con diferente grado de complejidad.

Las cianobacterias tienen una característica que muy pocos procariontes poseen: la capacidad de llevar a cabo diferenciación celular. Esta diferenciación, que supone una expresión génica diferencial, lleva a la generación de células especializadas, como por ejemplo, los heterocistes (figura 4).

Éstos se encuentran distribuidos a lo largo o al final de los filamentos y son células especializadas más grandes y de pared engrosada con capas de glicolípidos y polisacáridos específicos, intercaladas en los filamentos para evitar la entrada del oxígeno generado por células vegetativas vecinas. En estas células se lleva a cabo la fijación de nitrógeno por la enzima nitrogenasa, que solo es activa en ambiente anaeróbico (Peleato, 2011).

Otro tipo de células especializadas son los acinetos (figura 4), células de resistencia, formadas a partir de una o más células después de almacenar las sustancias de reserva oportunas. Son más longevos que las células vegetativas. Su envoltura es muy gruesa, con muchas capas. Germinan después de un periodo desfavorable. La posición de los acinetos en el tricoma, su morfología y el tipo de germinación pueden ser característicos de las especies e incluso del género (Cirés y Quesada, 2011).

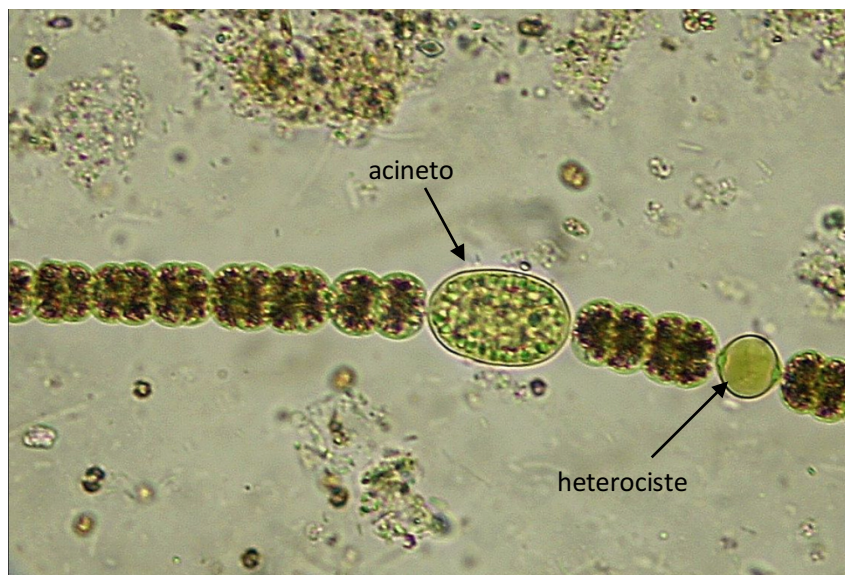


Figura 4: Cianobacteria con heterociste y acinet (Higelmo, 2011)

Otro ejemplo de la complejidad de las cianobacterias es la capacidad de adaptación cromática y la respuesta a las distintas longitudes de onda. Son capaces de desencadenar una serie de cascadas de regulación génica que permite adaptar su fisiología a las circunstancias ambientales. Además, en relación con esta adaptación cromática, algunas cianobacterias poseen unas vesículas de gas, es decir, unos sistemas de flotación que les permite moverse verticalmente y posicionarse en zonas cercanas a la superficie donde la luz es más intensa y hay más presencia de  $\text{CO}_2$  (Peleato, 2011).

### 3.4. Taxonomía

A pesar de que la taxonomía de las cianobacterias se encuentra todavía en revisión por la dificultad que supone su clasificación, en el libro de B. A. Whitton & M. Potts (2000), se sugiere la siguiente clasificación según cinco órdenes distintos en función de si se consideran como filamentosas o no:

- No-Filamentosas
  - **Orden Chroococcales.** Unidades de células unicelulares o no filamentosas unidas por una pared exterior o una matriz similar a un gel. Se reproducen por división binaria en uno, dos o tres planos, simétrica o asimétrica; o por gemación.
  - **Orden Pleurocapsales.** Unidades de células unicelulares o no filamentosas unidas por una pared exterior o una matriz similar a un gel. Reproducción por

fisiones múltiples internas con producción de células hijas más pequeñas que las originales; o por una mezcla de fisión múltiple y fisión binaria

- Filamentosas

- **Orden Oscillatoriales.** División binaria. No presentan heterocistes.
- **Orden Nostocales.** División binaria. Presentan heterocistes.
- **Orden Stigonematales.** División binaria. Presentan ramificación verdadera.



## 4. Cultivo de las cianobacterias

### 4.1. Condiciones de cultivo

El crecimiento de las cianobacterias depende de diferentes factores físicos, químicos y biológicos. Los principales factores se detallan a continuación:

- **La intensidad de la luz.** La luz es necesaria para que las cianobacterias puedan realizar la fotosíntesis pero muchas de ellas son sensibles a periodos prolongados de altas intensidades de luz. Las exposiciones prolongadas a intensidades de luz de  $320 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  son letales para muchas especies. Sin embargo, si se exponen intermitentemente a esta alta intensidad de luz, las cianobacterias crecen a su velocidad máxima aproximada (Mur *et al.*, 1999).

Un rango de longitud de onda adecuado para el crecimiento de las cianobacterias es de entre 400 nm y 700 nm. Si la intensidad es demasiado baja, la luz se convierte en un factor limitante, que por supuesto es indeseable. Una intensidad de luz demasiado alta, por otro lado, puede conducir a la fotoinhibición. Esto generalmente significa que las cianobacterias ya no pueden reparar el fotosistema II (PSII), lo que conduce a una pérdida en la actividad del complejo (Drosg *et al.*, 2015).

Para evitar que las cianobacterias permanezcan en la oscuridad permanentemente, es necesario crear un flujo turbulento al reactor que se consigue mediante agitación.

Las cianobacterias se caracterizan además por un balance energético favorable. Su constante de mantenimiento es baja, lo que significa que requieren poca energía para mantener la función y la estructura de la célula. Como resultado de esto, las cianobacterias pueden mantener una tasa de crecimiento relativamente más alta que otros organismos de fitoplancton cuando las intensidades de luz son bajas. Por lo tanto, las cianobacterias tendrán una ventaja competitiva en los lagos turbios debido a crecimientos densos de otro fitoplancton (Mur *et al.*, 1999).

- **Temperatura.** Aunque las cianobacterias son capaces de vivir en un rango de temperatura que va desde los 4°C a los 75°C, la mayoría de éstas logran tasas de crecimiento máximas a temperaturas superiores a 25°C. Estas temperaturas óptimas son más altas que las de las algas verdes y las diatomeas (Mur *et al.*, 1999).
- **pH.** La mayoría de las cianobacterias tienen su óptimo de crecimiento entre pH 7,5 y pH 10 y nunca pueden crecer por debajo de pH 4-5. El pH óptimo para la tasa máxima de crecimiento no se puede generalizar ya que varía de una cepa a otra y depende de su entorno natural (Drosg *et al.*, 2015).
- **Carbono.** Al ser organismos fotoautótrofos necesitan una fuente de carbono inorgánico, principalmente en la forma de uno de los iones disueltos disociados de CO<sub>2</sub>. Las cianobacterias fijan el carbono a través del ciclo de Calvin impulsado por la energía obtenida de la fotosíntesis. La dosificación de carbono, a través de aireadores de burbujas, puede afectar al pH. Por lo tanto, es importante controlar que el valor de pH no esté fuera del rango óptimo para el crecimiento de las cianobacterias.

Si se usa dióxido de carbono como única fuente de carbono para la producción de microalgas, se evita que este gas se emita directamente a la atmósfera. Es una práctica que además de económica, reduce la emisión de CO<sub>2</sub>, gas de efecto invernadero, a la atmósfera (Drosg *et al.*, 2015).

- **Fósforo y nitrógeno.** Los datos experimentales han demostrado que la afinidad de muchas cianobacterias por el nitrógeno o el fósforo es mayor que para muchos otros organismos fotosintéticos. Esto significa que pueden competir con otros organismos de fitoplancton en condiciones de limitación de fósforo o nitrógeno.

Una baja proporción entre las concentraciones de nitrógeno y fósforo puede favorecer el desarrollo de las floraciones de cianobacterias. Una comparación entre las proporciones óptimas de N:P para las algas eucarióticas (16-23 moléculas N: 1 molécula de P) con las tasas óptimas para las cianobacterias (10-16 moléculas N: 1 molécula P), muestra que la relación es menor para cianobacterias (Mur *et al.*, 1999).

- **Tasa de crecimiento:** La tasa de crecimiento de las cianobacterias suele ser mucho más baja que la de muchas especies de algas. A 20 ° C y saturación ligera, la mayoría de las cianobacterias planctónicas comunes alcanzan tasas de crecimiento de 0,3-1,4 duplicaciones por día, mientras que las diatomeas alcanzan 0,8-1,9 duplicaciones por día y se han observado tasas de crecimiento de hasta 1,3-2,3 duplicaciones por día en algas verdes. Las tasas de crecimiento lentas requieren largos tiempos de retención de agua para permitir la formación de cianobacterias. Por lo tanto, las cianobacterias no florecen en el agua con tiempos de retención cortos (Mur *et al.*, 1999).
- **Estabilidad de la población.** Las cianobacterias son atacadas por virus, bacterias y actinomicetos, pero la importancia de estos enemigos naturales para la descomposición de las poblaciones no se conoce bien. Debido a que tienen pocos enemigos naturales, y su capacidad de regulación de la flotabilidad que evita la sedimentación, las tasas de pérdida de poblaciones de cianobacterias son generalmente bajas. Por lo tanto, sus tasas de crecimiento lento se ven compensadas por la alta prevalencia de las poblaciones una vez se han establecido (Mur *et al.*, 1999).

## 4.2. Fotobiorreactores

Las cianobacterias se cultivan en fotobiorreactores, un tipo de reactores usados para el cultivo de microorganismos fotoautótrofos de modo que puedan realizar las reacciones fotobiológicas.

### 4.2.1. Tipos de fotobiorreactores

A grandes rasgos, se puede decir que existen dos formas para cultivar dichos microorganismos:

- Sistemas abiertos. Cultivo en estanques abiertos que se usa principalmente para el tratamiento de agua residual. Los sistemas de cultivo abierto se pueden dividir en dos sistemas principales: estanques circulares y estanques de canalización.
- Sistemas cerrados. El uso de estos sistemas está destinado principalmente al cultivo y crecimiento de microorganismos. Existen varios tipos de fotobiorreactores de sistemas cerrados. Los más comunes son los reactores tubulares, los reactores laminar o de panel plano y los fotobiorreactores de cilindros verticales.

Para el desarrollo de los experimentos del presente trabajo se usaron dos tipos distintos de reactores verticales de columna, fotobiorreactores que se clasifica dentro de los sistemas cerrados (figura 5).

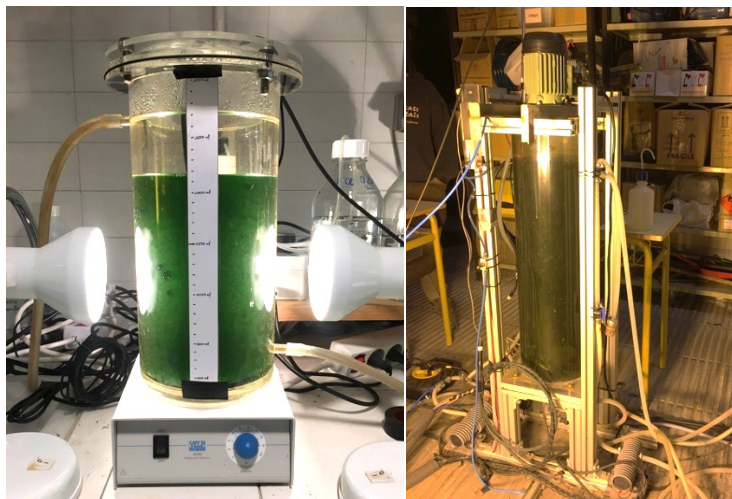


Figura 5: Dos tipos de fotobiorreactor vertical de columna (Fuente propia)

Los reactores verticales de columna son simples reactores cilíndricos transparentes. El principal beneficio de este tipo de reactor es que se consigue una buena mezcla del contenido, un buen control de la temperatura y una baja fotoinhibición y fotooxidación. El problema de esos reactores es que la disponibilidad de luz en este tipo de columnas está influenciada por la velocidad de aireación, las acumulaciones de gas y la velocidad del líquido.

#### 4.2.2. Operación de los fotobiorreactores

Los tipos de alimentación más usados en los fotobiorreactores son en modo continuo, semicontinuo, por lotes y de forma secuencial.

- Continuo: en este tipo de operación, el influente se introduce todo el tiempo en el reactor y el contenido del reactor emerge continuamente.
- Semicontinuo: esta forma de operación consiste en una extracción parcial del contenido del reactor y el reemplazo de nuevas soluciones de nutrientes cada cantidad definida de tiempo para lograr el tiempo de retención hidráulica definido.
- Lotes: estos reactores se inoculan en el momento inicial y todo el contenido del reactor se extrae después de una cantidad definida de tiempo.

- Reactor discontinuo secuencial: esta forma de operación es muy utilizada en el tratamiento de aguas residuales. Estos reactores tienen la capacidad de tener diferentes tiempos de retención hidráulica y de sólidos. Su funcionamiento consiste en 5 fases.
  1. Llenado: donde se introducen los nutrientes en el reactor
  2. Reacción: suceden todas las reacciones bioquímicas
  3. Sedimentación: se detiene la agitación y se asienta la biomasa del cultivo
  4. Descarga: Parte del líquido sobrenadante se extrae
  5. Inactivo: es el tiempo entre la decantación y el llenado

Para la correcta operación de los fotobiorreactores, se tienen que tener en cuenta dos conceptos genéricos para comprender las diferencias entre las operaciones de los reactores: el tiempo de retención hidráulica y el tiempo de retención de sólidos.

- Tiempo de retención hidráulica del reactor (TRH): es el tiempo promedio que un compuesto permanece dentro del reactor.
- Tiempo de retención de sólidos del reactor (TRS): es el tiempo promedio que la biomasa está dentro del reactor.

#### **4.3. Cultivo de las cianobacterias en aguas residuales para la producción de bioproductos**

Cultivar cianobacterias en aguas residuales es una de las opciones más económicas ya que las aguas residuales son fuentes ricas en nitrógeno y fósforo (Balaji *et al.*, 2013). En estos cultivos las especies de cianobacterias pueden variar. A continuación se describen las especies más comunes que se han detectado en los cultivos realizados del presente trabajo (Streble y Krauter, 1987).

- *Pseudanabaena* sp. (figura 6): organismos filamentosos, generalmente solitarios o aglomerados en esteras muy finas. Miden alrededor de 0.8-3  $\mu\text{m}$  de ancho y no son muy largos. Pueden ser de color azulverdoso a rojo.

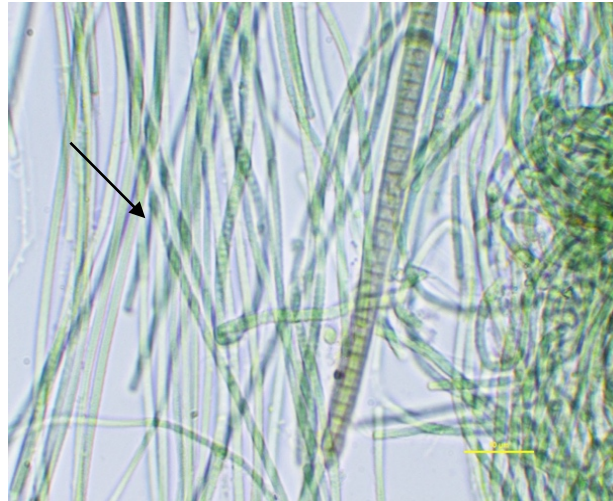


Figura 6: *Pseudanabaena* sp. (Fuente propia)

- *Aphanocapsa* sp. (figura 7): organismos más o menos esféricos y de tamaño pequeño (0.2-2  $\mu$ m). Forman colonias microscópicas. Las coloraciones de las celdas varían de gris, verde oliva, azul verdoso brillante y, a veces, pueden parecer incoloras.

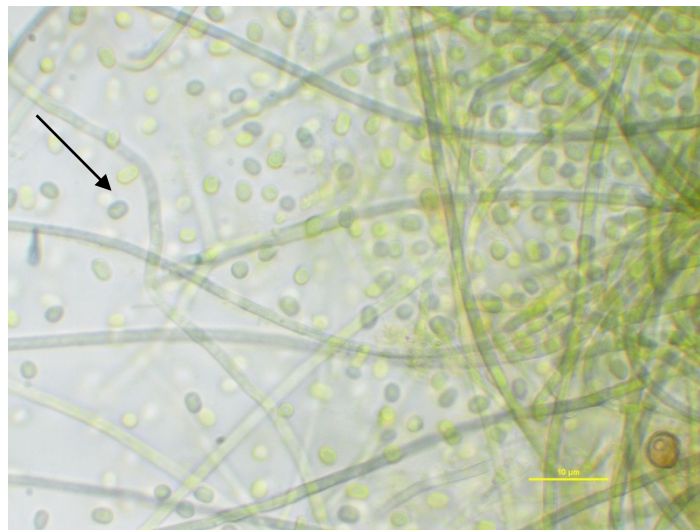


Figura 7: *Aphanocapsa* sp. (Fuente propia)

- *Nostoc* sp. (figura 8): organismos que forman colonias esféricas compuestas por filamentos. Estos filamentos se componen a su vez de células esféricas o con forma de barril. Son de color azul verdoso o verde oliva. Las colonias esféricas pueden llegar a tener 30-50 cm de diámetro.

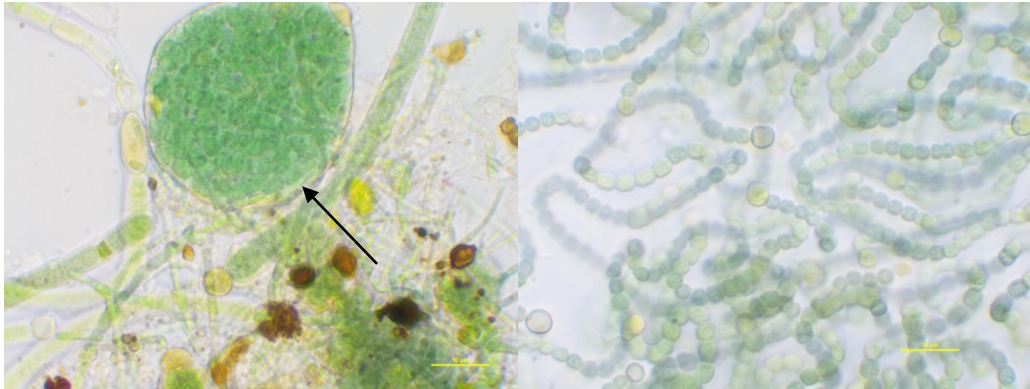


Figura 8: *Nostoc* sp. formando una colonia y detalle de una cadena (Fuente propia)

- *Oscillatoria* sp. (figura 9): organismos filamentosos procariotas fotosintéticos. Presentan septos transversales que son generalmente visibles bajo microscopía óptica. La cubierta suele ser casi invisible. No muestran ramificación ni formación de heterocistes.

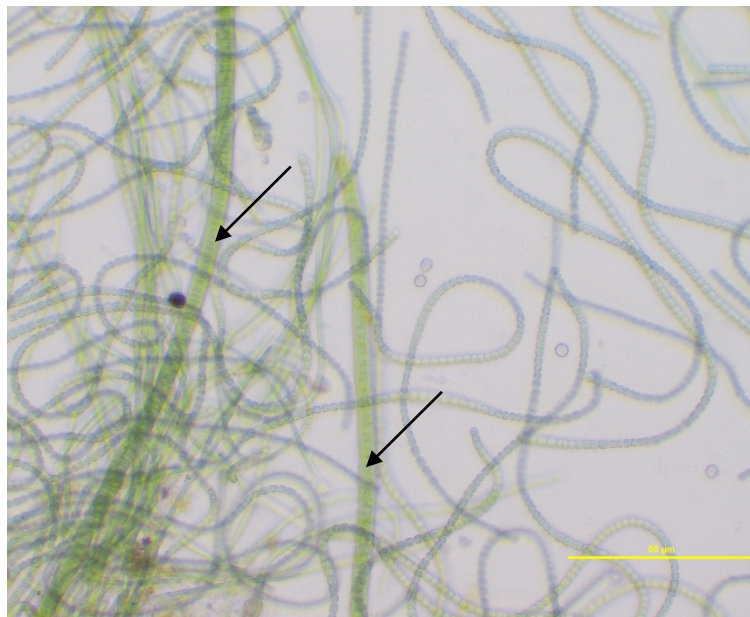


Figura 9: *Oscillatoria* sp. (Fuente propia)

- *Tolypothrix* sp. (figura 10): cianofito filamentoso de aproximadamente 11  $\mu\text{m}$  de diámetro dentro de una vaina densa que se vuelve marrón oscuro con la edad. Presenta ramificaciones falsas con un heterociste por rama.

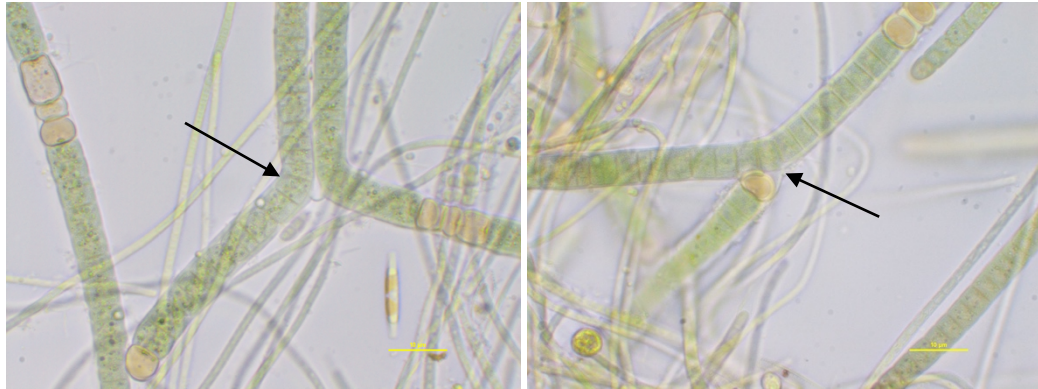


Figura 10: *Tolypothrix* sp. (fuente propia)

- *Rivularia* sp. (figura 11): organismos filamentosos de 5-8  $\mu\text{m}$  de ancho. Tienen un heterociste basal y no tienen acinetos.

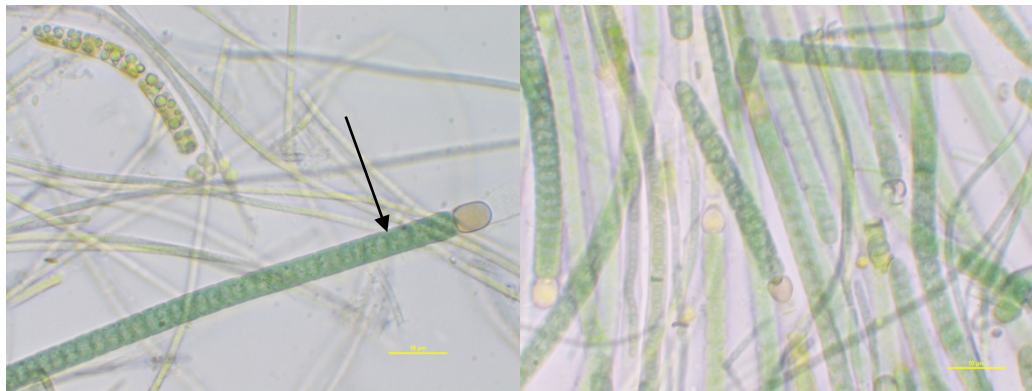


Figura 11: *Rivularia* sp. (fuente propia)

- *Chroococcus* sp. (figura 12): cianobacterias unicelulares de forma esférica. Pueden llegar a tener un diámetro de hasta 12  $\mu\text{m}$ .

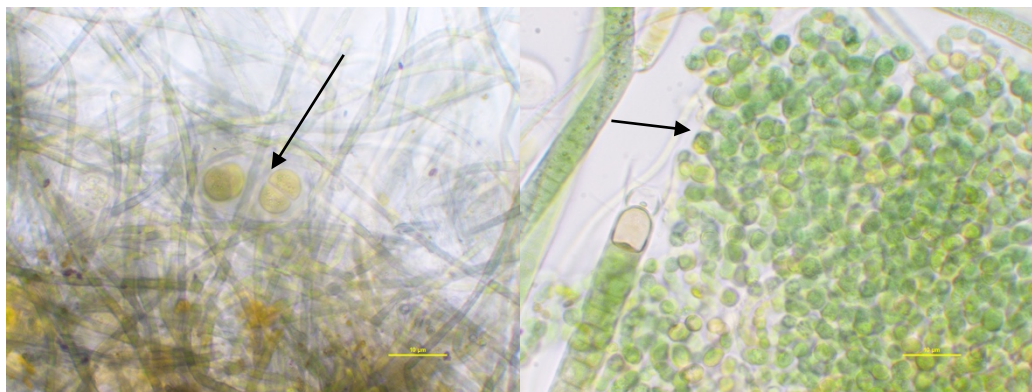
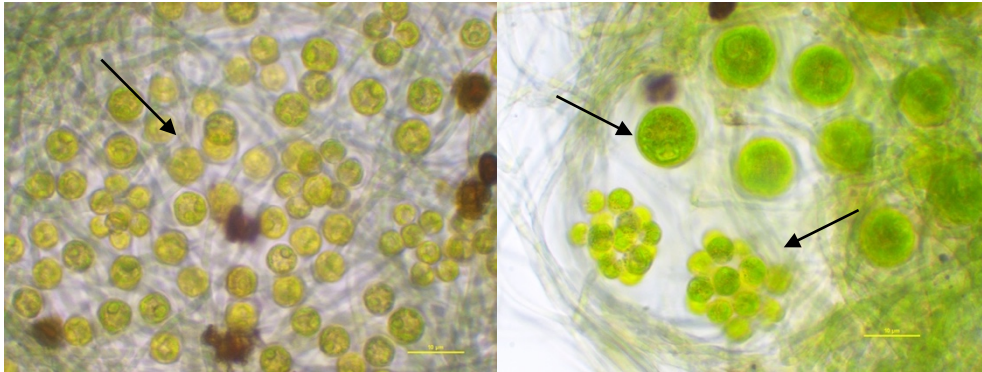


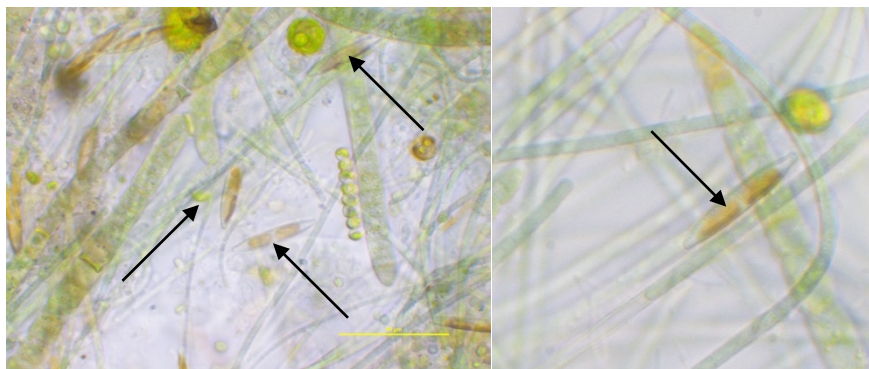
Figura 12: *Chroococcus* sp. (fuente propia)



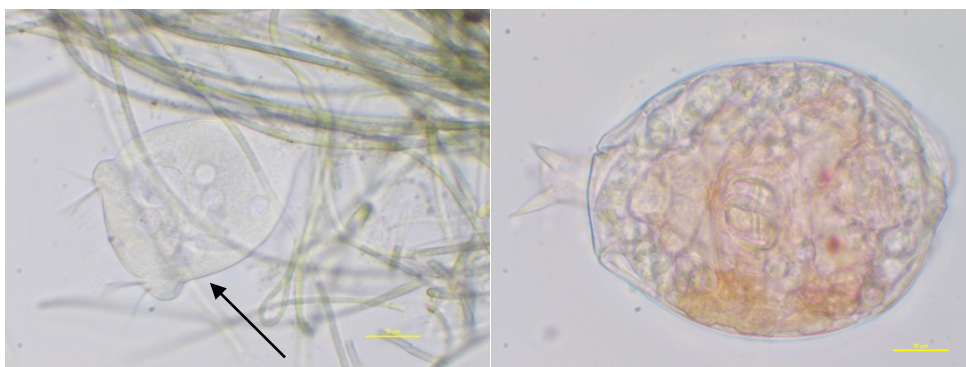
Pese a que es fácil conseguir el cultivo con éxito, se tiene que tener en cuenta que las cianobacterias crecidas en aguas residuales pueden ser susceptibles a la contaminación por distintos tipos de algas como las algas verdes (figura 13) o las diatomeas (figura 14), y por otros microorganismos como los protozoos (figura 15).



*Figura 13: Algas verdes de diferentes individuales y formando agregaciones (Fuente propia)*



*Figura 14: Diatomeas (Fuente propia)*



*Figura 15: Diferentes tipos de protozoos: a) vorticela, b) rotífero (Fuente propia)*

Es importante conocer las dinámicas de las cianobacterias para poder controlar los sistemas y las especies deseadas en cada cultivo.

## 5. Aplicaciones y usos de las cianobacterias

El uso tradicional de las cianobacterias ha sido a nivel agrícola como abono verde para los suelos. La aplicación de las cianobacterias permite al suelo, que de forma natural tiene limitación de nitrógeno, aumentar este nitrógeno que, aunque es un elemento abundante en la corteza terrestre, es muy poco biodisponible, y la mayoría del nitrógeno combinado que circula en los ciclos de la materia, procede de fijación biológica (Peleato, 2011).

En la actualidad, aunque se siguen estudiando sus capacidades para la agricultura, nuevas líneas de investigación se han abierto dentro del campo de la biotecnología.

Las cianobacterias tienen propiedades beneficiosas y perjudiciales cuando se las juzga desde una perspectiva humana. Por un lado, su extenso crecimiento puede crear molestias considerables para el manejo de las aguas continentales y también pueden liberar sustancias en el agua que pueden ser desagradables o tóxicas y que, a la vez, pueden provocar un gran impacto en la salud y la economía.

Por otro lado, mediante su estudio e investigación se han encontrado usos positivos. Las cianobacterias son fuente de muchos productos valiosos y tienen procesos fisiológicos prometedores. Las posibles aplicaciones de las cianobacterias para el desarrollo económico y su explotación es uno de los muchos desafíos para la biotecnología.

Las cianobacterias no solo cumplen funciones clave en los ciclos globales de varios elementos, sino que se vuelven cada vez más importantes desde el punto de vista económico.

### 5.1. Metabolitos de interés farmacológico

Las cianobacterias producen gran cantidad de metabolitos con interés terapéutico, que incluyen antivirales, antitumorales, inhibidores de enzimas y protectores de luz ultravioleta entre otros efectos. Se considera que la mayoría de los metabolitos secundarios de las cianobacterias están por describir, y que constituyen uno de los grupos de bacterias más prometedores en la búsqueda de nuevos productos bioactivos. Además de los productos naturales, las cianobacterias pueden ser utilizadas para la producción de metabolitos de interés, mediante recombinación génica, insertando los genes implicados en su síntesis.

Algunos de los metabolitos más estudiados son los péptidos, moléculas que han mostrado un gran potencial farmacológico ya que son muy interesantes como antipalúdicos y antitumorales; y los alcaloides, que también tienen un alto potencial antitumoral así como efectos sobre la proliferación de otras células del fitoplancton (como las toxinas). Otros alcaloides muestran actividad algucida, fungicida e insecticida, lo que les permite ser utilizados en plagas agrícolas (Peleato, 2011).

## 5.2. Suplementos alimenticios

Tradicionalmente, algunas culturas han incluido ciertas especies en su dieta, especialmente en China y América del Sur, donde se sirve la sopa Nostoc, pero no fue hasta los años 70 que las cianobacterias se comercializaron como complemento alimenticio. La más conocida es la Spirulina, cuya masa celular contiene una alta proporción de proteínas así como vitaminas, ácidos grasos esenciales y otros elementos. Actualmente existen distintas plantas de producción de Spirulina en todo el mundo.

Además del uso alimentario humano, se pueden usar como alimento o forraje ya que algunas cepas tienen un contenido muy alto de proteínas y vitaminas (Peleato, 2011).

## 5.3. Biorremediación

La biorremediación se define como un proceso de degradación o alteración de moléculas orgánicas transformándose en moléculas más pequeñas y no tóxicas de modo que un medio ambiente alterado por contaminantes retorna a su condición natural. Los seres encargados de esta transformación son microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos.

Diferentes estudios han demostrado que las cianobacterias tienen una elevada capacidad biorremediadora. Ellas solas o en sinergia con otros organismos tienen la capacidad de degradar un alto número de compuestos orgánicos xenobióticos que pueden alterar el medio y, por lo tanto, restaurar los suelos degradados (Peleato, 2011).

## 5.4. Depuración de aguas residuales

Algunas cianobacterias han mostrado alta eficacia en la depuración de aguas residuales o eutrofizadas. Son una interesante alternativa a los tratamientos de aguas residuales tradicionales (Hall *et al.*, 1995).

También son capaces de degradar desechos de la industria farmacéutica como residuos de antibióticos que están prohibidos ser liberados al medio (Peleato, 2011).

En los últimos años, el uso de cianobacterias en el tratamiento de aguas residuales ha atraído gran interés debido a su papel central en la fijación de dióxido de carbono. La biodegradación de contaminantes orgánicos por bacterias es muy significativa, algunos estudios han indicado que además de proporcionar oxígeno para biodegradadores aerobacterianos, las cianobacterias también pueden degradar contaminantes orgánicos directamente (Talukder *et al.*, 2015).

## 5.5. Biocombustibles

El uso de la biomasa procedente de las cianobacterias como alternativa a la obtención de energía sostenible está despertando un gran interés. Al mostrar las cianobacterias unos requerimientos nutricionales simples, ser transformables genéticamente y tener una alta tasa de duplicación, presentan características aptas para ser transformadas en combustibles.

Además, al no implicar deforestación como en el caso de otros biocombustibles, su uso es una buena alternativa a los combustibles de origen vegetal ya que son capaces de crecer en terrenos no cultivables y tienen requisitos de cultivo bajos. Tampoco se produce el problema del desvío de algunos alimentos destinados al consumo humano o animal (soja, remolacha, caña de azúcar, maíz...) cuando son utilizados como combustible y no como alimento.

Durante los últimos años se ha desarrollado abundante tecnología para la producción de biomasa de cianobacterias a gran escala y se ha optimizado el uso de determinados tipos de cianobacterias (Peleato, 2011).

Además del uso de su biomasa, se pueden usar los carbohidratos que producen las cianobacterias para producir biocombustibles si se hace una fermentación anaeróbica, o para producir biogás si se somete a una digestión anaeróbica.

Otra alternativa en cuanto a biocombustibles es la generación de hidrógeno ( $H_2$ ) a nivel productivo por cianobacterias fijadoras de nitrógeno o con cianobacterias con distintos tipos de hidrogenasa. La obtención de  $H_2$  a partir de cianobacterias es casi 7 veces más barato que obtener  $H_2$  a partir del agua (Abed et al. 2009).

#### **5.5.1. Proceso de obtención de biocombustibles a partir de carbohidratos**

Para obtener el biocombustible el primer paso a realizar es el de centrifugar la masa del cultivo para separar las cianobacterias y los microorganismos de la suspensión líquida. A continuación, se somete la biomasa separada a diversos métodos mecánicos, químicos o enzimáticos con el fin de mejorar la disponibilidad de carbohidratos y descomponer las moléculas de carbohidratos en azúcares.

Después de preparar la biomasa, se le suministra levadura para el proceso de fermentación. La levadura puede convertir los azúcares en etanol que produce  $CO_2$ . Este  $CO_2$  podría reciclarse como fuente de carbono para el cultivo de cianobacterias y microalgas. En la reacción de fermentación la glucosa se convierte en piruvato generando 2 ATP y luego este piruvato se convierte en acetaldehído liberando dos moléculas de  $CO_2$ . Finalmente, el acetaldehído se convierte en etanol.

Después de la fermentación, el bioetanol se purifica para poder finalmente usarse como combustible y la biomasa restante se puede utilizar como alimento en un digestor anaeróbico para producir biometano (Rueda, 2017).

### **5.6. Bioplásticos**

Los bioplásticos son un tipo de plásticos que no se obtienen a partir de derivados del petróleo, sino que se obtienen mediante productos vegetales. Se presentan como una alternativa a los plásticos tradicionales ya que para su producción no se necesita el uso de combustibles fósiles (una fuente no renovable), son biodegradables y su producción emite menos dióxido de carbono a la atmósfera.

Las cianobacterias se pueden considerar como una fuente de producción de PHB (polihidroxitirato), un tipo de bioplástico, debido a sus requisitos mínimos de nutrientes y a su naturaleza fotoautotrófica. La utilización industrial de cianobacterias como productores de PHB tiene la ventaja de convertir los residuos de dióxido de carbono, un gas de efecto invernadero, en plásticos amigables con el medio ambiente utilizando la energía procedente de la luz solar. Varias especies de cianobacterias acumulan cantidades considerables de PHB (Balaji *et al.*, 2013).

El PHB es un material altamente cristalino y rígido pero quebradizo. Cuando se hila en fibras, se comporta como un material elástico duro. Las características del material de estos biopolímeros son similares a los plásticos convencionales como el polipropileno. En la tabla 1 se comparan las propiedades del PHB con las del polipropileno (PP).

Tabla 1: Propiedades físicas de PHB y PP. Adaptado de Balaji *et al.* (2013)

Propiedades	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Temperatura de transición de vidrio a líquido (°C)	2	-10
Cristalinidad (%)	60	50-70
Resistencia a la tracción (MPa)	43	38
Extensión para romper (%)	5	400

Estudios recientes han demostrado que las concentraciones intracelulares de PHB o glucógeno en cianobacterias podrían mejorarse modificando factores ambientales y de cultivo tales como temperatura, pH, disponibilidad de carbono inorgánico, concentración de nutrientes (N y P) y disponibilidad de luz (fotoperíodo e intensidad). Entre estas condiciones, la limitación de nutrientes es el enfoque más utilizado. De hecho, se ha demostrado que la falta de N y P en los medios de alimentación conduce a un aumento tanto de PHB (hasta 20% en términos de peso de células secas) como de contenido de glucógeno (hasta 60% en términos de peso de células secas) (Arias *et al.*, 2018).

Aunque actualmente el coste de fabricación de bioplásticos es mayor que el del plástico convencional, sus favorables características hacia el medio ambiente y la sostenibilidad hacen que su producción esté en continua investigación y desarrollo.

### 5.6.1. Proceso de formación de bioplásticos

El polihidroxiбутирато (PHB) se sintetiza a partir de acetil coenzima A (acetilcoA), una biomolécula que proviene de la oxidación del piruvato, a través de tres reacciones enzimáticas. La 3-ketolasa convierte dos moléculas de acetil-CoA en una molécula de acetoacetil-CoA, la acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH convierte acetoacetilcoA en D-3-hidroxi-butirato y la última enzima PHB sintasa cataliza la unión del resto D-3-hidroxi-butirilo a una molécula de PHB existente a través de un enlace éster (Balaji *et al.*, 2013). En la figura 16 se observa el esquema de producción de PBHs.

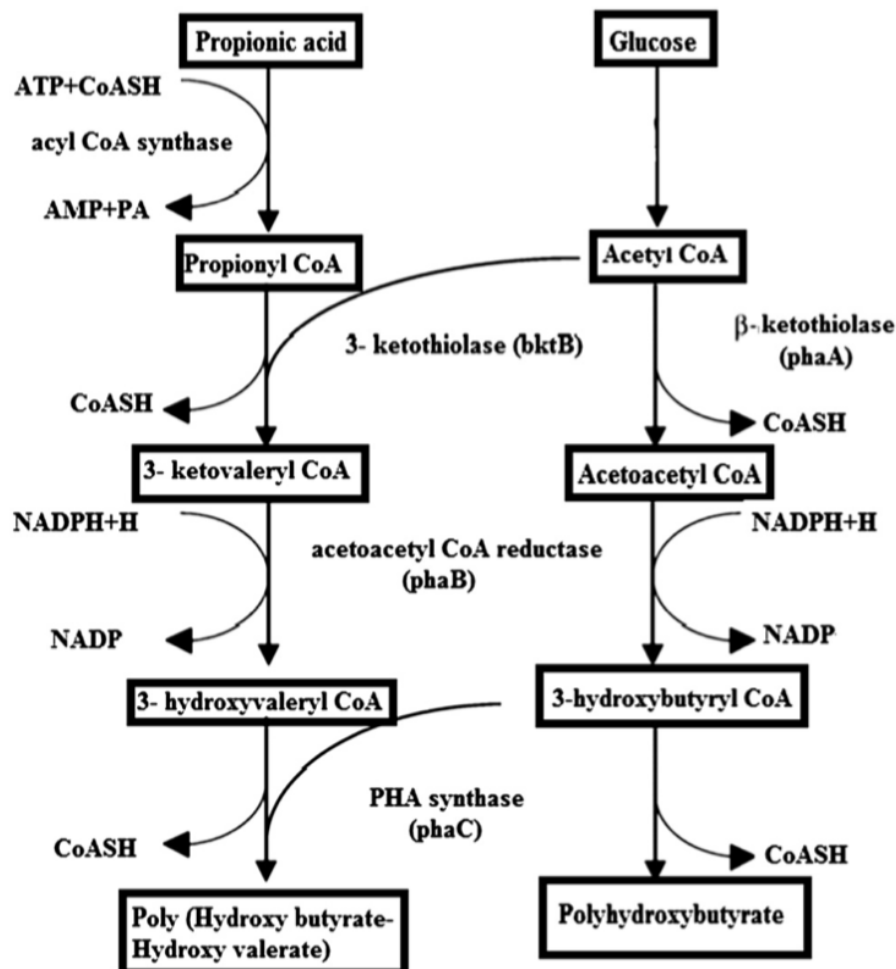


Figura 16: Vía de producción de PHB (Balaji *et al.*, 2013)

## 6. Materiales y métodos

Los materiales usados y los métodos seguidos para alcanzar los objetivos del trabajo se describen en los siguientes apartados.

### 6.1. Materiales

#### 6.1.1. Fotobiorreactor de 30L

El fotobiorreactor de 30L es un reactor cilíndrico vertical (figura 17). Este reactor se ha usado para mantener las reservas de inóculo y ha sido alimentado manualmente con medio de cultivo.

Este reactor está controlado automáticamente por un software de computadora. Mediante el software se puede controlar el pH. Cuando el sistema detecta que el pH es superior al predeterminado, automáticamente se inyecta de CO<sub>2</sub> al reactor. Este CO<sub>2</sub>, aparte de regular el pH, puede ser utilizado por las cianobacterias como fuente de carbono inorgánico.

El sistema también tiene un sistema de iluminación formado por una lámpara rodeada por una pantalla para enfocar toda la luz producida hacia el reactor y evitar así pérdidas de luz. Gracias a un control por temporizador se consiguen ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

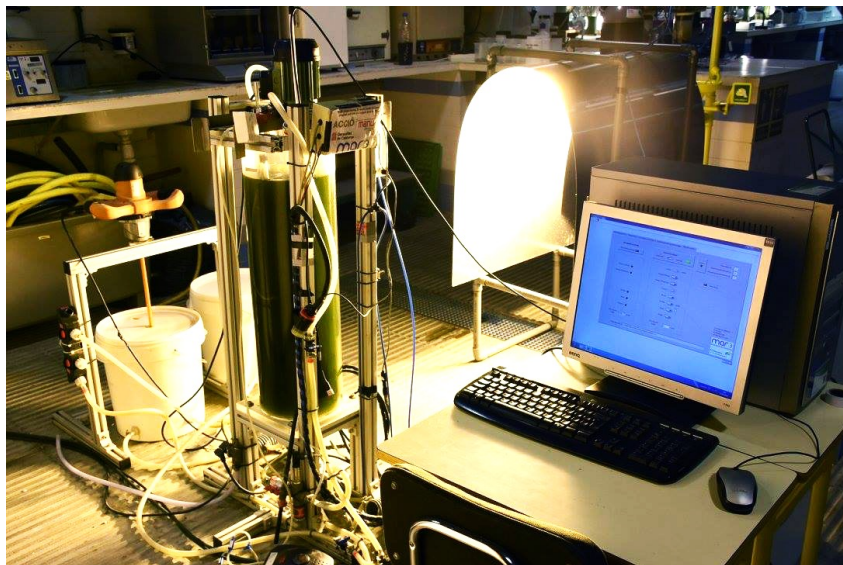


Figura 17: Fotobiorreactor de 30L con sistema de iluminación conectado al software



### 6.1.2. Fotobiorreactores de 3L

Para realizar los experimentos objetos del trabajo se han usado unos fotobiorreactores cilíndricos verticales de polimetacrilato con un diámetro interno de 11 cm y un volumen total de 3 L (figura 18).

Los fotobiorreactores tienen un sistema de control de pH que consiste en un pHmetro conectado a un controlador electrónico que activa unas bombas que inyectan ácido clorhídrico al reactor cuando este se encuentra a un pH superior a 7,5.

También disponen de una camisa de agua conectada a un sensor de temperatura que permite evitar un aumento de la temperatura por encima del rango deseado a causa del calentamiento generado por las lámparas encargadas de proporcionar luz al sistema. Estas lámparas están conectadas a un temporizador que permite conseguir ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Para mantener la biomasa flotante en constante movimiento y permitir que la luz llegue a todas las células por igual, los reactores disponen de dos mecanismos: un sistema de agitación magnética (reactor izquierdo en la imagen) o el burbujeo de aire constante (reactor derecho en la imagen).



Figura 18: Fotobiorreactores de 3L con camisa de agua y con los pHmetros sumergidos y conectados a las bombas de ácido

### 6.1.3. Equipamiento

Para poder realizar todas las analíticas necesarias para determinar los resultados del estudio, se han utilizado distintos equipamientos de laboratorio que se listan en el anexo. El material de vidrio no se ha especificado ya que es el habitual en un laboratorio químico.

### 6.1.4. Reactivos

Para poder realizar ciertas analíticas en el laboratorio ha sido necesario usar los reactivos que se detallan en el anexo.

### 6.1.5. Medio de cultivo sintético

En los experimentos a ha sido necesario utilizar un medio de cultivo sintético llamado sintético BG11 (Blue-Green Medium) para cultivar la biomasa. Este medio está formado por diferentes componentes en diferentes cantidades (tabla 2). Según el experimento realizado, los componentes de este medio de cultivo han sido modificados.

*Tabla 2: Componentes del medio de cultivo BG-11 y sus variantes*

Componente	Cantidad de medio normal	Cantidad de medio sin N	Cantidad de medio sin P
NaNO <sub>3</sub>	75,0 g/500 mL	-	75,0 g/500 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g/500 mL	2,0 g/500 mL	Se sustituye por KCl
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,75 g/500 mL	3,75 g/500 mL	3,75 g/500 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,80 g/500 mL	1,80 g/500 mL	1,80 g/500 mL
Ácido cítrico	0,30 g/500 mL	0,30 g/500 mL	0,30 g/500 mL
Citrato férrico de amonio verde	0,30 g/500 mL	0,30 g/500 mL	0,30 g/500 mL
EDTANa <sub>2</sub>	0,05 g/500 mL	0,05 g/500 mL	0,05 g/500 mL

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,00 g/500 mL	1,00 g/500 mL	1,00 g/500 mL
Solución de metales traza	1,00 mL/L	1,00 mL/L	1,00 mL/L

### 6.1.6. Agua residual

Para poder alimentar los fotobiorreactores cuando ha sido necesario según el experimento llevado a cabo, se ha usado agua residual procedente de un depósito de decantación secundario situado en la terraza del edificio D1 del Campus Nord de la UPC. Esta agua proviene de un sistema de recogida de aguas residuales del alcantarillado de las calles de alrededor de la universidad.

Las características del agua residual utilizada como influente se muestran en la tabla 3. Debido a que los experimentos han durado varios meses, las características del agua han variado. Por ello, se muestran los distintos parámetros por cada experimento en que se ha usado el agua residual.

Tabla 3: Características del agua residual usada en cada experimento

Parámetro	Alimentación para R1-R2	Alimentación para R3-R4
pH	7,2	7,4
SST (g/L)	0,31	0,17
SSV (g/L)	0,29	0,15
TOC (mg/L)	179,28	121,54
TOC soluble (mg/L)	31,49	51,17
TIC (mg/L)	71,46	85,09
TN (mg/L)	68,46	66,06
TP (mg/L)	7,48	5,22

## 6.2. Métodos analíticos

Para controlar los cambios en el cultivo mixto de cianobacterias y comprender qué está sucediendo dentro de los reactores, se han controlado diferentes parámetros. A continuación se explican cuáles son los parámetros estudiados y la metodología seguida para analizarlos. La mayoría de estas metodologías se toman de métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales (APHA, 2012). Todas las analíticas se han realizado en el laboratorio del grupo de investigación GEMMA de la Universitat Politècnica de Catalunya.

### 6.2.1. Sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles

Los sólidos suspendidos totales (SST) indican la cantidad de sólidos que quedan retenidos al ser filtrados con un filtro de 2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y que posteriormente son secados a 150°C. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) son aquellos que quedan una vez los sólidos suspendidos totales son calentados a 550°C durante un período de tiempo determinado.

La cuantificación de los SST y SSV se detalla en el anexo.

### 6.2.2. Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto es una medida de la cantidad de oxígeno que hay presente dentro del reactor. Su medición se realizó periódicamente y se detalla en el anexo.

### 6.2.3. Carbono total, orgánico e inorgánico

La metodología seguida para medir el carbono total (TC), orgánico (TOC) e inorgánico (TIC) en una muestra se explica en el anexo.

### 6.2.4. Nitrógeno total

Los valores de nitrógeno total son proporcionados por el analizador C/N, equipo usado para la determinación de TC, TOC y TIC.

#### **6.2.5. Fósforo total**

La concentración de fósforo total mide la cantidad de fósforo disponible en forma orgánica e inorgánica, disuelta y particulada en los sistemas acuáticos. Su determinación se explica en el anexo.

#### **6.2.6. pH**

La determinación del pH se realizó automáticamente mediante un pHmetro sumergido a cada reactor y conectado a un controlador eléctrico que muestra el valor de pH en la pantalla del dispositivo.

#### **6.2.7. Caracterización microbiana**

Para poder realizar la caracterización microbiana se ha hecho un análisis cuantitativo mediante el conteo de células con un microscopio y uno de cualitativo en el que se han observado los cambios de estado de la población microbiana.

El análisis cuantitativo de microalgas y cianobacterias se ha realizado mediante el conteo de células de área microscópica (células/mL). Para realizar este análisis se pusieron 20  $\mu$ L del contenido del reactor a un portaobjetos, se tapó con un cubreobjetos y se contaron por campo tanto las células individuales de cianobacterias como las que formaban flóculos. El conteo se paró cuando se alcanzaron aproximadamente 400 células individuales. Durante el conteo, además se hizo una estimación de las cantidades de especies filamentosas. Las especies de cianobacterias se determinaron usando microscopía de fluorescencia con filtros de excitación (510-560 nm), filtro de emisión (590 nm) y divisor de haz dicróico (575 nm) a 40X.

A parte de las especies de cianobacterias también se hizo el recuento de algas verdes, diatomeas y protozoos presentes en 80 campos del portaobjetos. A diferencia de las cianobacterias, las algas verdes, diatomeas y protozoos se cuantificaron con un microscopio de campo claro a 40X.

El análisis cuantitativo, tanto en el campo brillante como en la microscopía de fluorescencia, se ha realizado usando un microscopio de fluorescencia (Eclipse E200, Nikon, Japón) (figura 19).

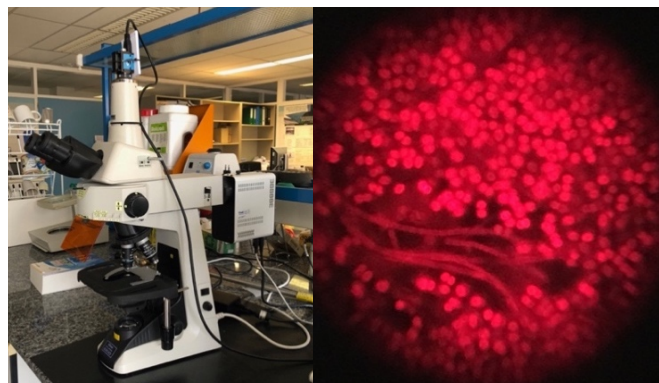


Figura 19: a) Microscopio Elipse y b) imagen del cultivo con fluorescencia

También se ha realizado un análisis cualitativo de los cambios en las dinámicas y en la composición de microalgas dentro de cada reactor. Ésta se ha controlado mediante microscopía distintas veces por semana. La visualización microbiana se ha realizado en un microscopio óptico (Motic, China) equipado con una cámara (Fi2, Nikon, Japón) conectada a un ordenador (software NIS-Element viewer) (figura 20). Las especies de cianobacterias y microalgas se han identificado *in vivo* utilizando libros taxonómicos convencionales (Streble y Krauter, 1987), así como una base de datos del género de las cianobacterias (Komárek y Hauer, 2013).



Figura 20: a) Microscopio Motic y b) imagen del cultivo en campo brillante

#### 6.2.8. Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB, los polímeros que pueden formar bioplásticos, se detalla en el anexo.

#### 6.2.9. Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se detalla en el anexo.

### 6.3. Métodos experimentales

Para alcanzar los objetivos del presente trabajo se han realizado un total de 5 experimentos que se han llevado a cabo en dos bloques.

En una primera parte, se han realizado dos experimentos de dos fotobiorreactores cada uno (R1 y R2; R3 y R4) para conseguir el objetivo particular del primer bloque de experimentos descrito al inicio del trabajo. Estos se operaron en modo semicontinuo y fueron alimentados con agua residual.

Para alcanzar los objetivos del segundo bloque se han realizado tres experimentos de también dos fotobiorreactores cada uno (P1 y P2; P3 y P4; P5 y P6). El inóculo de microorganismos usado en los reactores de este bloque, procede de la biomasa de los reactores R1, R3 y R4 del bloque 1. La biomasa del R2 no se usó debido a sus características poco adecuadas para ser usadas. Estos nuevos reactores han estado sometidos a limitación de nitrógeno o de fósforo. A diferencia de los reactores R (primer bloque), los P (segundo bloque) se han operado en modo batch y no se ha utilizado agua residual como alimento.

En la siguiente figura (figura 21) se muestra un esquema de los experimentos realizados.

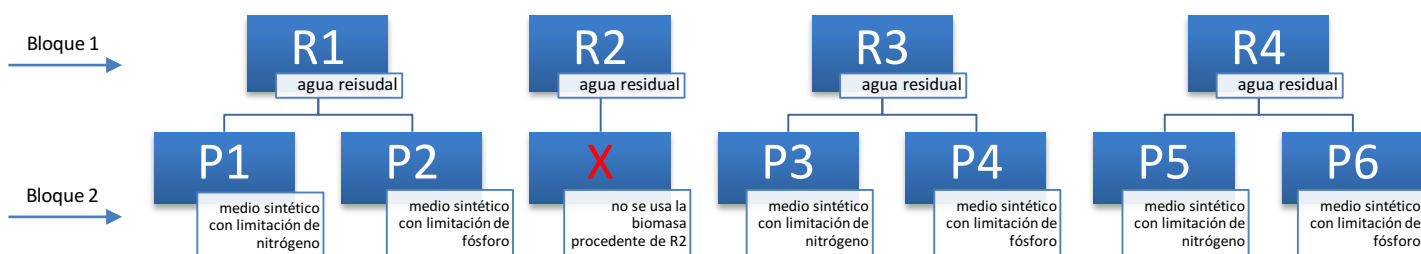


Figura 21: Esquema de los experimentos realizados. R1, R2, R3 y R4 forman parte del primer bloque y P1, P2, P3, P4, P5 y P6 forman parte del segundo bloque

En los siguientes apartados se explica primero el procedimiento seguido para obtener las cianobacterias que han sido usadas en los distintos reactores y seguidamente se explican todas las características y metodología seguida para la realización de los experimentos de cada bloque.

### 6.3.1. Obtención y mantenimiento de cianobacterias del suelo

Las cianobacterias obtenidas de la corteza del suelo seco se usaron como inóculo. La biomasa seca se hidrató y se agitó primero en un Erlenmeyer con medio de crecimiento BG-11 durante dos días hasta que las células se suspendieron. El cultivo consistió en un cultivo mixto de cianobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp., *Tolypothrix* sp. y *Pseudanabaena* sp. (figura 22), especies que se encuentran principalmente en ambientes terrestres. La biomasa suspendida se introdujo posteriormente en un fotobiorreactor cerrado agitado de 30 L (PBR) que se mantuvo como stock. El PBR se mantuvo con medio de crecimiento BG-11 sin nitrógeno, con el fin de mantener un cultivo dominado pero especies fijadoras de nitrógeno a lo largo del ciclo. El pH se mantuvo a 7,5 con un controlador (HI 8711, HANNA, EE. UU.) mediante la adición automática de HCl 0,1 N y NaOH 0,1 N.

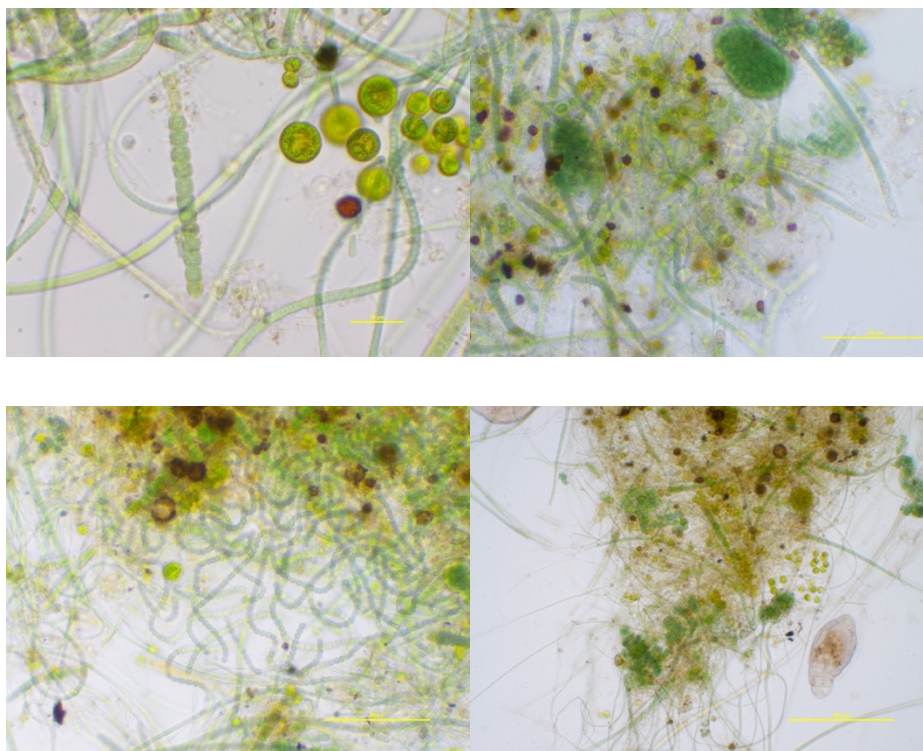


Figura 22: Imágenes que demuestran la diversidad microbiana en el fotobiorreactor de 30L durante los meses de experimentación; a) vista general del cultivo observada en 1000X; b) y c) vista general del cultivo observada en 500X; d) vista general del cultivo observada en 100X. Todas las observaciones se realizaron en microscopía de campo brillante



### **6.3.2. Bloque 1**

El primer bloque de experimentos estuvo formado por dos experimentos. Ambos fueron alimentados con agua residual y tuvieron el mismo inóculo de microorganismos procedente del reactor de 30L. La diferencia estaba en el medio sintético usado, en el tiempo de retención hidráulica con el que son operados y, en consecuencia, en las características de alimentación.

En los experimentos del bloque 1 el oxígeno, los SSV, el TOC, el TN, el TP y la microscopía se analizaron tres veces por semana. La cuantificación de carbohidratos y PHB se hizo dos veces por semana.

#### **6.3.2.1. Experimento R1 y R2**

Para la realización de este estudio se utilizaron dos fotobiorreactores con una capacidad de 3L aunque el volumen de trabajo fue de 2,5L. Cada uno estuvo operado en modo semicontinuo y con un TRH de 10 días. Los reactores estuvieron sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

El inóculo inicial consistió en una comunidad de cianobacterias obtenida del PBR a partir del experimento previo descrito anteriormente. Para la preparación del experimento se llenaron cada uno de los reactores con 200 mL de biomasa procedente de dicho reactor y con 2.300 mL de medio sin nitrógeno. A partir del segundo día, una vez al día se quitaban 250 mL de cultivo y seguidamente se le añadían 250 mL de agua residual, cuyas características han sido descritas en apartados anteriores. También hubo extracción periódica de muestra para realizar las analíticas establecidas.

El medio de cultivo estuvo agitado continuamente con un agitador magnético a 250 rpm.

La única diferencia entre ambos reactores que fue que cada vez que se alimentaba el R2, el agua residual se diluía a la mitad con agua destilada de modo que se disminuía la carga de entrada.

#### **6.3.2.2. Experimento R3 y R4**

Para la realización de este estudio se utilizaron dos fotobiorreactores con una capacidad de 3L aunque el volumen de trabajo fue de 2L. Cada uno estuvo operado en modo semicontinuo. Los reactores estuvieron sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

La diferencia en la operación entre ambos fue el tiempo de retención hidráulico (TRH) que fue de 8 días para el R3 y de 6 días para el R4.

Para la preparación de los experimentos el reactor R3 se llenó con 250 mL de inóculo procedentes del PBR, con 250 mL de agua residual y con 1.500 mL de medio de cultivo sin ningún tipo de limitación. El reactor R4 se llenó con 250 mL de inóculo procedentes del PBR, con 333 mL de agua residual y con 1.417 mL de medio de cultivo sin ningún tipo de limitación.

A partir del segundo día se empezaron a quitar 250 mL de cultivo y luego a alimentar con 250 mL de agua residual el R3, y a quitar 333 mL de cultivo y luego a alimentar con 333 mL de agua residual el R4. Esta cantidad de alimento era distinta debido al diferente TRH empleado para cada reactor. Esta extracción periódica de muestra se hizo para poder realizar las analíticas establecidas.

Ambos reactores se agitaron continuamente con un agitador magnético a 250 rpm.

### **6.3.3. Bloque 2**

El segundo bloque de experimentos, en el que se forzó a las cianobacterias a producir carbohidratos y PHB con la adición de carbono y la limitación de nutrientes, estuvo formado por tres experimentos. En ellos se usó un medio sintético para alimentar el cultivo y se diferenciaron en la procedencia de la biomasa y la limitación de nutrientes en cada caso.

En los experimentos del bloque 2 el oxígeno, la microscopía y el análisis de carbohidratos y PHB se realizó tres veces por semana. La cantidad de TIC se determinó cada día y los SSV se analizaron una vez por semana.

#### **6.3.3.1. Experimento P1 y P2**

Para la realización de este estudio se utilizaron dos fotobiorreactores con una capacidad de 3 L (figura 23) cada uno operados en modo batch. Los reactores fueron operados con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El volumen de trabajo de los reactores se mantuvo a unos 2 L.

La biomasa usada para estos experimentos era procedente del reactor R1, biomasa ya consolidada con las especies deseadas. Para obtenerla se sedimentó la parte sólida del reactor R1 con un cono de decantación.

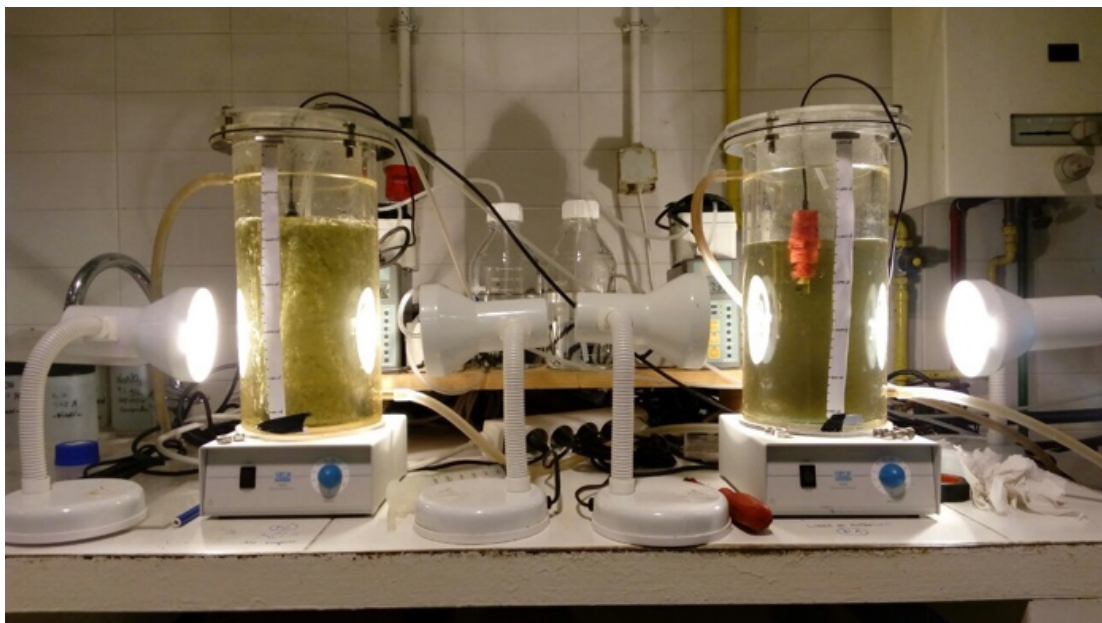
Los reactores para este experimento se llenaron con 200 mL de la biomasa procedente del R1 a cada uno y 1.500 mL de medio sintético BG-11 con limitación de nitrógeno al reactor P1 y 1.500 mL de medio BG-11 con limitación de fósforo al reactor P2.

Las variaciones en el medio de cultivo se realizaron para conseguir las limitaciones de fósforo o nitrógeno.

El reactor P1, que se encontraba con limitación de nitrógeno, se agitó continuamente mediante un imán con una placa agitadora. El P2 con limitación de fósforo tenía un sistema de burbujeo con unos difusores de aire que permitían proveer al cultivo nitrógeno atmosférico y, a la vez, la continua agitación del medio.

Los reactores, al ser operados en modo batch, no se alimentaron en ninguna ocasión. Sólo se les sacaba una cantidad determinada de muestra para poder realizar las analíticas para su seguimiento.

Ambas configuraciones experimentales fueron enriquecidas con  $\text{NaHCO}_3$  (con una concentración de 70,42 g/L) manualmente. Fue la única fuente de carbono inorgánico soluble y se añadió con el fin de proporcionar suficiente carbono al cultivo para ser transformado en PHB o carbohidratos. La disponibilidad de  $\text{NaHCO}_3$  se controló mediante análisis diarios de TIC.



*Figura 23: Imagen de los reactores P1 y P2 en operación*

### **6.3.3.2. Experimento P3 y P4**

Para realizar estos experimentos se hizo el mismo proceso que para P1 y P2 pero se cambió el origen de la biomasa. En esta ocasión la biomasa se extrajo por decantación del reactor R3.

### **6.3.3.3. Experimento P4 y P6**

Para realizar estos experimentos se hizo el mismo proceso que para P1 y P2 pero se cambió el origen de la biomasa. En esta ocasión la biomasa se extrajo por decantación del reactor R4.

## 7. Resultados

### 7.1. Bloque 1

A continuación se muestran los resultados obtenidos por las diferentes analíticas realizadas durante los experimentos R1, R2, R3 y R4.

#### 7.1.1. Experimento R1 y R2

##### 7.1.1.1. Análisis de los parámetros pH, oxígeno disuelto, TOC, TN y TP

Todos los cultivos permanecieron en condiciones oxigenas a lo largo de los experimentos (figura 24a), por lo que se encontraron valores promedios de oxígeno disuelto de  $6,87 \pm 0,87$  mg OD/L para R1 y de  $7,01 \pm 0,79$  mg OD/L para R2. Los reactores pasaron de tener una concentración de oxígeno disuelto de 6,85 mg OD/L y 6,95 mg OD/L para R1 y R2 respectivamente a ser de 8,18 mg OD/L y 8,21 mg OD/L en el día 15. A partir de ese momento la cantidad de oxígeno disminuyó ligeramente hasta valores de 7,21 mg OD/L en R1 y 7,56 mg OD/L en R2.

En el caso del pH (figura 24b), al estar regulado mediante el pHmetro y las bombas de ácido, su valor se mantuvo a  $7,59 \pm 0,09$  para R1 y a  $7,82 \pm 0,11$  para R2. Las pequeñas variaciones se debieron a la adición de la alimentación, pero se mantuvieron dentro del rango gracias a la bomba de ácido.

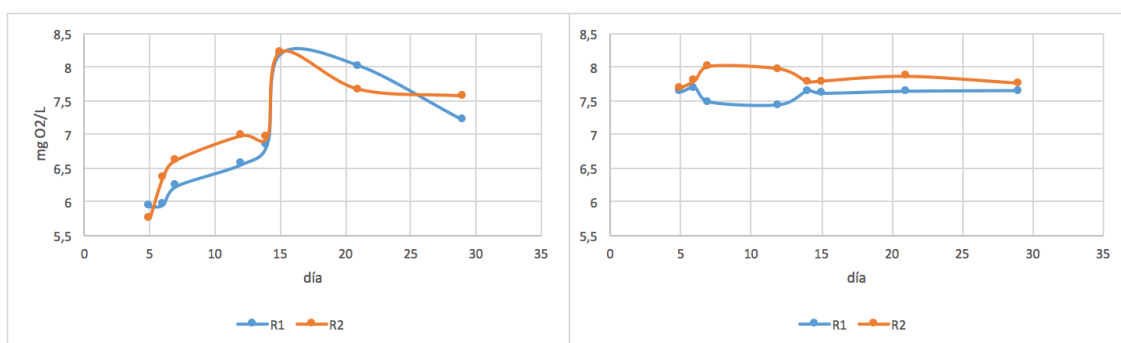


Figura 24: a) Evolución de OD en R1 y R2 y b) Evolución de pH en R1 y R2

Las concentraciones de carbono orgánico total, TOC, (figura 25a) se mantuvieron estables y similares a las del influente (alimentación) hasta el día 22 de operación en R1 y hasta el día 16 en R2. La cantidad promedio de TOC procedente del efluente fue de 167,46 mg/L. Durante los

primeros 22 días las concentraciones de TOC pasaron de 140,8 mg/L a 202,2 mg/L en R1 y a partir de ese momento, la concentración se disparó hasta alcanzar los 501,7 mg/L. En el caso de R2, durante los primeros 16 días las concentraciones de TOC pasaron de 147,3 mg/L a 212,6 mg/L y a partir de ese día, la concentración se disparó hasta alcanzar los 413,4 mg/L.

Las concentraciones de nitrógeno total, TN, (figura 25b) se mantuvieron siempre por debajo del valor de TN del efluente, que era de 64,08 mg/L. Durante los días que duró el cultivo, la concentración en R1 pasó de 17,3 mg/L a 48,94 mg/L y en R2 subió de 18,79 mg/L a 36,86 mg/L. Se observa un comportamiento similar en la evolución de TN en ambos reactores.

Para el caso del fósforo total, TP, (figura 25c) se observó un comportamiento oscilatorio en las concentraciones en ambos reactores aunque la tendencia final fue a la alza. La concentración de TP en R1 pasó de 10,48 mg/L a 11,48 mg/L y la de R2 aumentó de 4,59 mg/L a 7,88 mg/L. En este último reactor sí que se apreció una subida más marcada de la concentración de fósforo.

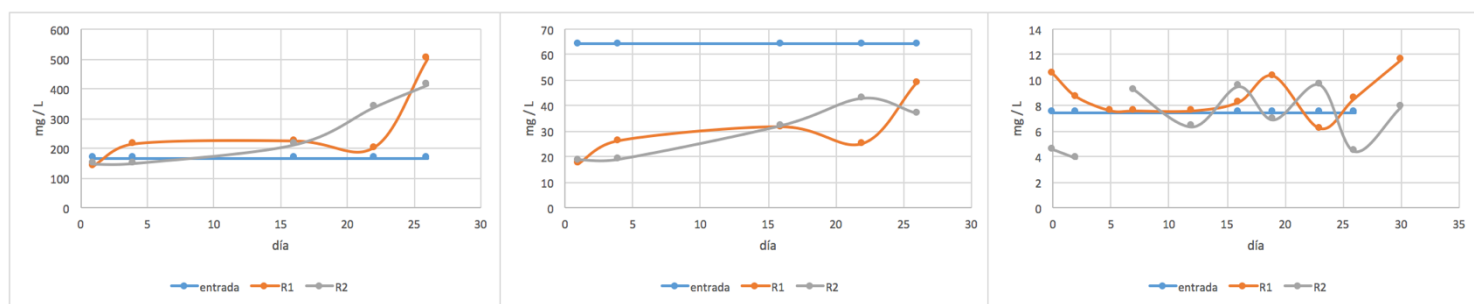


Figura 25: a) Evolución de TOC en R1 y R2, b) Evolución de TN en R1 y R2 y c) Evolución de TP en R1 y R2

### 7.1.1.2. Evolución sólidos suspendidos volátiles

La concentración inicial de biomasa fue de 0,22 g SSV/L en R1 y de 0,24 g SSV/L en R2. Esta concentración alcanzó valores de hasta 0,81 g SSV/L en R1 y de 0,59 g SSV/L en R2 en el día 20 de operación y disminuyó a 0,55 g SSV/L en R1 y de 0,38 g SSV/L en R2 en el final del experimento. Como se puede observar en la figura 26, la concentración de biomasa siempre fue superior en R1 que en R2.

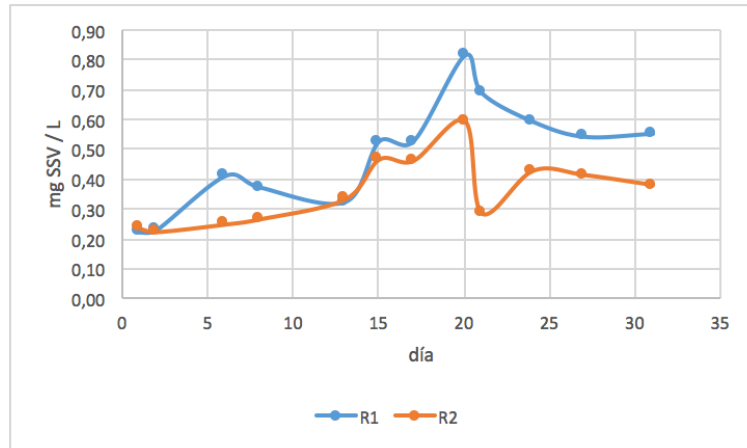


Figura 26: Evolución de SSV en R1 y R2

### 7.1.1.3. Producción de carbohidratos y PHB

Para representar gráficamente las producciones de carbohidratos y PHA se usan valores expresados en % calculados a partir del polímero producido respecto la cantidad de sólidos suspendidos volátiles.

Como se puede observar en la figura 27, la producción de carbohidratos aumentó a medida que pasaron los días de experimentación y fue en el reactor R2 dónde más producción se consiguió. Los valores iniciales de carbohidratos en ambos reactores fueron similares, 32,47 mg/L en R1 y de 35,99 mg/L en R2 en el primer día. A partir de ese momento, la producción de carbohidratos en R2 aumentó constantemente mientras que la de R1 lo hizo de una forma más oscilatoria. En el final del experimento se consiguieron unos valores de producción de carbohidratos del 33,79% en R1 y del 47,96% en R2. Estos valores equivalen a una cantidad de 186,53 mg/L para R1 y uno de 182,90 mg/L para R2.

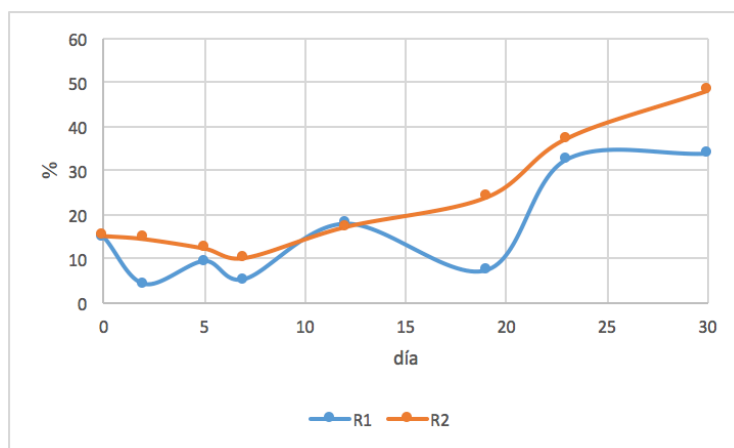


Figura 27: Producción de carbohidratos en R1 y R2

La producción de PHB (figura 28) tendió a disminuir a lo largo de la duración de los cultivos. En el inicio de los experimentos los análisis de PHB dieron resultados de una producción del 2,39% en R1 y del 2,03% en R2, valores que equivalen a 5,3 mg/L en R1 y de 4,8 mg/L en R2. A partir de ese momento las concentraciones de PHB se redujeron a más de la mitad. En el final del estudio los valores se situaban a 0,3% en R1 y a 0,6% en el caso de R2.

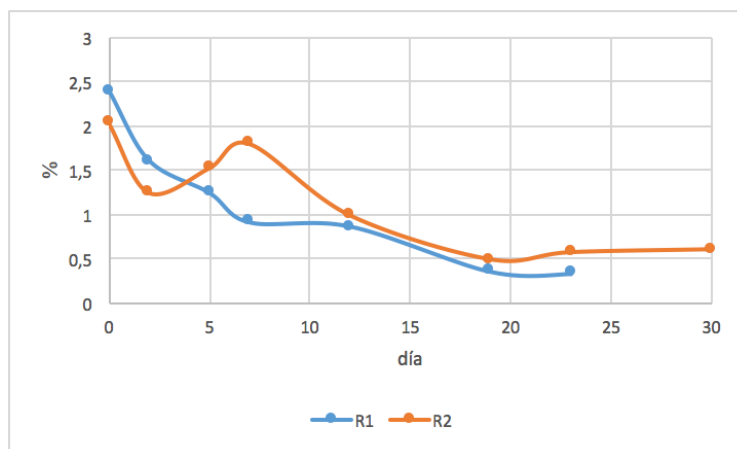


Figura 28: Producción de PHB en R1 y R2



#### 7.1.1.4. Evolución y recuento de microorganismos

En la representación gráfica de la cantidad de microorganismos determinada mediante el recuento se han expresado los valores en su logaritmo para ayudar a su comprensión visual (figura 29).

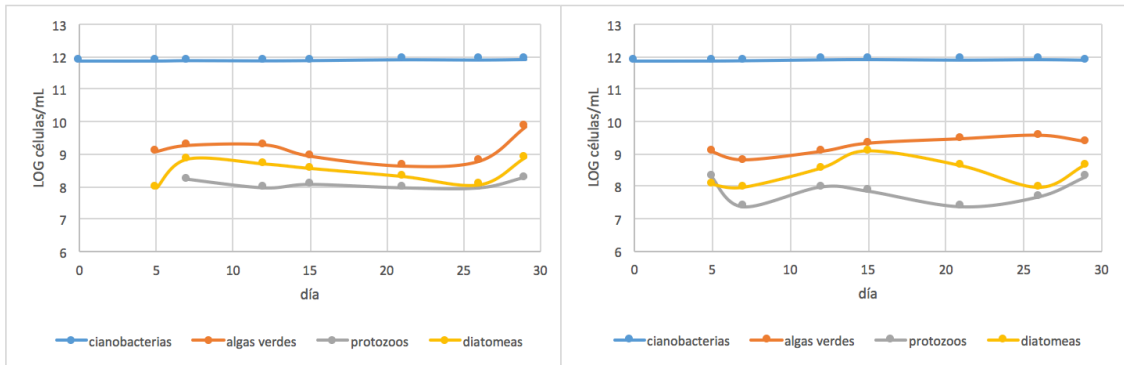


Figura 29: a) Evolución de los microorganismos en R1 y b) Evolución de los microorganismos en R2

Durante la evolución de los experimentos la cantidad de cianobacterias se mantuvo más o menos constante en ambos casos, alrededor de  $8,07 \cdot 10^{11}$  células/mL. Por lo que respecta a las algas verdes, en ambos reactores se observó un aumento de éstas con el transcurso de los días. Se pasó de contar  $1,28 \cdot 10^9$  células/mL a encontrar  $7,25 \cdot 10^9$  células/mL. En el caso de las diatomeas sí que se observó un aumento de su presencia y con los protozoos no hubo ni aumentos y disminuciones destacables en el cultivo.

A pesar de no tener diferencia en las concentraciones de cianobacterias a lo largo los experimentos, en las siguientes imágenes (figuras 30 y 31) se observan los cambios en las dinámicas de las cianobacterias en ambos reactores mediante imágenes obtenidas con el microscopio.

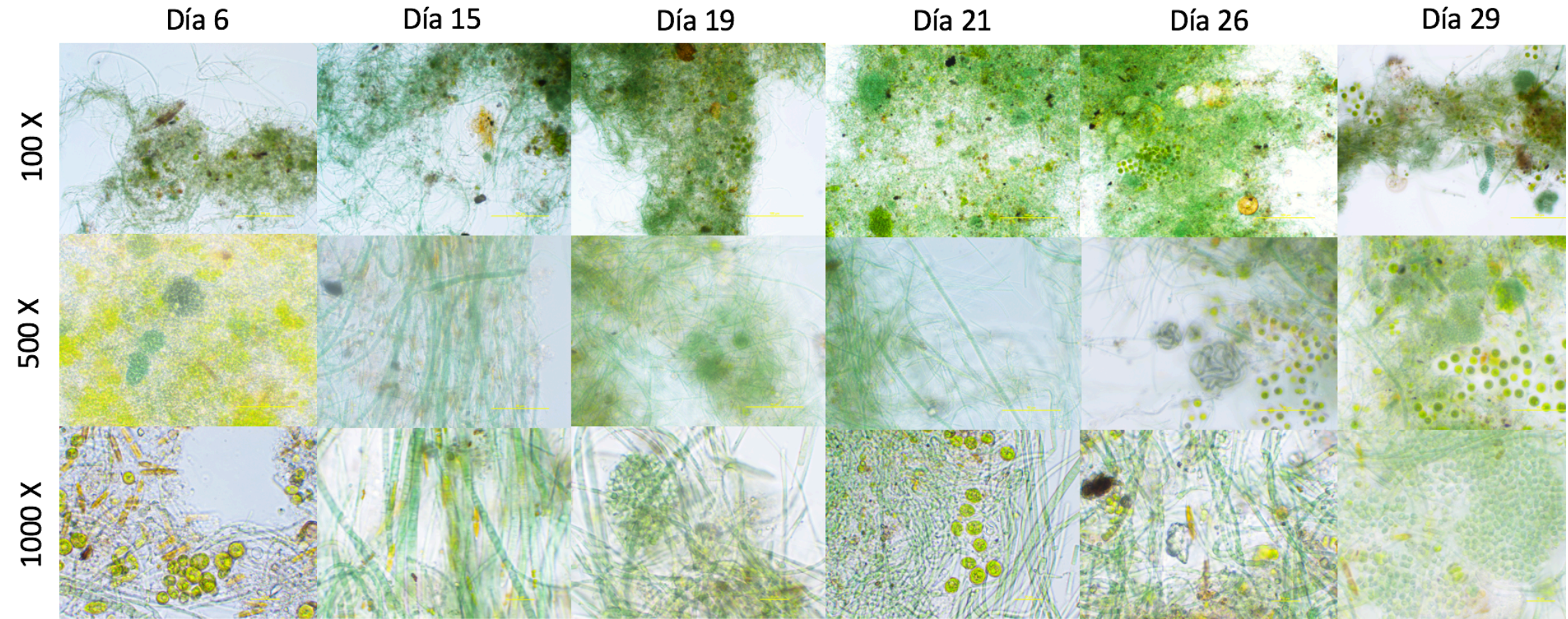


Figura 30: Evolución de la población de cianobacterias en R1

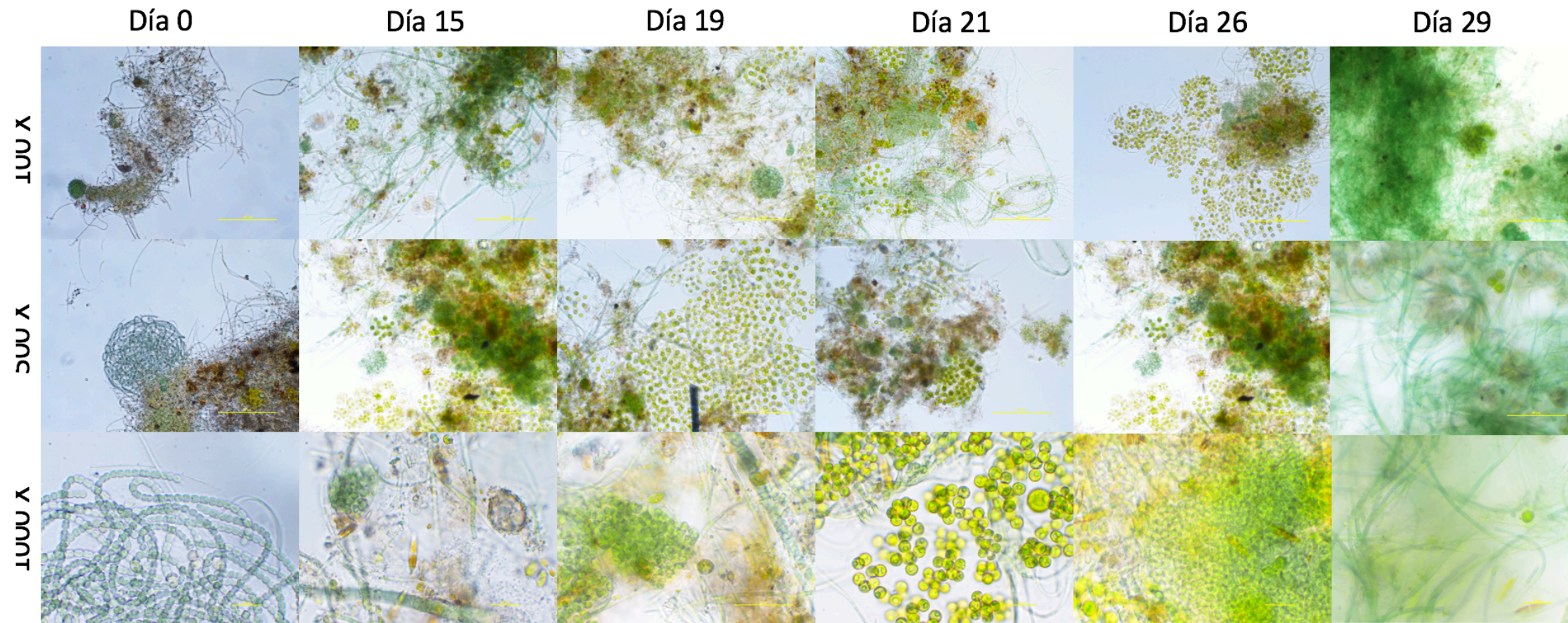


Figura 31: Evolución de la población de cianobacterias en R2

En el reactor R1 (figura 30) se observaron flóculos de cianobacterias esféricas des del principio al final de la duración del experimento. En los primeros días estos flóculos estaban presentes en menor cantidad pero eran mayores. Con el paso del tiempo, éstos cada vez se hacían más pequeños pero había más cantidad. El cultivo estaba formado mayoritariamente por *Pseudanabaena* sp. (filamentosas) en gran cantidad y fueron las que predominaron el cultivo. A partir del día sexto aparecieron las *Oscillatoria* sp. y el *Nostoc* sp. A diferencia de los primeros días, donde se observaba una masa de cianobacterias uniforme en el interior del reactor, durante los últimos días del cultivo, el medio se volvió cada vez más transparente ya que los flóculos de filamentos se volvieron cada vez más agregados. En los últimos días una gran cantidad de algas verdes se desarrolló en el medio formando flóculos. En este reactor no se detectaron las especies *Rivularia* sp. y *Tolypothrix* sp.

En el reactor R2 (figura 31), en el que, a diferencia del R1, la alimentación se le diluyó a la mitad, se comportó de forma similar al anterior. Durante los primeros días de cultivo estuvieron presentes tanto cianobacterias filamentosas como esféricas formando flóculos. La presencia de *Pseudanabaena* sp. estuvo des del primer día igual que la de *Nostoc* sp., pero las *Oscillatoria* sp. se detectaron a partir del décimo día. Durante el paso del tiempo las agregaciones de cianobacterias iniciales disminuyeron de tamaño. Se destaca el gran aumento de la cantidad de algas verdes tanto individuales como formando agregaciones. En los últimos días las masas de filamento se volvieron cada vez más densas lo que complicaba el recuento de las distintas especies de cianobacterias en general. En este cultivo también fueron las *Pseudanabaena* sp. las que lo dominaron por encima de las *Oscillatorias* sp. y, como en el caso anterior, no se detectaron ni *Rivularia* sp. y ni *Tolypothrix* sp.

## **7.1.2. Experimento R3 y R4**

### **7.1.2.1. Análisis de los parámetros pH, oxígeno disuelto, TOC, TN y TP**

Igual que en los experimentos R1 y R2, los cultivos de los experimentos R3 y R4 permanecieron en condiciones oxigenas a lo largo de los experimentos, por lo que se encontraron valores promedios de oxígeno disuelto de  $7,59 \pm 0,97$  mg OD/L en R3 y de  $10,35 \pm 3,30$  mg OD/L en R4 (figura 32a).

Las concentraciones de oxígeno disuelto en R3 se mantuvieron más o menos constantes durante el paso de los días. El valor inicial fue de 7,5 mg OD/L y el final disminuyó a 6,66 mg OD/L. En R4 se observó un aumento destacable de la concentración de oxígeno disuelto en los últimos tres días. Se partió de una concentración de 7,91 mg OD/L que aumentó hasta los 18,18 mg OD/L.

En el caso del pH, al estar regulado mediante el pHmetro y las bombas de ácido, su valor se mantuvo a  $7,59 \pm 0,09$  en R1 y a  $7,82 \pm 0,11$  en R2 (figura 32b).

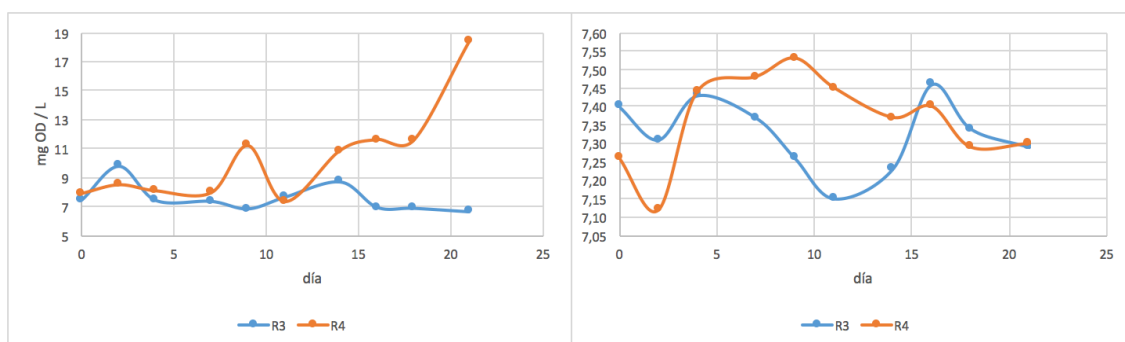


Figura 32: a) Evolución del OD en R3 y R4 y b) Evolución del pH en R3 y R4

Las concentraciones TOC (figura 33a) tuvieron un comportamiento similar en R3 y R4 siendo las concentraciones en R3 más elevadas que en R4. La concentración de TOC en la entrada tuvo un valor promedio de 117,56 mg/L. En un primer momento, la concentración de TOC en R3, que fue de 215,9 mg/L, se encontraba por debajo de los 338,1 mg/L de R4. A partir del cuarto día, se intercambiaron las posiciones y R3 osciló entre 200 y 250 mg/L hasta que en el día 16 se produjo una subida de la concentración a 332,3 mg/L. Algo similar ocurrió en R4, se apreció una subida de la concentración de TOC en el día 16 de hasta 174,5 mg/L. A partir de ese día el TOC en R3 fluctuó hasta los 297,8 mg/L del último día y R4 se mantuvo estable hasta acabar con 160,5 mg/L.

Las concentraciones de TN (figura 33b) se mantuvieron siempre por debajo del valor de TN del efluente, que fue de 65,12 mg/L, exceptuando dos casos en R3. A lo largo del experimento se produjo un aumento gradual de TN pasando de tener una concentración de TN de 24,13 mg/L el reactor R3 a una de 75,81 mg/L, y una concentración de 37,43 mg/L en R4 a una concentración de TN de 61,33 mg/L en el último día del cultivo.

Para el caso del TP (figura 33c), se observa como las concentraciones fueron más o menos similares a las del TP del efluente que se usó como alimento, exceptuando el día 4 en ambos reactores que se produjo un pico de concentración de TP. Los valores en R3 y R4 se situaron entre los 5 y los 10 mg/L siendo siempre las concentraciones de R3 más elevadas.

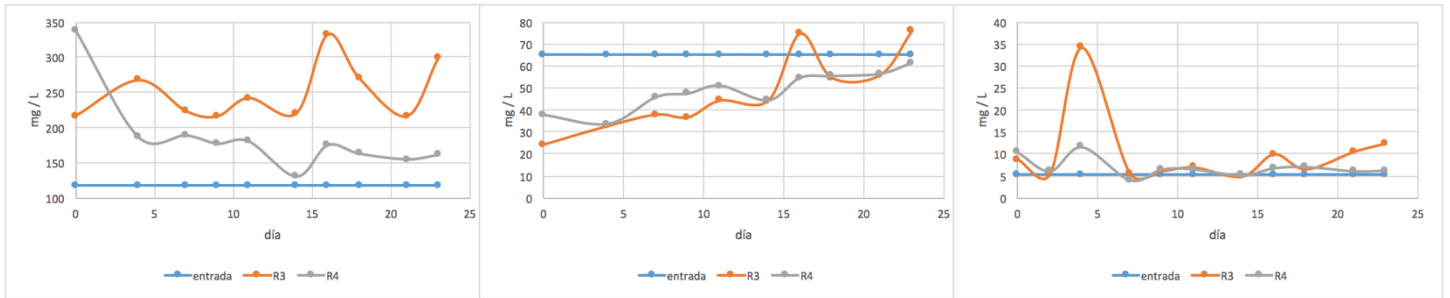


Figura 33: a) Evolución de TOC en R3 y R4, b) Evolución de TN en R3 y R4 y c) Evolución de TP en R3 y R4

### 7.1.2.2. Evolución sólidos suspendidos volátiles

La concentración inicial de biomasa (figura 34) fue de 0,48 g SSV/L en R3. Ésta aumentó hasta el día 21 que llegó a los 0,60 g SSV/L y a partir de este momento, disminuyó hasta los 0,44 g SSV/L en el último día. En el reactor R4, la biomasa pasó de estar en 0,41 g SSV/L en el primer día a disminuir hasta 0,29 g SSV/L en el día 7. A partir de ese momento, los valores de SSV se mantuvieron hasta el final del experimento.

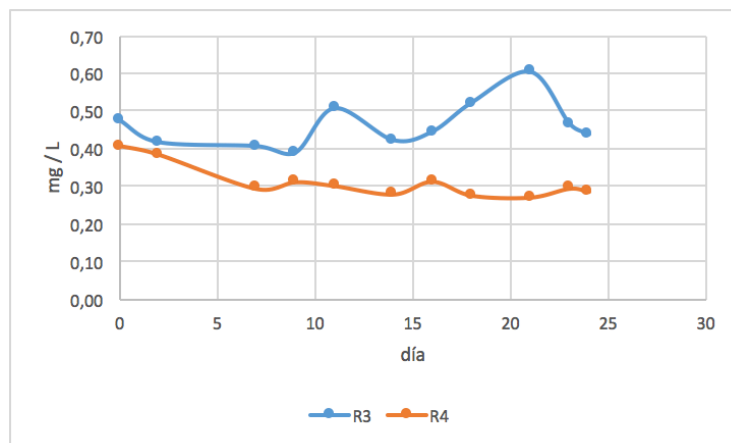


Figura 34: Evolución de los SSV en R3 y R4

Las concentraciones de sólidos suspendidos volátiles en R4 siempre se mantuvieron por debajo de las de R3, reactor con un tiempo de retención de sólidos más elevado.

### 7.1.2.3. Producción de carbohidratos y PBH

Como se puede observar en la figura 35, se consiguió una producción más elevada de carbohidratos en el reactor que se operó con el tiempo de retención mayor (R3) a pesar de que la producción del polímero disminuyó con el paso del tiempo. En ambos reactores la evolución sucedió de forma

similar. En un primer momento la producción fue de 30,76% en R3 y de 27,83% en R4. Estos valores disminuyeron hasta el día cuarto a valores del 15,61% en R3 y del 12,38% en R4. A partir de ese momento la producción volvió a subir hasta el día siete y en ese punto volvió a decrecer suavemente. En el último día las producciones fueron bastante similares: 14,12% en R3 y 13,25% en R4.

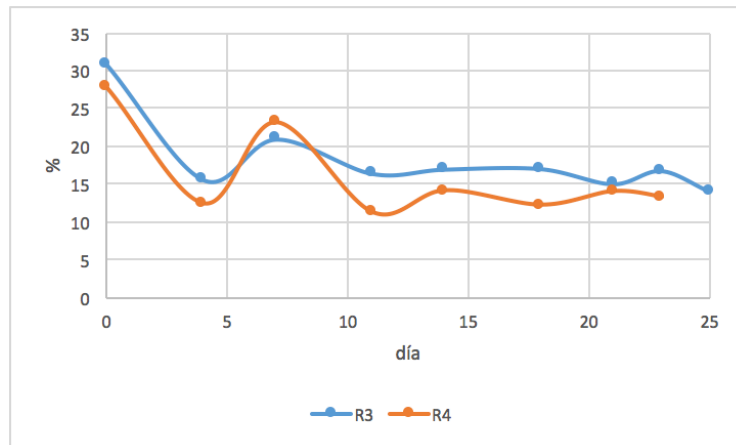


Figura 35: Producción de carbohidratos en R3 y R4

En los reactores R3 y R4 (figura 36) no hubo producción de PHB por parte de las cianobacterias a pesar de que sí que se obtuvo PHB, valores de entre 2 y 2,5%, en los primeros días. Se puede decir que estas cantidades de PHB provenían de la biomasa del reactor madre (PBR) donde sí que había acumulación de PHB por la limitación de nitrógeno. Como se observa en la gráfica, a partir del séptimo día los valores de PHB fueron nulos en ambos reactores.

En los reactores R3 y R4 no hubo limitación de nutrientes como en el caso de R1 y R2. Este hecho indica que, tal como encontró en la biografía revisada, la limitación de nutrientes es necesaria para la producción de PHB.

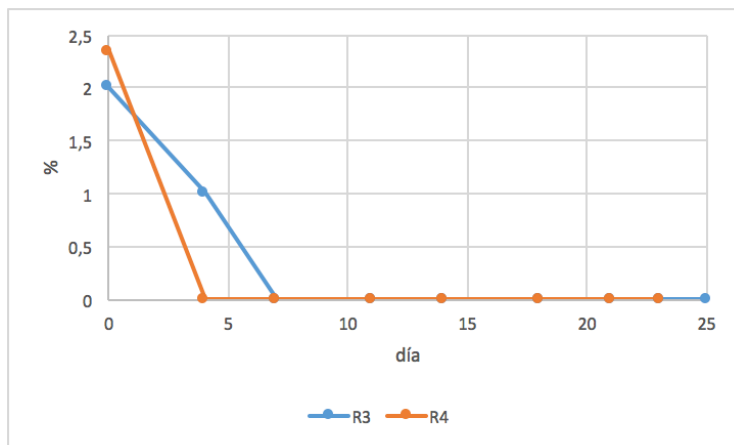


Figura 36: Producción de PHB en R3 y R4

#### 7.1.2.4. Evolución y recuento de microorganismos

Durante el transcurso de los experimentos la cantidad de cianobacterias se mantuvo más o menos constante en ambos casos, alrededor de  $8,40 \cdot 10^{11}$  células/mL en R3 y  $8,40 \cdot 10^{11}$  células/mL en R4 (figura 37).

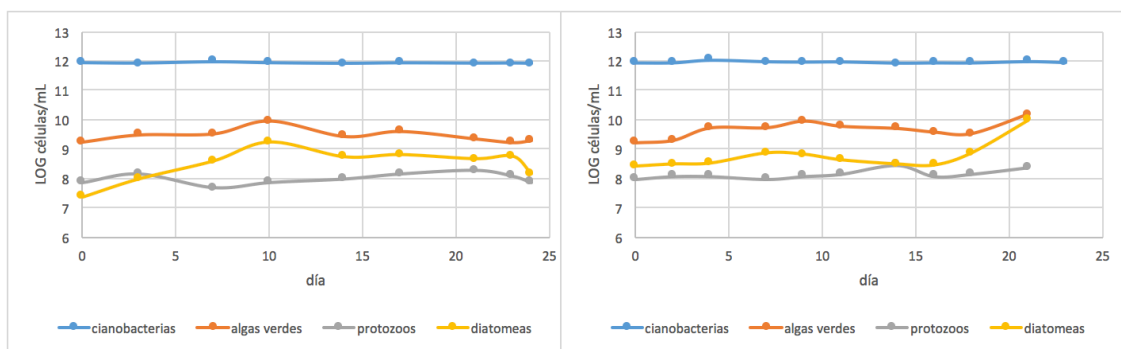


Figura 37: a) Evolución de los microorganismos en R3 y b) Evolución de los microorganismos en R4

En R3 se observa cómo se produjo un aumento de la cantidad de algas verdes de hasta  $8,86 \cdot 10^9$  células/mL en el día 10 pero volvió a reducirse a  $1,97 \cdot 10^9$  células/mL al final. En R4 el aumento de produjo de forma progresivo des del inicio hasta llegar al final con una cantidad de  $1,48 \cdot 10^{10}$  células/mL. Respecto a las diatomeas en R3 se observa un pico de población en el día 10 pero se redujo a  $1,44 \cdot 10^8$  células/mL. La cantidad de protozoos osciló entre valores cercanos a  $1,07 \cdot 10^8$  células/mL. En R4 las diatomeas aumentaron progresivamente pasando de  $2,65 \cdot 10^8$  células/mL a  $9,32 \cdot 10^9$  células/mL. En este reactor los protozoos también aumentaron, pero estando siempre por debajo de la cantidad del resto de microorganismos.



En las figuras 38 y 40 se puede observar la evolución de la diversidad microbiana mediante imágenes obtenidas con el microscopio y en las figuras 39 y 41 la evolución del contenido de los reactores a lo largo del experimento.

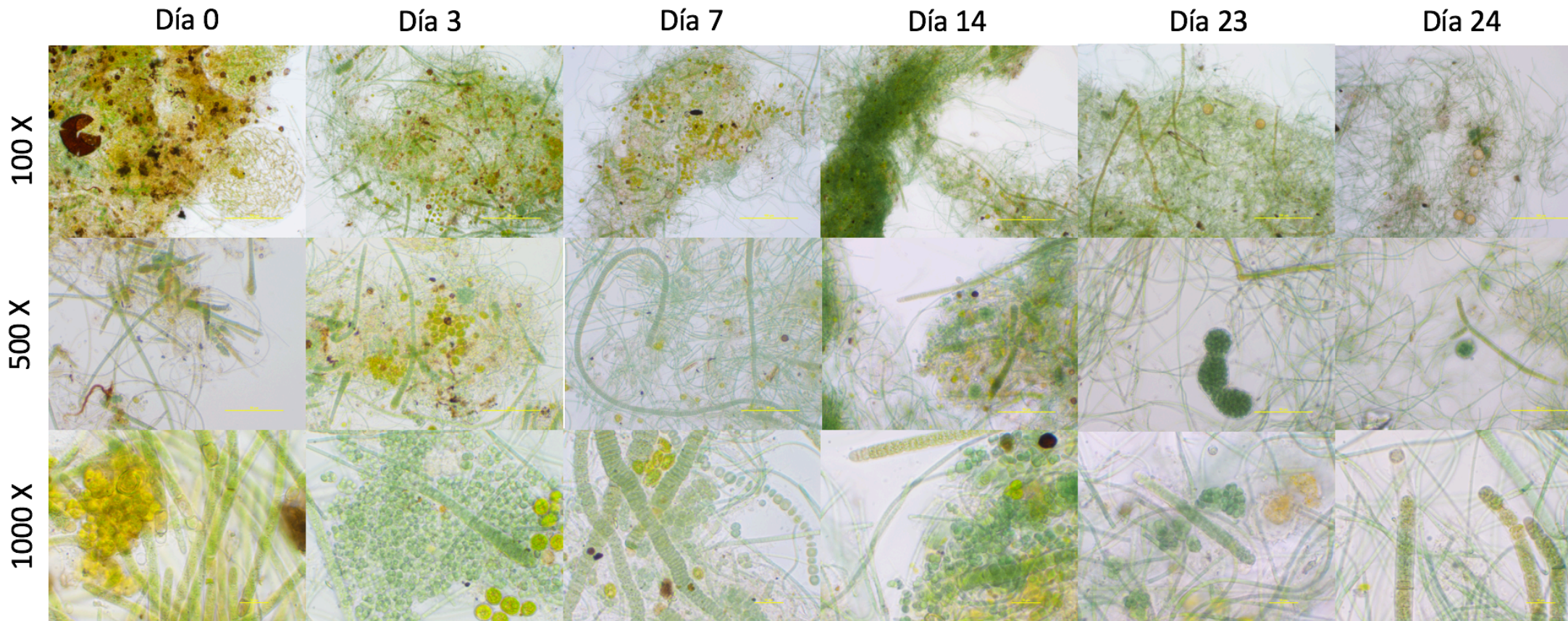


Figura 38: Evolución de la población de cianobacterias en R3

En el reactor R3 (figura 38), cuyo tiempo de retención hidráulico fue de 8 días, se observó, a diferencia de los R1 y R2, una biomasa con una gran cantidad de *Oscillatoria* sp. y la aparición de *Rivularia* sp. En este hubieron menos flóculos de *Nostoc* sp., *Aphanocapsa* sp. y *Chroococcus* sp. inicialmente. En los primeros días incluso se llegó a detectar *Spirulina* sp., una especie de gran interés alimenticio. Con el paso de los días las *Oscillatoria* sp. disminuyeron hasta cantidades similares a las de *Pseudanabaena* sp. y los flocs de *Nostoc* sp. aumentaron. Desde mediados del ensayo (día 14) hasta el final, las cianobacterias filamentosas se encontraron en agrupaciones cada vez más densas y de mayor tamaño.

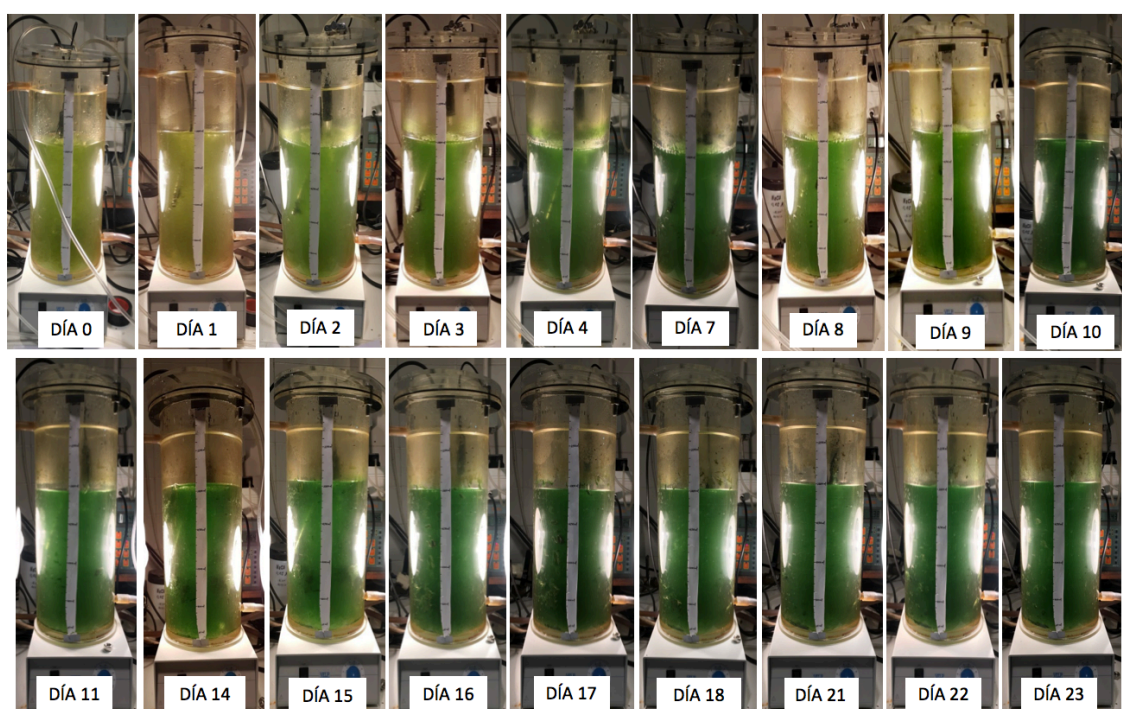


Figura 39: Evolución del color del licor mezcla en R3

Como se puede observar en las fotografías de la evolución del contenido del reactor (figura 39), a pesar de que en los primeros días el cultivo adoptó un color marronoso debido a la adaptación de los microorganismos, el color verde cada vez se vuelve más oscuro y se intensifica más.

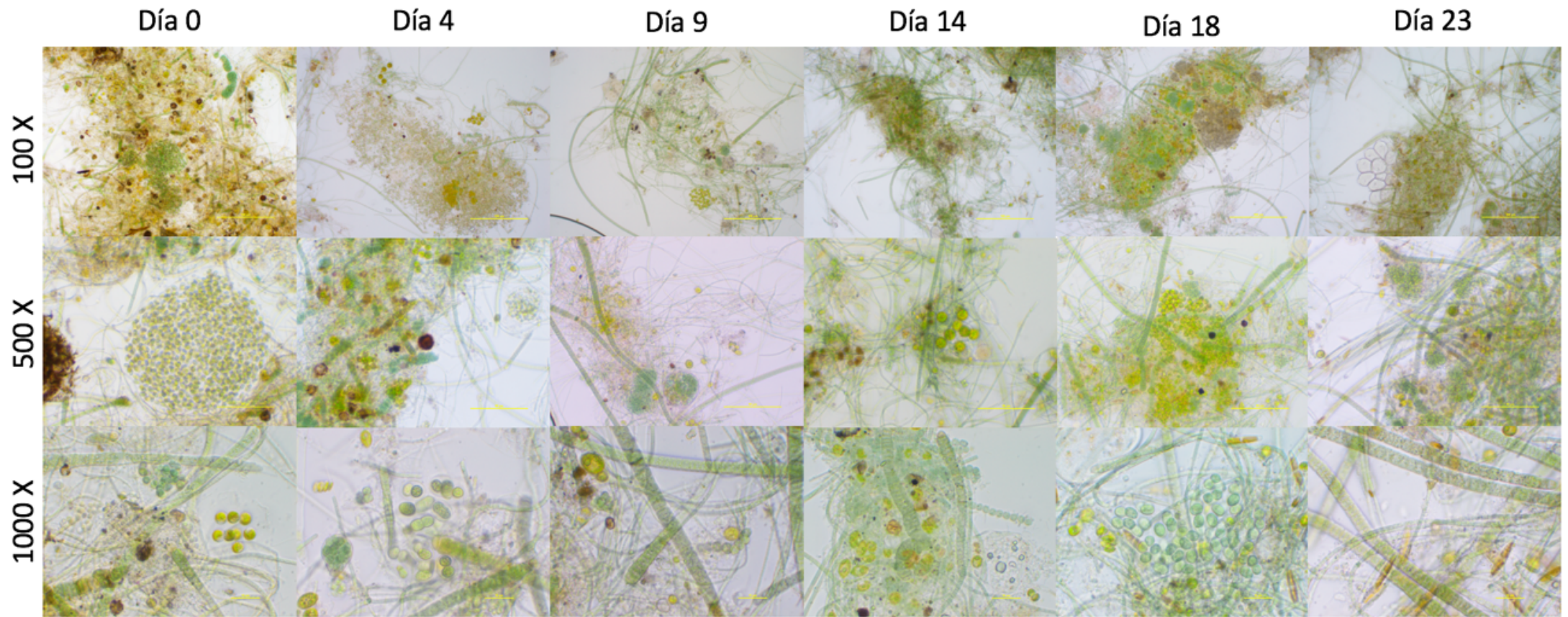


Figura 40: Evolución de la población de cianobacterias en R4

Igual que en R3, en R4 (figura 40) el cultivo inicial estuvo formado por gran cantidad de *Oscillatoria* sp. y *Rivularia* sp. cuya presencia disminuyó con el paso del tiempo, pero manteniéndose siempre en cantidades mayores a R3. Las *Pseudanabaena* sp. estuvieron presentes en todo el experimento lo que en cantidades inferiores a R3. También hubo una gran presencia de *Nostoc* sp., *Chroococcus* sp. y *Aphanocapsa* sp. Estas cianobacterias esféricas se encontraban de forma individual o formando agregaciones de no más de 30 unidades, pero con los días estos flóculos se volvieron cada vez de un tamaño mayor siendo más grandes que en R3. A pesar del aumento de flóculos, las células individuales se mantuvieron. Des de los primeros días estuvieron presentes gran cantidad de algas verdes que aumentó con el paso de los días. También se detectó una presencia más elevada de lo habitual en rotíferos. Esta presencia puede estar relacionada con la mayor cantidad de agua residual suministrada a este reactor como alimento.

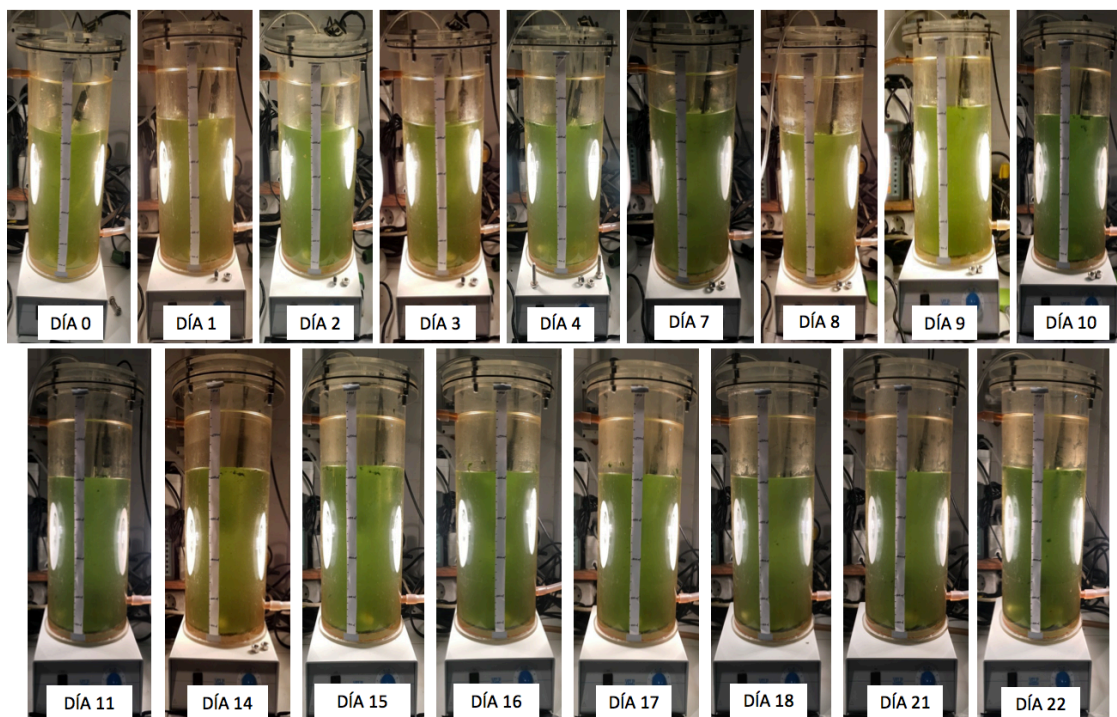


Figura 41: Evolución del color del licor mezcla en R4

Como se observa en la figura 41, el cultivo hizo dos sucesiones de cambio de color. La primera se produjo durante la primera semana donde se pasó de un color marronoso y poco intenso a un verde oscuro. A partir de ese momento el medio volvió a ser de un tono marrón, pero con los días se cambió a verde y se intensificó.

## 7.2. Bloque 2

A continuación se muestran los resultados obtenidos por las diferentes analíticas realizadas durante los experimentos P1, P2, P3, P4, P5 y P6.

### 7.2.1. Experimento P1 y P2

#### 7.2.1.1. Evolución pH y oxígeno disuelto

El cultivo del experimento P1 permaneció en condiciones oxigenas a lo largo del ensayo y su concentración de oxígeno disuelto aumentó des de los 10,65 mg/L iniciales a los 12,34 mg/L finales. Al cultivo del experimento P2 se le introdujo un borboteo de aire para proveer de nitrógeno al medio. Su concentración de oxígeno disuelto durante el experimento fue inferior a la del P2. En ese caso, la concentración media fue de 7,65 mg OD/L (figura 42).

En el caso del pH, a pesar de estar regulado mediante el pHmetro y las bombas de ácido, los valores disminuyeron en ambos casos manteniéndose siempre en un rango de entre 6,9 y 7,7 siendo superior el pH en el reactor P2. El reactor P1 pasó de tener un pH de 7,18 al inicio del ensayo a un pH de 7,02 al final y el reactor P2 pasó de un pH de 7,24 a uno de 7,12.

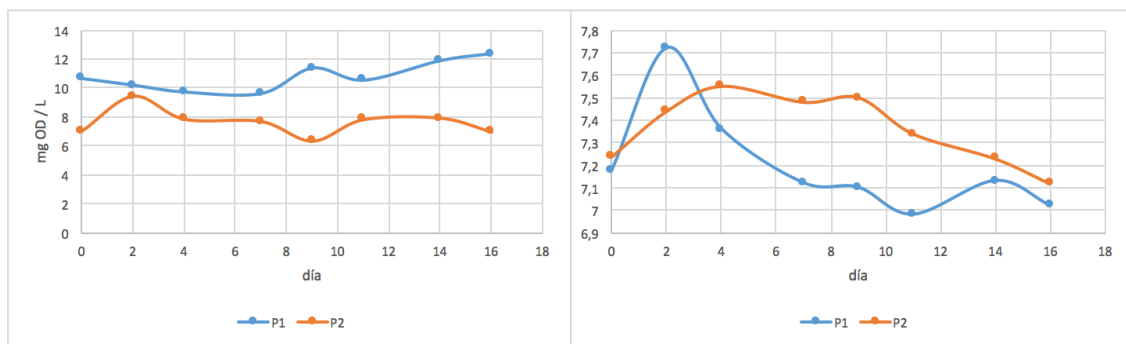


Figura 42: a) Evolución del OD en P1 y P2 y b) Evolución del pH en P1 y P2

### 7.2.1.2. Evolución sólidos suspendidos volátiles

La biomasa en ambos reactores se mantuvo similar en ambos reactores durante los primeros 7 días de ensayo (figura 43). A partir de este momento, en ambos reactores se produjo un aumento hasta el día 14 siendo la concentración del P2 la más elevada, 0,62 g SSV/L respecto los 0,49 g SSV/L de P1. En el final del ensayo en ambos reactores se detectó una concentración de SSV similar: 0,19 mg/L en P1 y 0,16 mg/L en P2.

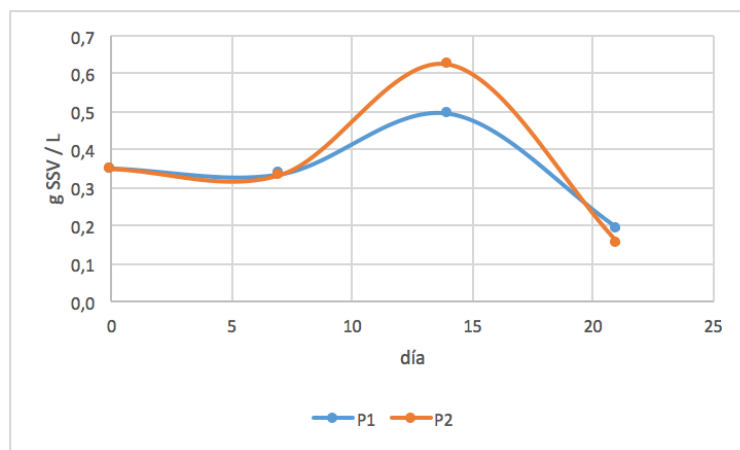


Figura 43: Evolución de los SSV en P1 y P2

### 7.2.1.3. Consumo de carbono inorgánico total

La gráfica de evolución del carbono inorgánico total en ambos reactores tiene forma de sierra (figura 44). Esto se debe a la adición de  $\text{NaHCO}_3$  periódica de a cada reactor como fuente de carbono inorgánico soluble. Los valores bajos son los que representan el carbónico inorgánico (CI) presente en el reactor y los valores altos equivalen a los valores de CI sumándole la cantidad de carbono añadido periódicamente.

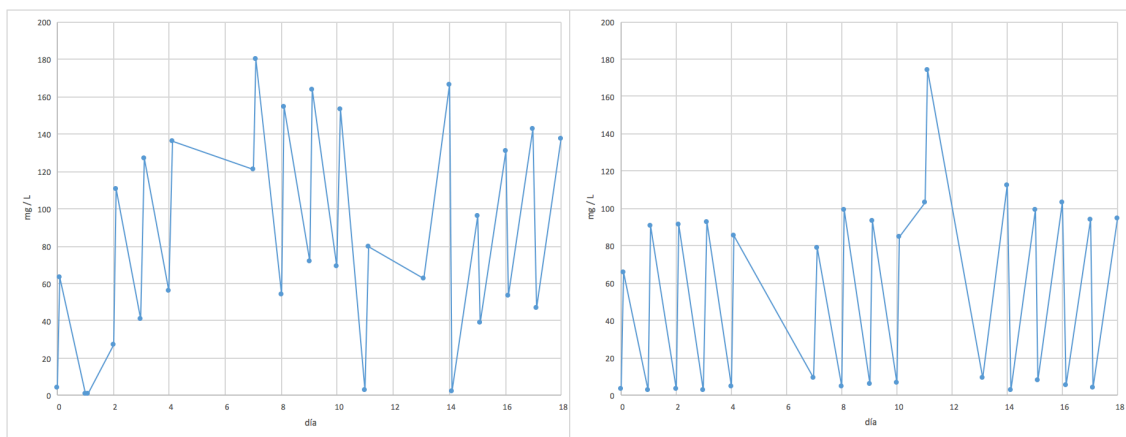


Figura 44: a) Evolución del TIC en P1 y b) Evolución del TIC en P2

La evolución de la gráfica demuestra que los organismos estuvieron consumiendo carbono todos los días. Fueron los microorganismos del reactor P2 los que consumieron más carbono, reactor donde había limitación de fósforo. En él, las cianobacterias, mediante los heterocistes, consumieron el nitrógeno atmosférico.

#### 7.2.1.4. Producción de carbohidratos y PHB

La mayor producción de carbohidratos se observó en el reactor P2, reactor con limitación de fósforo, a pesar de que la producción en el último día se disparó en P1 (figura 45). La producción de dicho polímero se comportó de forma similar en ambos reactores. Se empezó con valores del 6,18% en P1 y del 19,64% en P2. Esta producción aumentó hasta el día 8 alcanzando el 33% de producción aproximadamente los dos reactores, pero disminuyó hasta que se volvió a recuperar a partir del día 12 en el que la producción se estabilizó alrededor del 22% en P1 y del 24% en P2.

La producción máxima de carbohidratos se alcanzó en el día 8 en el caso de P1 con un valor del 32,02% y en ese mismo día lo hizo P2 con un valor muy similar, 34,32%. Cabe destacar el aumento final de producción de P1 del 52,19%.



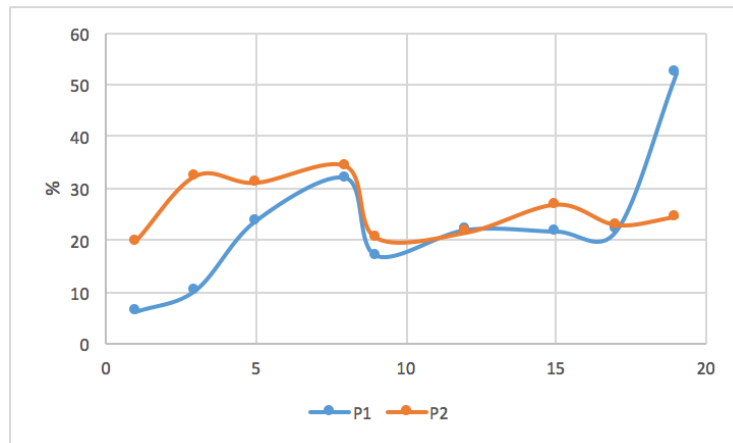


Figura 45: Producción de carbohidratos en P1 y P2

Igual que en el caso de la producción de carbohidratos, la producción de PHB en este caso fue normalmente más elevada en P2 que en P1 (figura 46). Aunque ambos reactores partieron de una producción inicial similar del 0,95%, a partir del día 5 la producción de PHB aumentó en P2 hasta alcanzar el 2,38% y en P1 lo hizo a partir del día 12, alcanzando el 1,57%. Entre los días 9 y 15 se observó una disminución de la producción pero se recuperó hasta el final del experimento alcanzando valores de 2,13% en P1 y 4,07% en P2.

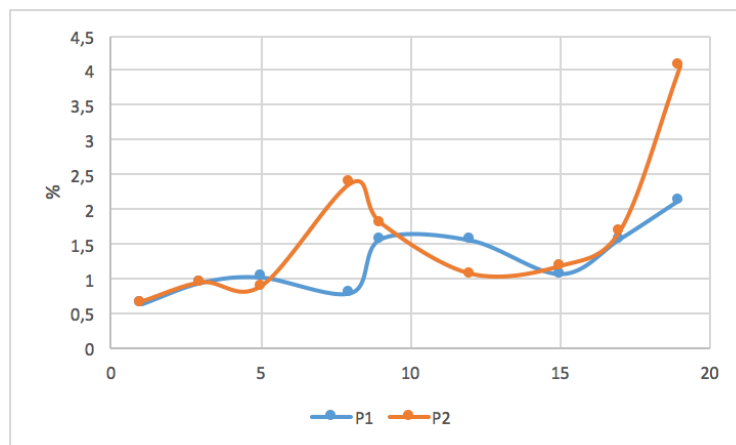


Figura 46: Producción de PHB en P1 y P2

### 7.2.1.5. Evolución y recuento de microorganismos

Durante el transcurso de los experimentos la cantidad de cianobacterias se mantuvo más o menos constante en ambos casos, alrededor de  $1,02 \cdot 10^{12}$  células/mL en P1 produciéndose aumentos en los días 7 y 14, y  $9,30 \cdot 10^{11}$  células/mL en P2 (figura 47).

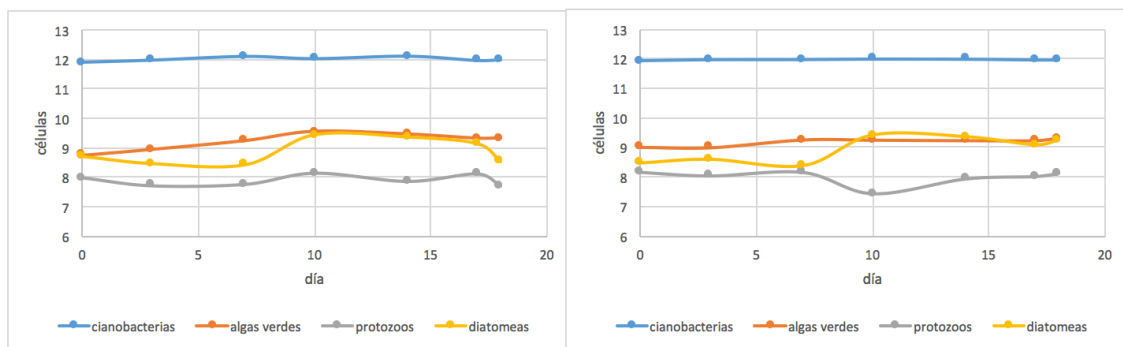


Figura 47: a) Evolución de los microorganismos en P1 y b) Evolución de los microorganismos en P2

Las algas verdes estuvieron presentes en los dos reactores en cantidades parecidas dentro de un rango entre  $1,6 \cdot 10^9$  y  $1,9 \cdot 10^9$  células/mL. Lo mismo ocurrió con las diatomeas y los protozoos.

En las figuras 48 y 50 se puede observar la evolución de la diversidad microbiana mediante imágenes obtenidas con el microscopio y en las figuras 49 y 51 la evolución del contenido de los reactores a lo largo del experimento.

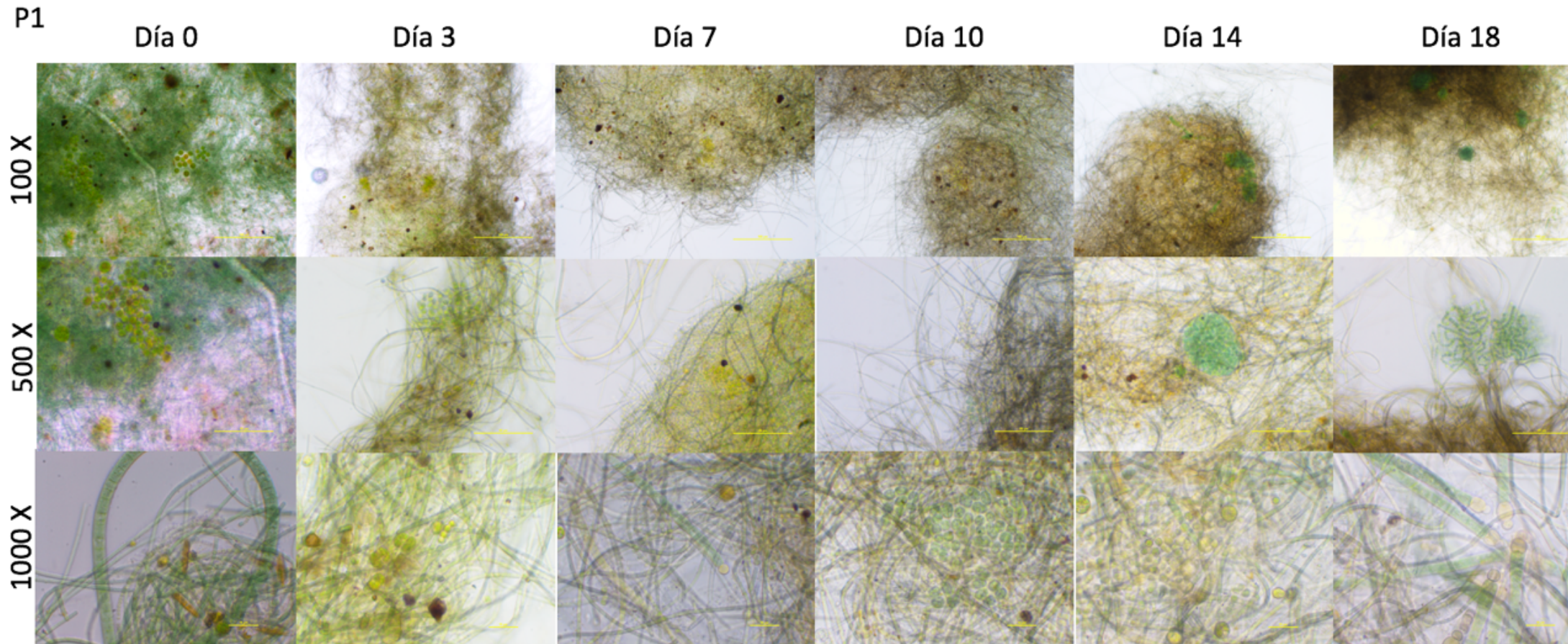


Figura 48: Evolución de la población de cianobacterias en P1

El cultivo de cianobacterias en P1 (figura 48) estuvo dominado por una gran cantidad de *Pseudanabaena* sp. formando agregaciones durante todo el ensayo. La presencia de *Oscillatoria* sp. fue mucho menor en comparación. La presencia de cianobacterias esféricas también estuvo presente, las especies *Chroococcus* sp. y *Aphanocapsa* sp. se encontraron de forma individual mayoritariamente, aunque que también se detectaron algunas formando agregaciones. También se detectó una gran presencia del *Nostoc* sp. formando flóculos. A partir de la primera semana de ensayo se observó un aumento de la especie *Rivularia* sp. y de cianobacterias esféricas. Esta situación se mantuvo hasta los últimos días, dónde las agregaciones de *Pseudanabaena* sp. se volvieron menos densas y se detectaron bastantes flóculos de *Nostoc* sp. Cabe destacar el aspecto amarillento de las cianobacterias a partir del tercer día debido a la falta de nitrógeno.

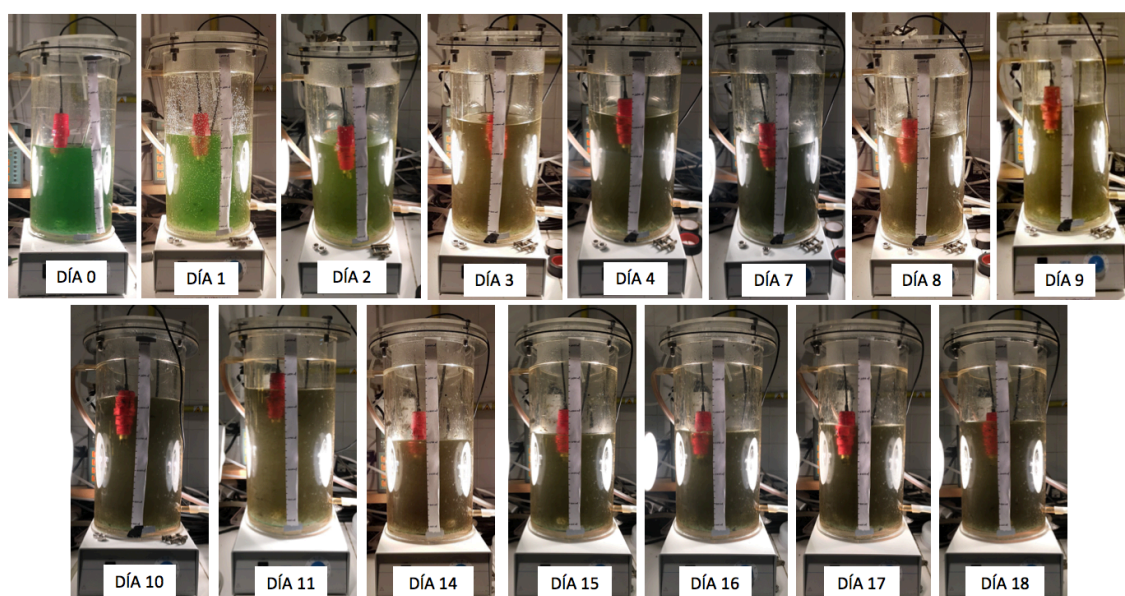


Figura 49: Evolución del color del licor mezcla en P1

Como se puede observar en las imágenes de los reactores (figura 49) y como ya se ha podido ver en las observaciones con el microscopio, con el paso del tiempo el color del cultivo pasó de un verde intenso a un color marrón-verdoso cada vez más oscuro. Eso se debe a la clorosis, un amarillamiento del tejido vegetal por falta de clorofila provocada por deficiencias nutricionales que en ese caso se trata del nitrógeno.

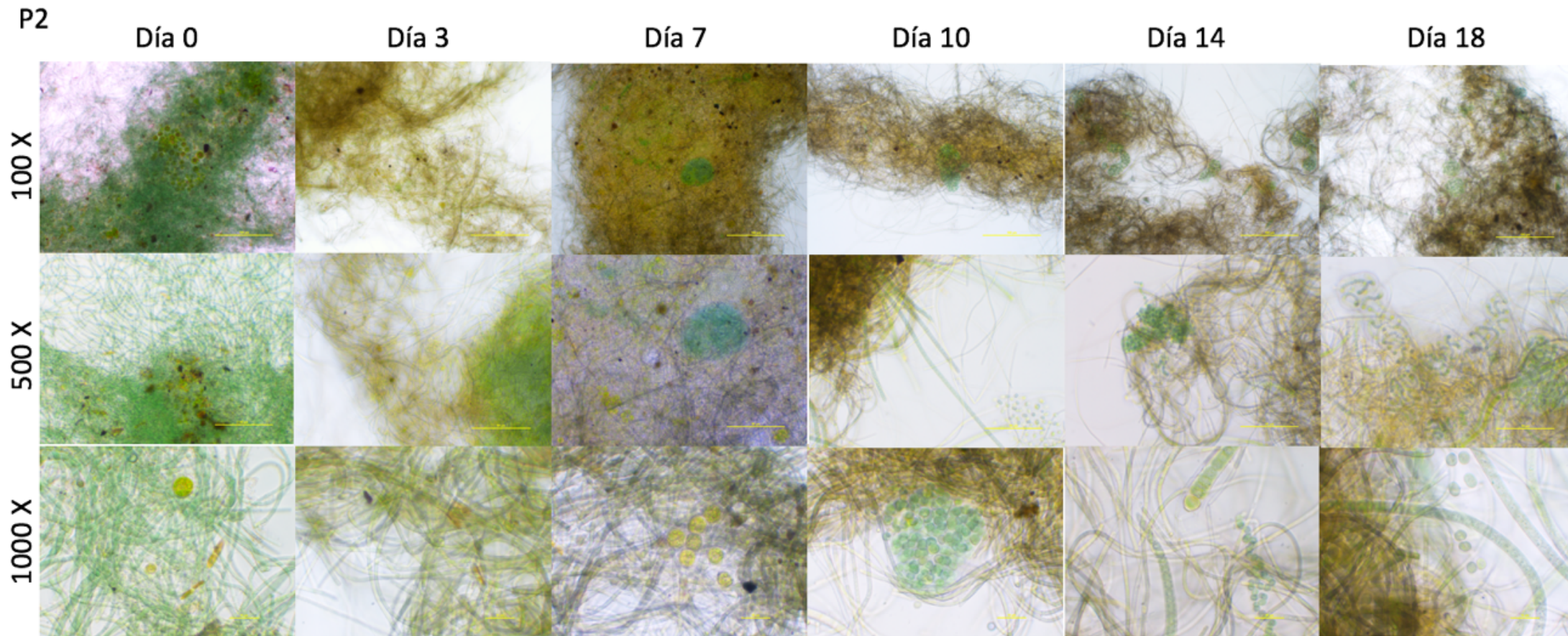


Figura 50: Evolución de la población de cianobacterias en P2

Igual que en P1, el cultivo inicial de P2 (figura 50) estaba formado por una gran cantidad de *Pseudanabaena* sp. agregadas y la presencia de *Oscillatoria* sp. fue mucho menor. A diferencia del P1, en este reactor se observó más presencia de *Aphanocapsa* sp, cianobacterias que se desarrollan más en situaciones con ausencia de fósforo. También se observaron otro tipo de células esféricas, como las *Chroococcus* sp., pero en menor presencia, y *Nostoc* sp., formando cadenas que a la vez formaban flóculos. A partir de la primera semana se detectó el aumento de flóculos de células esféricas, el aumento destacable de *Rivularia* sp. y una mayor densidad de las agregaciones de cianobacterias filamentosas.

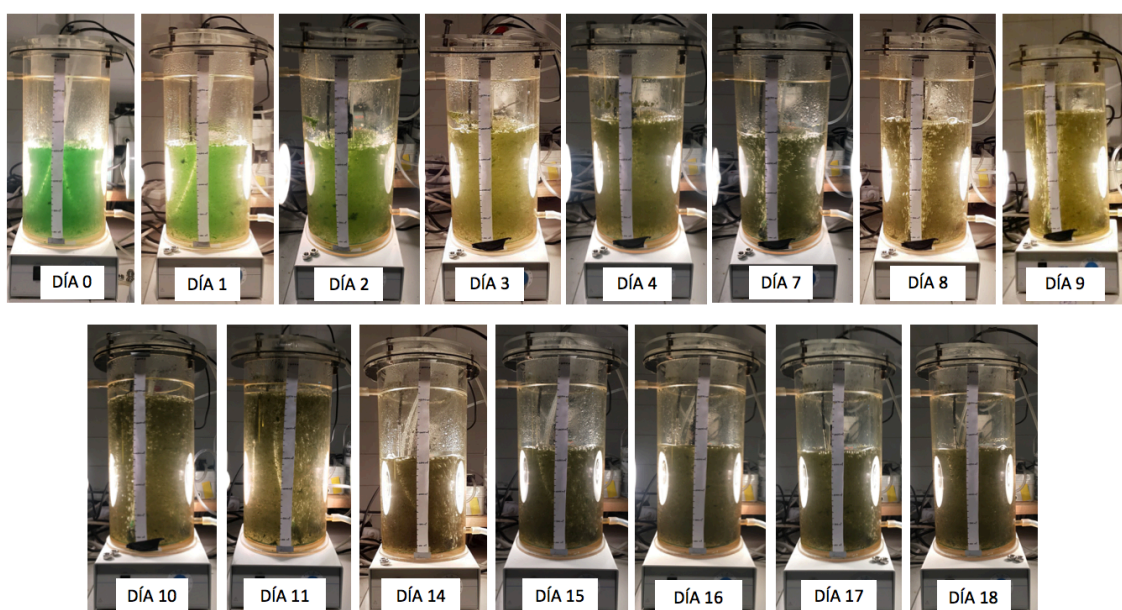


Figura 51: Evolución del color del licor mezcla en P2

La evolución del color en el medio del reactor P2 (figura 51) es similar a la del reactor P1. Como en este reactor también hubo limitación de nutrientes, en este caso fósforo, se produjo clorosis en las células vegetales.

## 7.2.2. Experimento P3 y P4

### 7.2.2.1. Evolución pH y oxígeno disuelto

El cultivo del experimento P3 (figura 52) permaneció en condiciones oxigenas a lo largo del ensayo y su concentración de oxígeno disuelto se mantuvo entre los 7 mg/L y los 7,5 mg/L. Al cultivo del experimento P4 se le introdujo un borboteo de aire para proveer de nitrógeno al medio. Su

concentración de oxígeno disuelto fue menos estable que en el caso anterior. La concentración de OD osciló entre los 7 mg/L y los 8 mg/L, aunque se produjo un pico de 9,42 mg/L en el día 5 y una bajada hasta 6,37 mg/L en el día 14.

En el caso del pH, al estar regulado mediante el pHmetro y las bombas de ácido, los valores fueron más o menos estables manteniéndose siempre en un rango de entre 7,1 y 7,5 en ambos reactores.

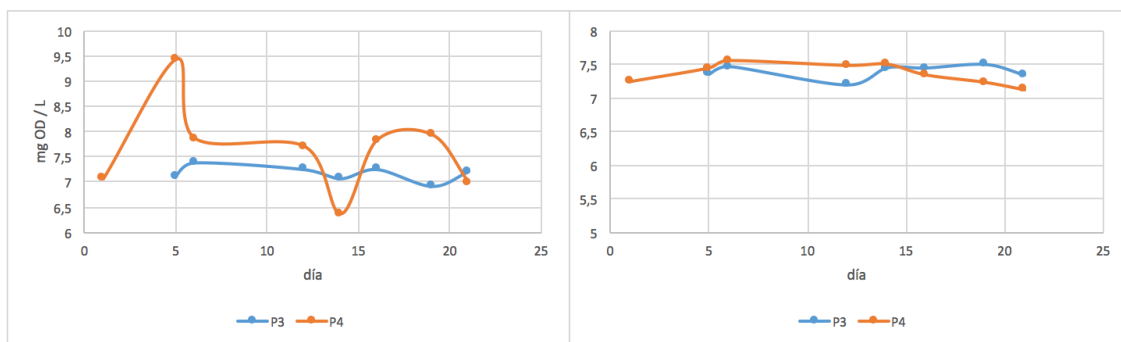


Figura 52: a) Evolución del OD en P3 y P4 y b) Evolución del pH en P3 y P4

#### 7.2.2.2. Evolución sólidos suspendidos volátiles

Tanto en el reactor P3 como en el P4 (figura 53) la biomasa aumentó de forma similar siendo la biomasa de P3 más elevada que la de P4. En el reactor P3 los sólidos suspendidos volátiles pasaron de tener un valor de 0,35 mg/L a uno de 1,05 mg/L. Se produjo un aumento de más de la mitad. Lo mismo sucedió en el P4: los SSV pasaron de 0,19 mg/L a 0,82 mg/L.

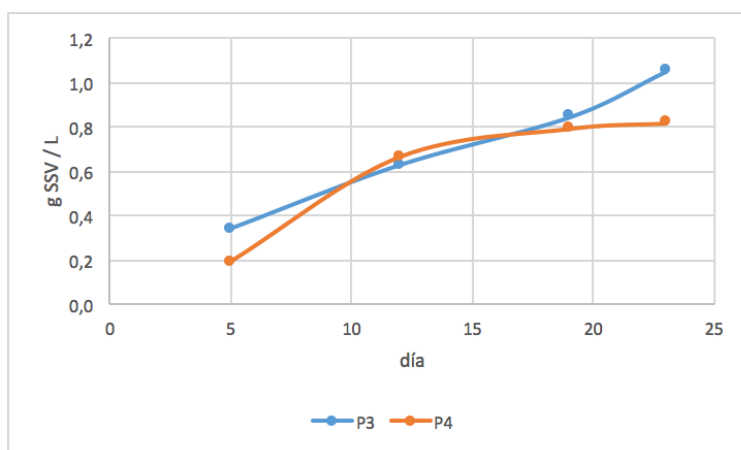


Figura 53: Evolución de los SSV en P3 y P4

### 7.2.2.3. Consumo de carbono inorgánico total

Igual que en los reactores P1 y P2, la gráfica de evolución del carbono inorgánico total en P3 y P4 tiene forma de sierra debido a la adición de  $\text{NaHCO}_3$  periódica de a cada reactor como fuente de carbono inorgánico soluble. Los valores bajos son los que representan el carbónico inorgánico (CI) presente en el reactor y los valores altos equivalen a los valores de CI más la cantidad de carbono añadido periódicamente (figura 54).

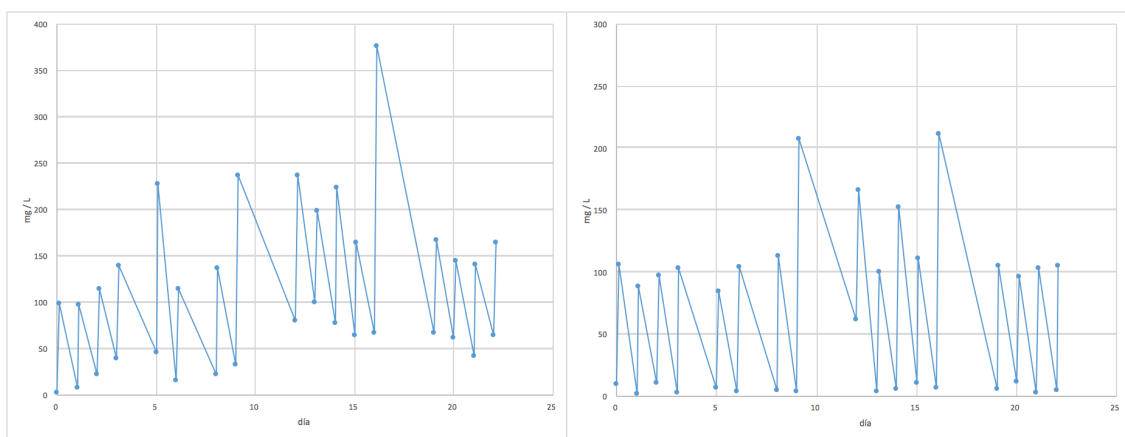


Figura 54: Evolución del TIC en P3 y P4

Los valores de TIC fueron más bajos en P4, reactor con limitación de fósforo. Esto indica que los microorganismos de este reactor fueron los que más carbono añadido consumieron.

### 7.2.2.4. Producción de carbohidratos y PHB

La producción de PHB en los dos reactores fue similar entre ambos (figura 55). Ambos tuvieron un comportamiento oscilatorio con períodos de máximos y mínimos cada 7 días. El reactor P3 fue en el que menos producción de carbohidratos se consiguió. Sus valores de producción estuvieron siempre entre el 15% y el 27% teniendo el último día una producción del 15,47%. En cambio, el reactor P4 dio unos resultados de picos máximos más elevados con un rango entre el 15% y el 32%.



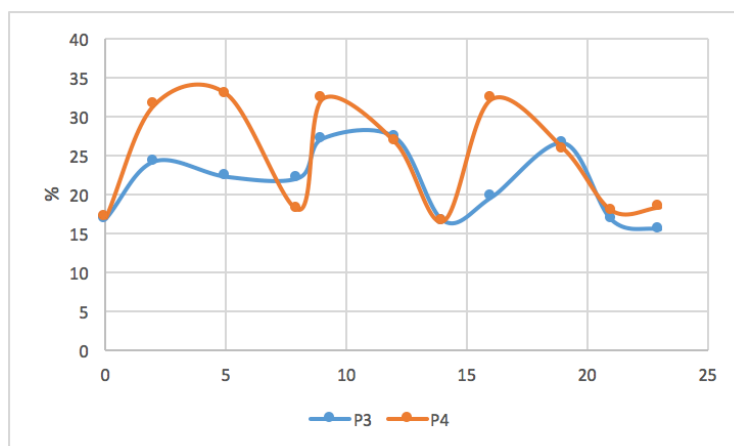


Figura 55: Producción de carbohidratos en P3 y P4

La producción de PHB en los reactores P3 y P4 (figura 56) fue muy baja. Aunque se consiguió detectar PHB, su presencia no fue superior al 1% y en muchos casos fue nula. Con esto se puede decir que la poca producción de PHB pudo ser procedente de las cianobacterias del cultivo madre en las que sí que había acumulación de PHB.

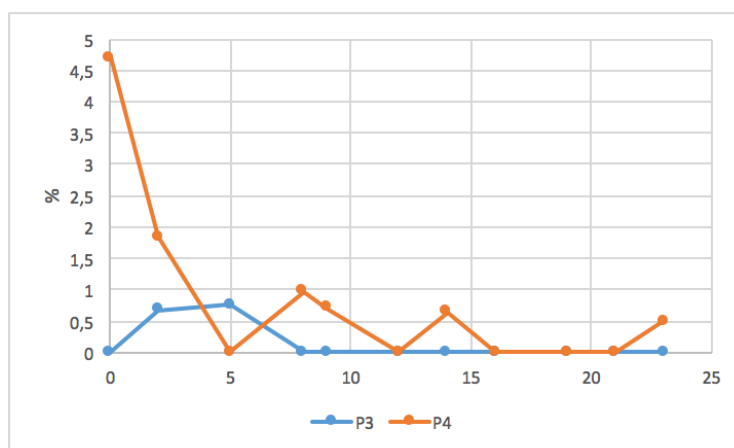


Figura 56: Producción de PHB en P3 y P4

Igual que en el caso anterior, los reactores P1 y P2, los carbohidratos representaron la principal forma de almacenamiento de carbono en los cultivos en comparación con PHB.

### 7.2.2.5. Evolución y recuento de microorganismos

Durante el transcurso de los experimentos la cantidad de cianobacterias se mantuvo más o menos constante en ambos casos (figura 57). Valores alrededor de  $8,88 \cdot 10^{11}$  células/mL en P3 y  $9 \cdot 10^{11}$  células/mL.

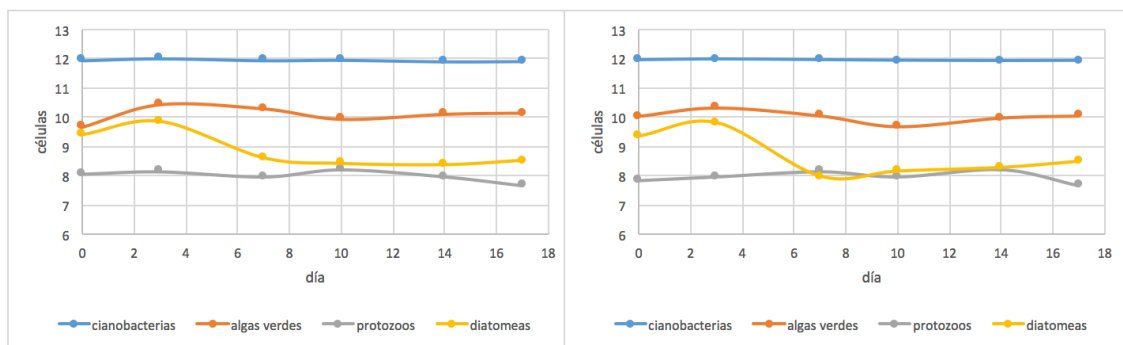


Figura 57: a) Evolución de los microorganismos en P3 y b) Evolución de los microorganismos en P4

El comportamiento en la evolución de algas verdes, protozoos y diatomeas fue similar en los dos reactores como se observa en el gráfico. Durante los primeros 3 días la cantidad de algas verdes y la de diatomeas fue similar, pero a partir del tercer día la presencia de diatomeas se redujo hasta valores similares a las de los protozoos.

En las figuras 58 y 60 se puede observar la evolución de la diversidad microbiana mediante imágenes obtenidas con el microscopio y en las figuras 59 y 61 la evolución del contenido de los reactores a lo largo del experimento.

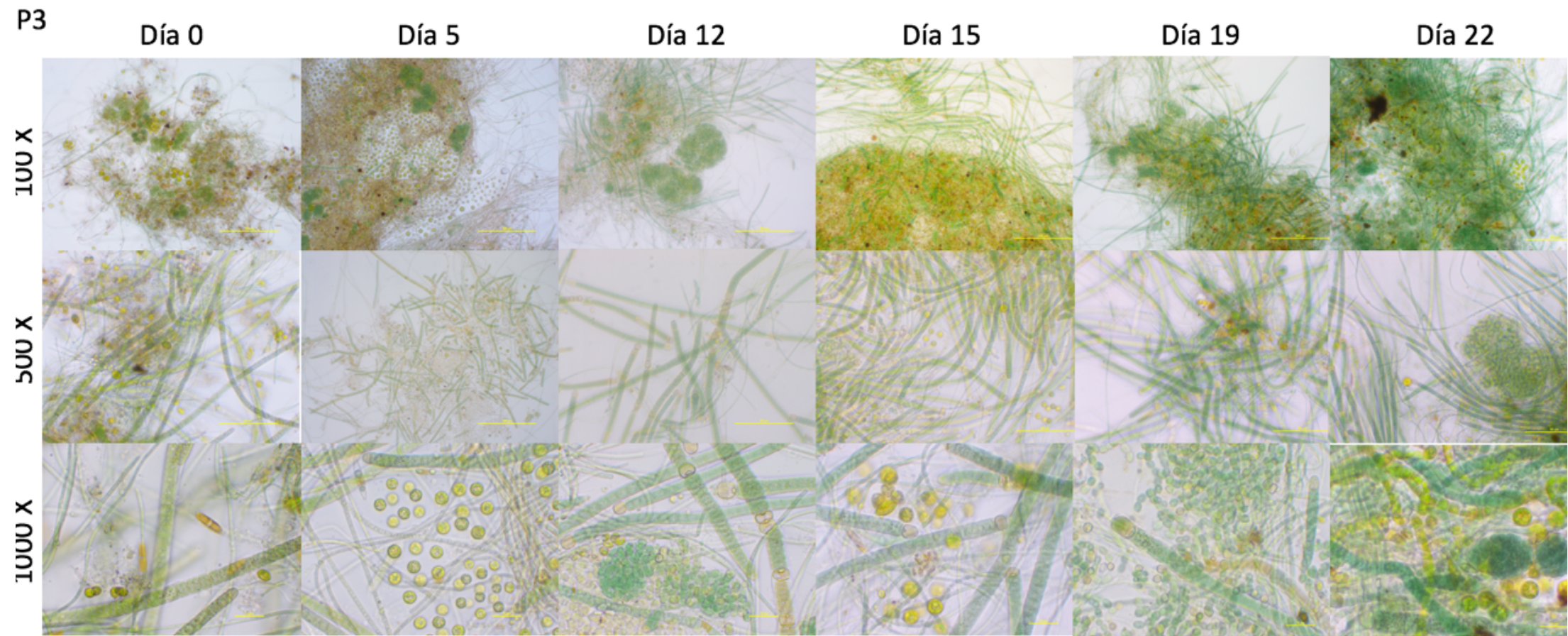


Figura 58: Evolución de la población de cianobacterias en P3

En el reactor P3 (figura 58) el cultivo inicial estaba formado por *Oscillatoria* sp. en gran cantidad y una pequeña presencia de *Pseudanabaena* sp., características similares a las del reactor R3 que es de donde procedía la biomasa inicial. Con el paso de los días se detectó el aumento de la presencia de *Rivularia* sp., en mayor cantidad, y de *Tolypothrix* sp. Las cianobacterias esféricas también estuvieron presentes, tanto *Aphanocapsa* sp. como *Chroococcus* sp. Su presencia también aumentó con la evolución del ensayo. Referente a la especie *Nostoc* sp., cabe decir que en los primeros días se detectó formando agregaciones pero que estas se fueron disgregando con el tiempo. Las *Oscillatoria* sp. junto a la *Rivularia* sp., fueron las especies que dominaron el cultivo.

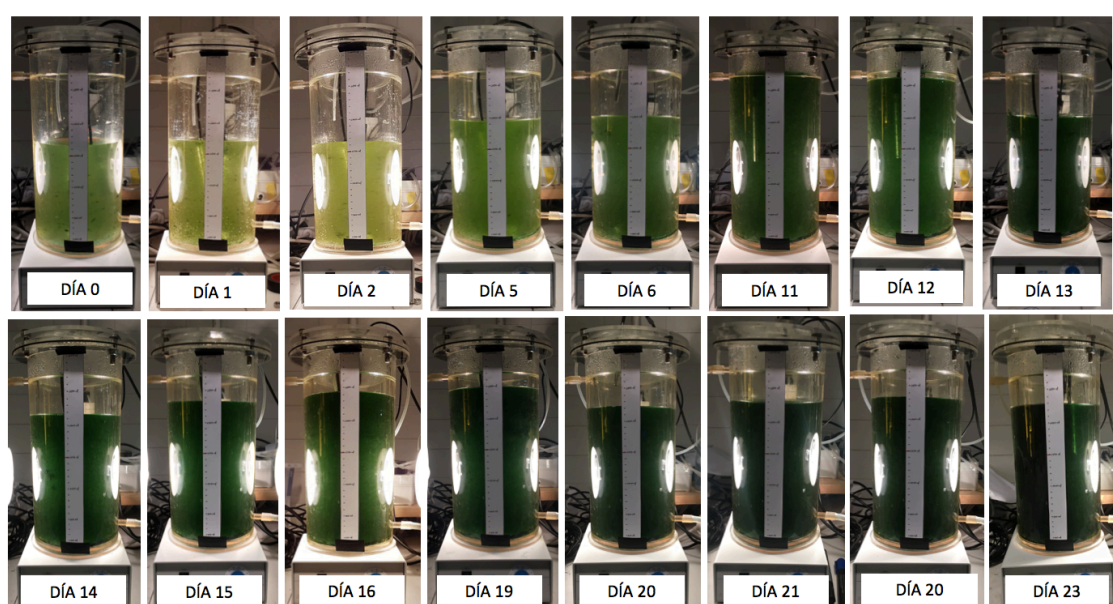


Figura 59: Evolución del color del licor mezcla en P3

En el caso del reactor P3 (figura 59) y a pesar de haber una limitación de nutrientes, no se produjo la clorosis. Pero a pesar de que el reactor en los últimos días continúa viéndose de color verdoso, no alcanza los colores verdes intensos de los reactores del bloque 1.

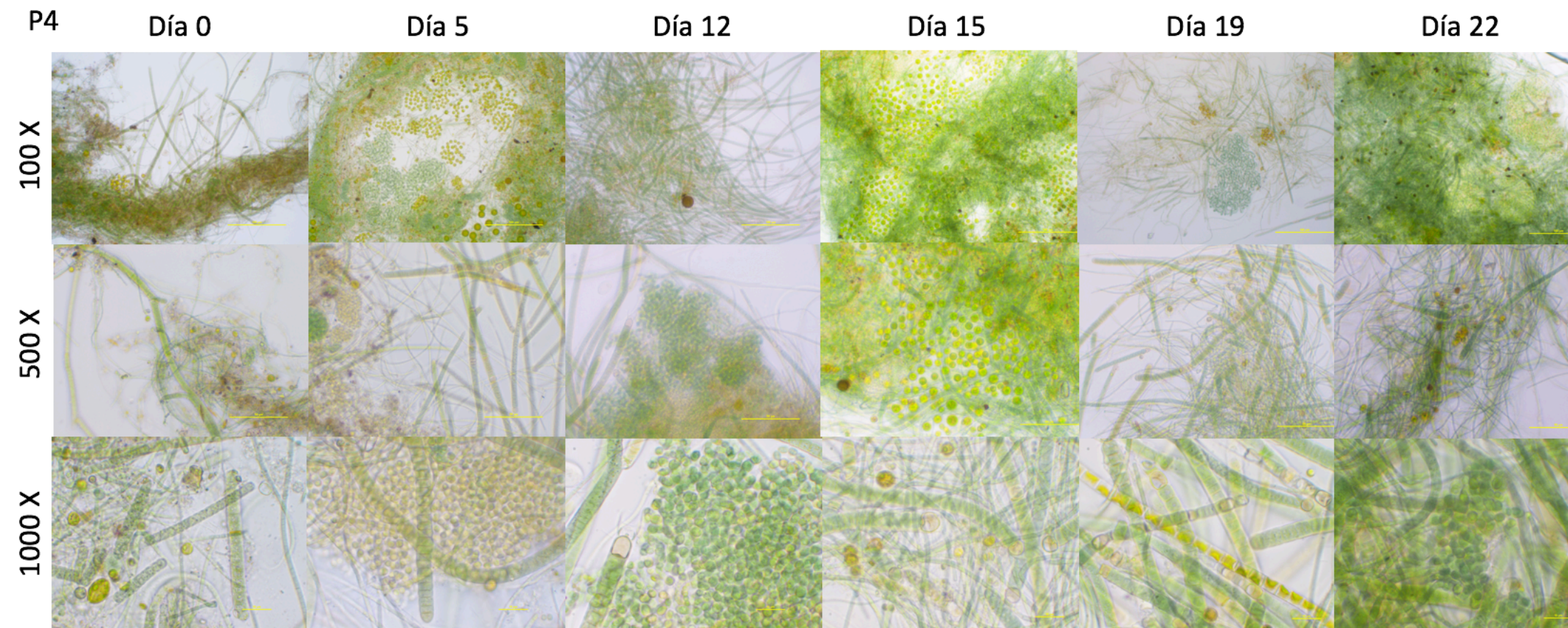


Figura 60: Evolución de la población de cianobacterias en P4

El cultivo inicial de P4 (figura 60) presentaba las mismas características que P3 ya que la biomasa procedía del mismo reactor, el R3 pero con el paso de los días la dinámica de las cianobacterias cambió. La presencia de cianobacterias filamentosas aumentó más que en el reactor P3, siendo *Rivularia* sp. y *Tolypothrix* sp. las especies predominantes por encima de *Oscillatoria* sp. y *Pseudanabaena* sp. Referente a las cianobacterias individuales, se detectó más cantidad de *Aphanocapsa* sp. que de *Chroococcus* sp. Ambas especies se encontraron formando flóculos. En este reactor cabe destacar la gran presencia de algas verdes.

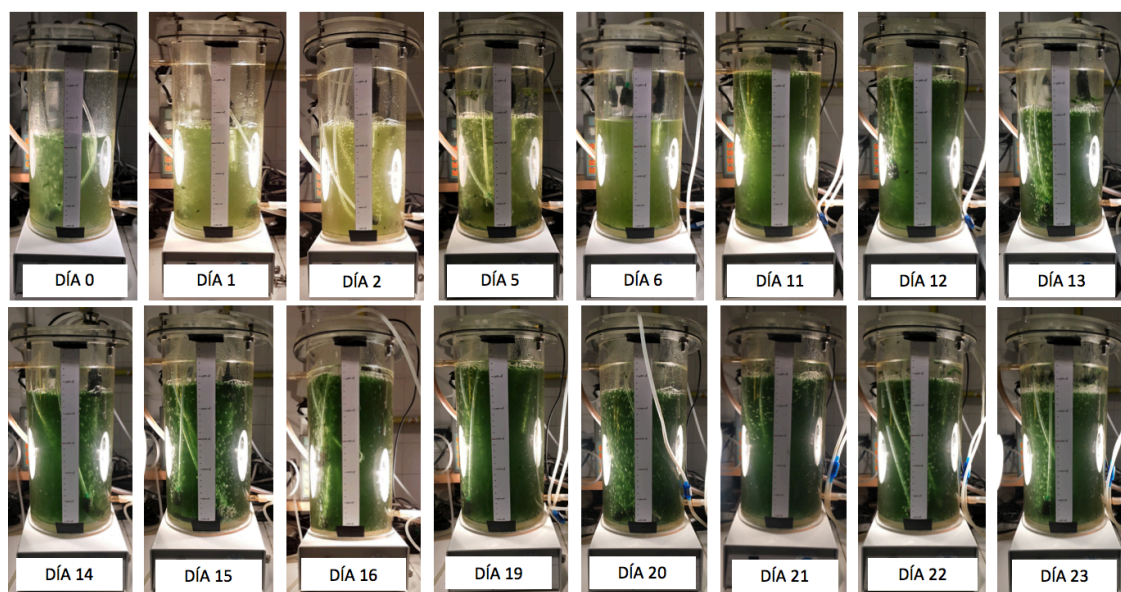


Figura 61: Evolución del color del licor mezcla en P4

Igual que en el reactor P3 y a diferencia de los casos P1 y P2, no se produjo clorosis observable con las fotografías del reactor (figura 61). El color verde poco intenso del principio del cultivo pasó por una fase amarillenta en los tres primeros días, pero luego se recuperó el color verde característico y cada vez se volvió más oscuro e intenso.

### 7.2.3. Experimento P5 y P6

#### 7.2.3.1. Evolución pH y oxígeno disuelto

En esta parte del bloque 2 se experimentó y se observó una gran diferencia en la presencia de oxígeno disuelto en ambos reactores siendo siempre el P5 el que más cantidad de OD tuvo.

En el reactor P5 (figura 62) la cantidad de OD disminuyó de 16,76 mg/L a 11,86 mg/L en los primeros 10 días. A partir de ese momento la cantidad de OD volvió a aumentar hasta los 18 mg/L quedándose a los 13,51 mg/L en el último día. Respecto al reactor P6, la cantidad de oxígeno disuelto disminuyó progresivamente de los 11,03 mg/L a los 7,93 mg/L.

En el caso del pH, al estar regulado mediante el pHmetro y las bombas de ácido, los valores fueron más o menos estables manteniéndose siempre en un rango de entre 6,7 y 7,5 en ambos reactores, rango más amplio que en los casos anteriores.

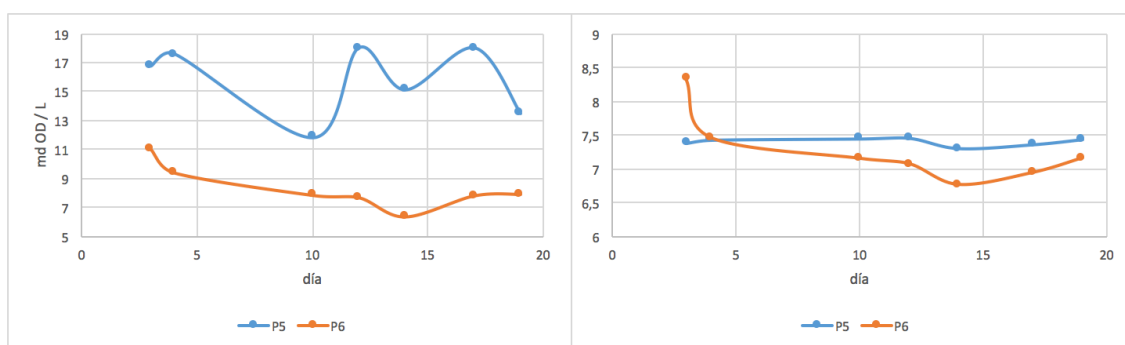


Figura 62: a) Evolución del OD en P5 y P6 y b) Evolución del pH en P5 y P6

#### 7.2.3.2. Evolución sólidos suspendidos volátiles

La biomasa en los reactores P5 y P6 (figura 63) aumentó en ambos reactores durante los 21 días que duró el ensayo obteniéndose valores de SSV iniciales y finales similares. Mientras que los sólidos en el reactor P5 aumentaron de una forma más o menos lineal de 0,3 mg SSV/L a 0,66 mg SSV/L, los sólidos en P6 aumentaron de un modo más parabólico. El aumento fue de 0,31 mg SSV/L a 0,62 mg SSV/L.

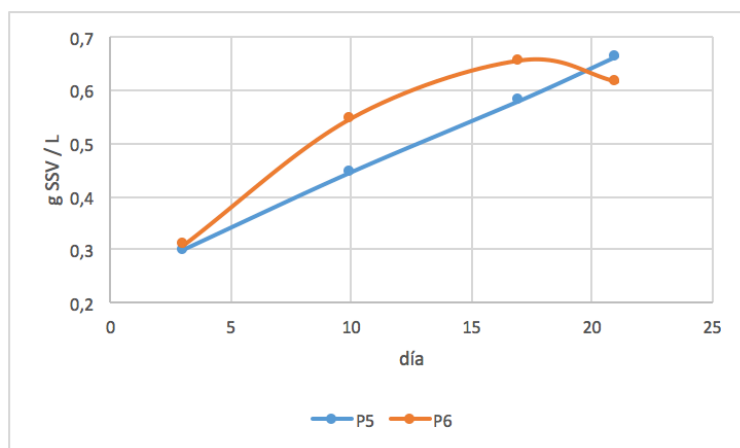


Figura 63: Evolución de los SSV en P5 y P6

### 7.2.3.3. Consumo de carbono inorgánico total

Igual que en los otros experimentos del bloque 2, la gráfica de evolución del carbono inorgánico total en P5 y P6 (figura 64) tiene forma de sierra debido a la adición de  $\text{NaHCO}_3$  periódica de a cada reactor como fuente de carbono inorgánico soluble. Los valores bajos son los que representan el carbónico inorgánico (CI) presente en el reactor y los valores altos equivalen a los valores de CI más la cantidad de carbono añadido periódicamente.

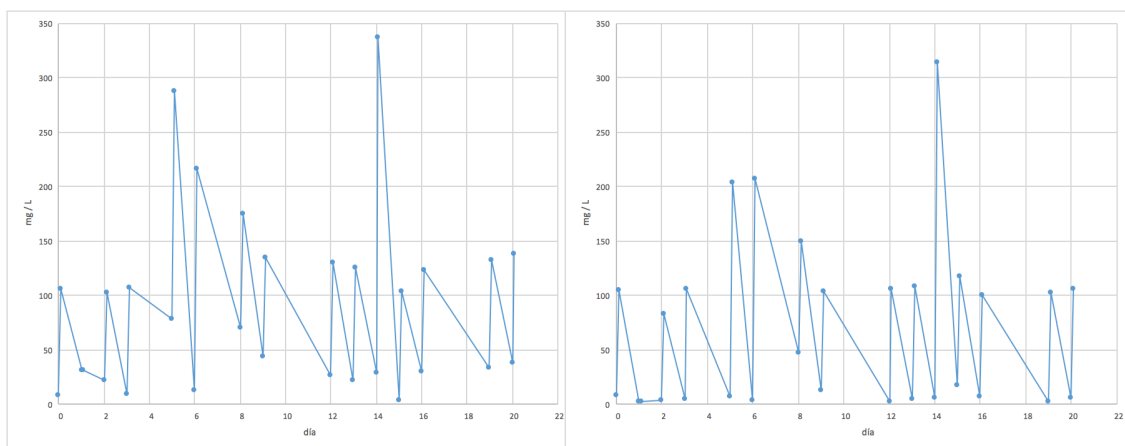


Figura 64: Evolución del TIC en P5 y P6

Igual que en los otros reactores del bloque 2, dónde se consume más carbono inorgánico por parte de los microorganismos es en el reactor en el que hay limitación de fósforo, el reactor P6.



### 7.2.3.4. Producción de carbohidratos y PHB

La producción de carbohidratos en P5 y P6 se comportó de forma similar en ambos reactores (figura 65). En los dos reactores se partió de una producción inicial del 15% que aumentó con el paso de los días hasta valores del 40,86% en P5 y del 49,38% en P6, momento de máxima producción. A partir de este momento se observó una disminución en la producción. Los valores bajaron a 26,21% en P5 y a 22,83% en P6 en el día 12 de ensayo. En los dos siguientes días la producción volvió a aumentar pero a partir del día 14, la producción disminuyó obteniendo unos valores finales parecidos alrededor del 21% en los dos reactores.

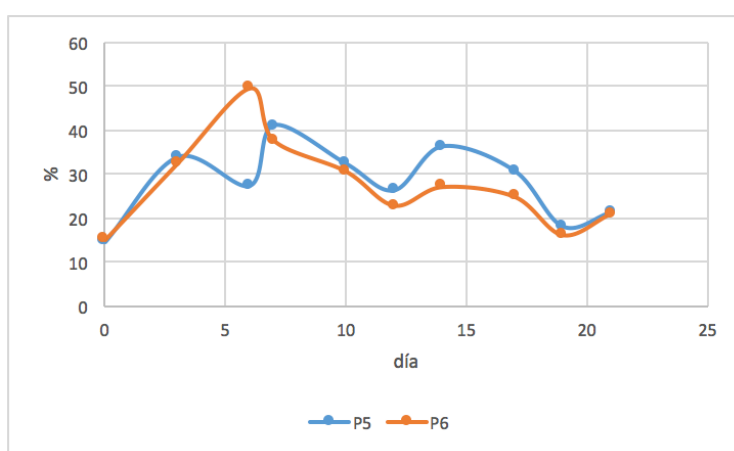


Figura 65: Producción de carbohidratos en P5 y P6

A diferencia de los reactores P3 y P4, en este caso sí que se consiguió producir PHB, aunque en cantidades inferiores comparadas con las obtenidas en P1 y P2 (figura 66). La producción continuada de PHB se detectó a partir del día 6 de ensayo. En este día fue el de máxima producción en P5 con un valor del 1,34%. El día máximo de producción en P6 fue el doceavo con un valor del 1,48%. A partir de estos días de producción máxima la cantidad de PHB empezó a disminuir de forma oscilatoria hasta el último día de ensayo en el que se consiguió una producción del 0,83% en P5 y 0,89% en P6, valores muy similares.

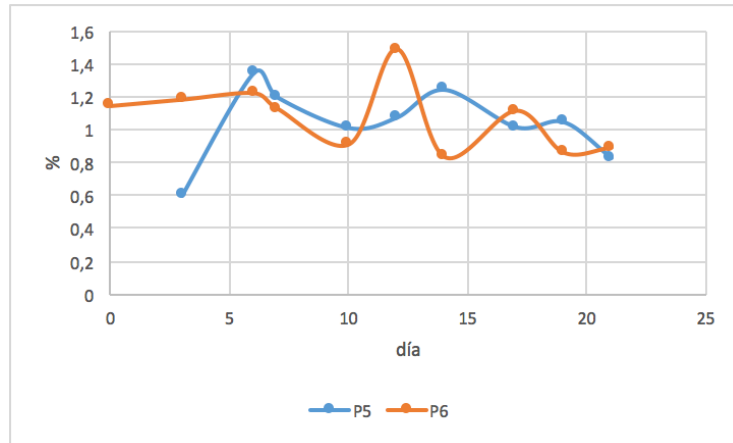


Figura 66: Producción de PHB en P5 y P6

### 7.2.3.5. Evolución y recuento de microorganismos

Durante el transcurso de los experimentos la cantidad de cianobacterias varió muy poco (figura 67). Este valor se encontró alrededor de las  $8,25 \cdot 10^{11}$  células/mL en P5 y  $2,72 \cdot 10^{11}$  células/mL en P6.

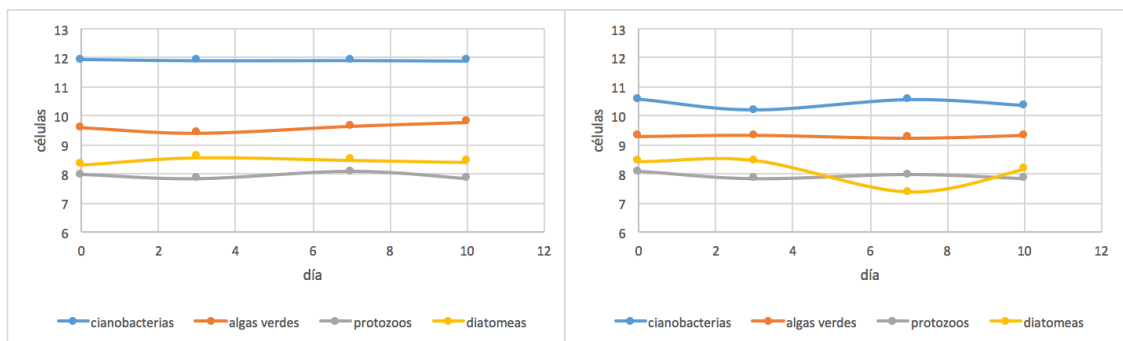


Figura 67: a) Evolución de los microorganismos en P5 y b) Evolución de los microorganismos en P6

En el R5 el comportamiento en la evolución de algas verdes, protozoos y diatomeas fue similar. Los valores de algas verdes oscilaron alrededor de los  $4,34 \cdot 10^9$  células/mL, los de protozoos alrededor de  $9,02 \cdot 10^7$  células/mL y los de diatomeas alrededor de los  $2,95 \cdot 10^8$  células/mL.

Respecto al R6, la cantidad de algas verdes presentes en el reactor se mantuvo con valores cercanos a  $1,97 \cdot 10^9$  células/mL, los protozoos también se mantuvieron con valores alrededor de  $9,02 \cdot 10^7$  células/mL y las diatomeas disminuyeron a partir de los 3 días de ensayo y terminaron con valores similares a los de los protozoos.

En las figuras 68 y 70 se puede observar la evolución de la diversidad microbiana mediante imágenes obtenidas con el microscopio y en las figuras 69 y 71 la evolución del contenido de los reactores a lo largo del experimento.

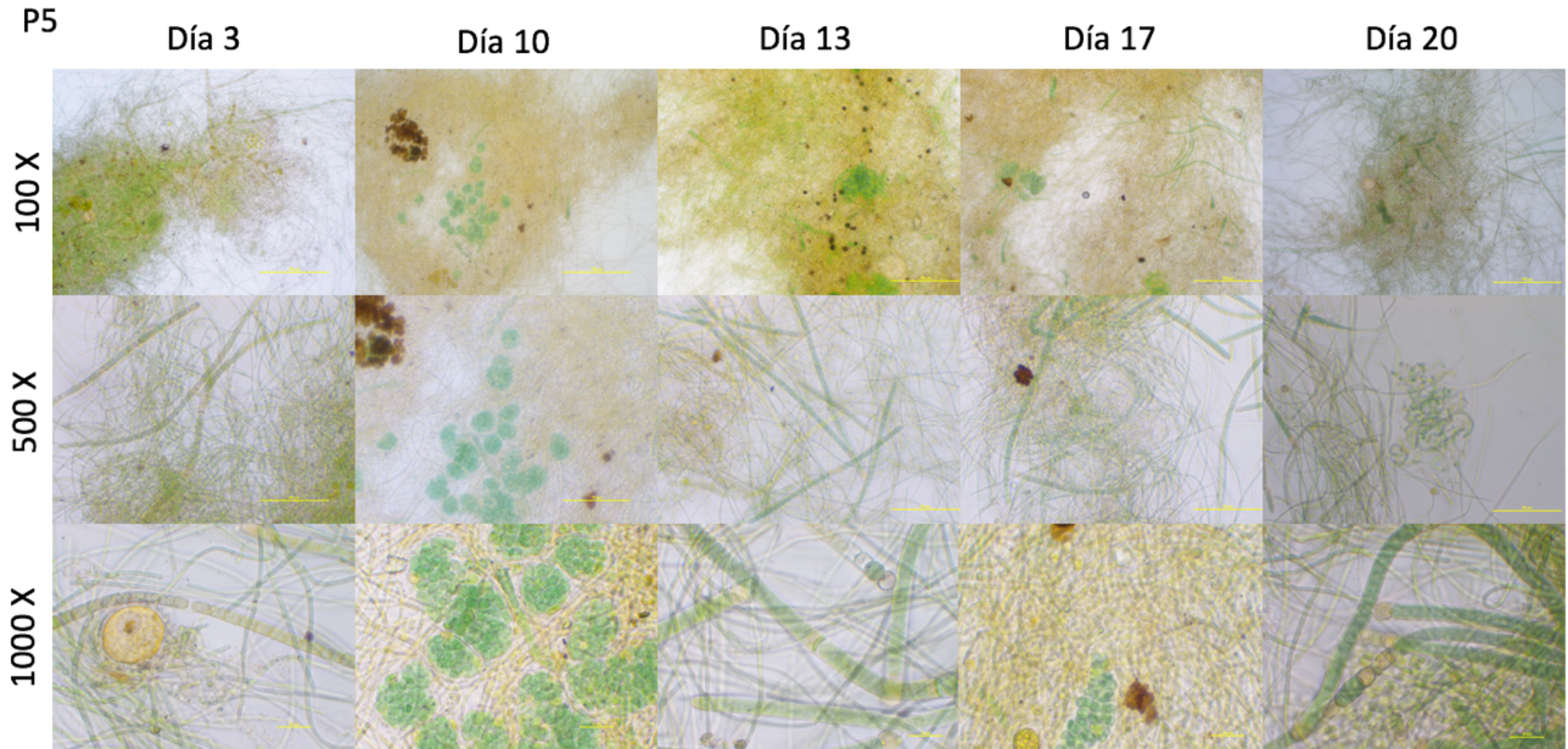


Figura 68: Evolución de la población de cianobacterias en P5

Durante el inicio del cultivo de P5 (figura 68) las cianobacterias filamentosas se encontraban formando flocs muy densos, tanto de *Oscillatoria* sp. como de *Pseudanabaena* sp. Con el paso de los días la cantidad de *Oscillatoria* sp. disminuyó pero aumentó la presencia de *Tolypothrix* sp. y *Rivularia* sp. Estas dos, junto a las *Pseudanabaena* sp., fueron las especies de filamentosas que dominaron el cultivo. Las especies *Nostoc* sp. y *Aphanocapsa* sp. se encontraron tanto disgregadas como formando colonias de tamaño pequeño durante todo el tiempo. También se detectó la presencia de *Chroococcus* sp. aunque en menor cantidad. En los últimos días de experimento se detectaron agregaciones cada vez más densas de las especies filamentosas

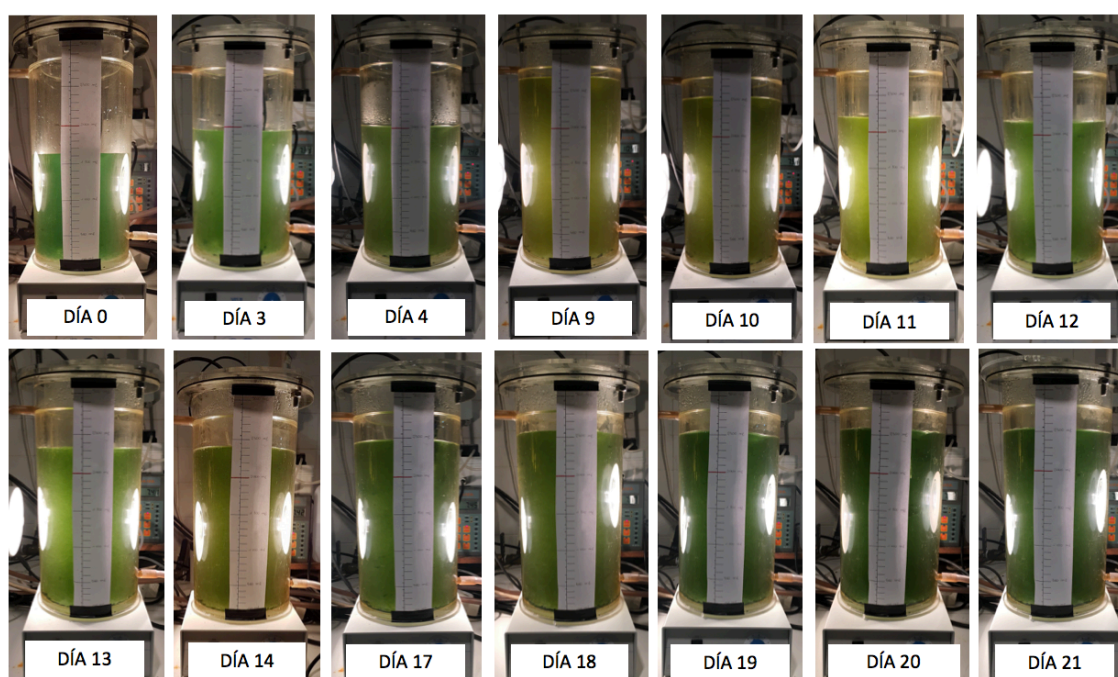


Figura 69: Evolución del color del licor mezcla en P5

A diferencia de los reactores P3 y P4 del caso anterior, en el P5 (figura 69) el color del medio de cultivo se mantuvo en un verde claro durante los primeros días incluso con tonos amarillentos. No fue hasta a mediados del experimento que el color verde no se intensificó.

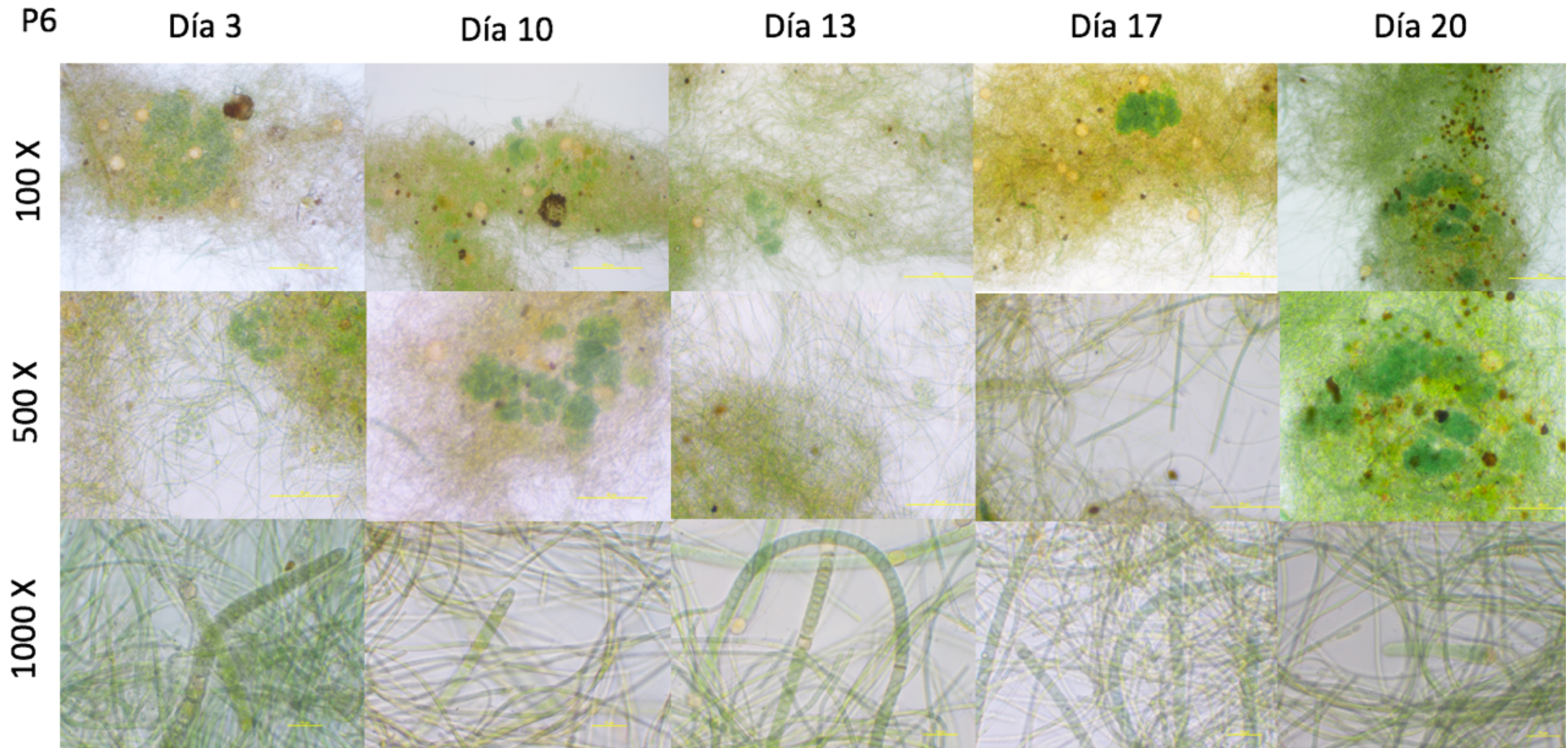


Figura 70: Evolución de la población de cianobacterias en P6

A diferencia del cultivo inicial de P5, en P6 (figura 70) no se detectó *Oscillatoria* sp. Las cianobacterias filamentosas presentes en el cultivo fueron *Tolypothrix* sp., *Rivularia* sp. y, en mayor cantidad, *Pseudanabaena* sp. Con el tiempo, se produjo un aumento de la presencia de éstas. Como en todos los casos anteriores el *Nostoc* sp. estuvo presente tanto de forma individual como formando flóculos que aumentaron con el tiempo. Con el paso de los días se observó como las especies filamentosas formaban agregados cada vez más densos y de mayor tamaño.

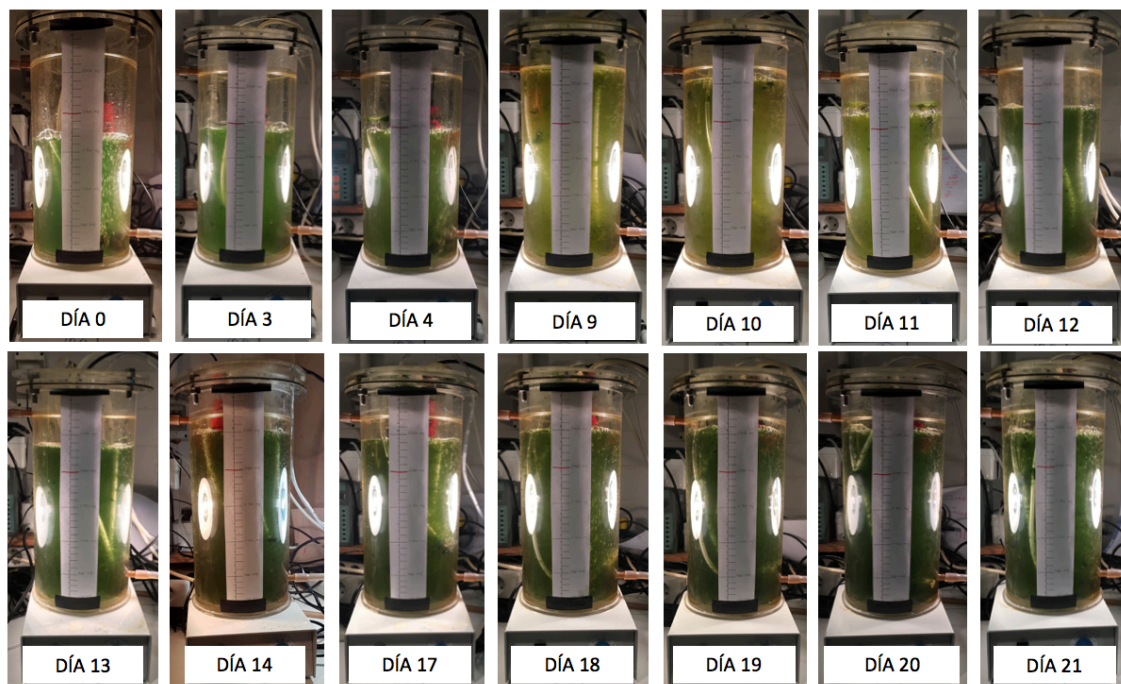


Figura 71: Evolución del color del licor mezcla en P6

Igual que en el caso anterior del P5, en P6 (figura 71) el color del medio de cultivo se mantuvo en un verde claro durante los primeros días incluso con tonos amarillentos. No fue hasta a mediados del experimento, pero más pronto que en P5, que el color verde no oscureció.

## 8. Discusión

### 8.1. Bloque 1

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos del bloque 1 se puede decir que se produce un proceso de tratamiento de aguas residuales. La concentración de nitrógeno total, nutriente que procede de estas aguas, fue inferior en el medio de cultivo que en el efluente. Eso significa que las cianobacterias consumieron este nitrógeno y que, por lo tanto, su presencia en el cultivo disminuyó. La tasa más elevada de eliminación de nitrógeno se produjo en los reactores R1 y R2. En cambio, en R3 y R4, aunque al principio sí que se consiguió reducir la concentración de nitrógeno, en los últimos días los valores de este nutriente fueron casi iguales a los del efluente.

Para el caso del fósforo, otro nutriente presente en las aguas residuales, su eliminación fue menor y mucho menos estable. A pesar de que las cianobacterias consumieron este fósforo, sus valores de eliminación fueron inferiores comparados con los de eliminación del nitrógeno. De todos los reactores, en los que se consiguió un mejor resultado fue en R1 y R2.

En el caso del TOC, el carbono orgánico total, se consiguió su asimilación en los reactores R1 y R2 hasta el día 22 de ensayo y a partir de ese día deja de ser asimilado. En cambio, en R3 y R4 la cantidad de TOC nunca fue inferior a la de la entrada. En ese caso su asimilación no fue posible, las cianobacterias no consumieron el carbono orgánico.

La concentración de sólidos suspendidos volátiles, que nos indica la cantidad de materia orgánica presente, muestra que el crecimiento de los microorganismos fue mayor en R1, seguido por R3 y R1. En R4 fue donde menos crecimiento se consiguió e incluso su presencia disminuyó con el tiempo.

Respecto a la producción de polímeros se puede decir que la mayor producción de carbohidratos se consigue en los reactores R1 y R2, reactores en los que había limitación de nitrógeno en el medio ya que se usó un medio sintético sin nitrógeno. En cambio, en los reactores R3 y R4, donde sí que había nitrógeno en el medio, la producción de carbohidratos se redujo con el tiempo. Referente a la producción de PHB, en los cuatro reactores no se consiguió que su producción aumentara. A pesar de haber detectado PHB en los cultivos, su presencia disminuyó e incluso fue nula en los



reactores R3 y R4. Esta presencia inicial de PHB en los cultivos puede ser procedente de las cianobacterias procedentes del PBR usado como stock de biomasa. Respecto a los tiempos de retención hidráulica (TRH) se puede decir que los más elevados favorecieron más la producción de polímeros. Esta mayor acumulación de carbohidratos que de PHB también se observó en los estudios de Arias *et al.* (2018) y Monshupanee e Incharoensakdi (2014).

Finalmente, respecto a la evolución de las cianobacterias del cultivo se puede decir que se comportó de forma similar entre R1 y R2. El cultivo estuvo formado principalmente por cianobacterias filamentosas de la familia de las *Pseudanabaena* sp. formando flóculos y también por cianobacterias esféricas tanto agregadas como individuales. Se destaca que en R2 las agregaciones de cianobacterias se volvieron cada vez más densas y homogéneas por todo el cultivo. En cambio, en R1 el medio cada vez se volvió más heterogéneo con los flóculos de cianobacterias cada vez más agregados entre ellos.

El cultivo de los reactores R3 y R4 también estuvieron formados por cianobacterias filamentosas pero en ese caso fueron las *Oscillatoria* sp. las más abundantes. A diferencia de los reactores R1 y R2, en R3 y R4 se detectó la presencia de otra filamentosas, la *Rivularia* sp. Referente a las cianobacterias filamentosas, estuvieron presentes de forma similar en ambos cultivos.

## 8.2. Bloque 2

Con los resultados obtenidos en los experimentos del bloque 2 se puede decir que se consigue el objetivo.

Respecto a la cantidad de sólidos suspendidos volátiles se puede decir en los seis reactores se consiguió el crecimiento de microorganismos y, por lo tanto, el de cianobacterias que serían capaces de acumular polímeros. La excepción se encuentra en los reactores P1 y P2, que a pesar de producirse un aumento de los SSV en los primeros días, a partir del día 14, su concentración disminuyó. No se observa gran diferencia en el crecimiento de microorganismos entre los reactores donde hubo limitación de nitrógeno y en los que hubo limitación de fósforo.

La concentración de TIC se determinó para saber la cantidad de carbono añadido que estaban consumiendo las cianobacterias. Éste se les añadió para proporcionar suficiente carbono al cultivo para ser transformado en PHB o carbohidratos. En los reactores en los que se consumió más

carbono inorgánico y, por lo tanto, en los que se podría esperar más producción de polímeros fueron P2, P4 y P6, reactores donde hubo limitación de fósforo.

Referente a la producción de carbohidratos sí que se cumple lo dicho anteriormente. En los reactores donde más consumo de TIC hubo, fue en los que más cantidad de carbohidratos se produjeron comparados con los reactores de su mismo experimento. Es decir, en P2 hubo más producción que en P1, en P4 hubo más producción que en P3 y en P6 hubo más producción que en P5. Estos reactores con más producción corresponden a aquellos que estuvieron limitados por fósforo.

Para la producción de PHB se sigue el mismo patrón de producción en P1 y P2. Fue el reactor P2, donde hubo limitación de fósforo, el que más cantidad de PHB se detectó. En P3 y P4 la producción de PHB fue casi nula o nula a partir del día 16 de experimento. Esto puede ser debido a que la biomasa procedente del reactor R3 no fue la adecuada para la producción de PHB. De hecho, en el reactor R3, de donde procede la biomasa, tampoco hubo producción de PHB. En P5 y P6 sí que se observó producción de PHB a pesar de haber usado como inóculo la biomasa del reactor R4 donde tampoco se produjo este polímero. Entre los dos reactores la producción de PHB fue muy similar.

Finalmente, en cuanto a la evolución de la población de cianobacterias se puede decir que la gran diferencia entre los experimentos del bloque 1 es que en los del bloque 2 se detectó por primera vez la presencia de *Tolypothrix* sp., una cianobacteria filamentosa con heterociste capaz de fijar nitrógeno, y la poca presencia de *Oscillatoria* sp, cianobacterias sin heterociste.

En los reactores P1 y P2 se detectó una gran presencia de *Pseudanabaena* sp. y una gran cantidad de *Nostoc* sp. En cambio, en P3 y P4 las especies dominantes fueron *Rivularia* sp. y *Tolypothrix* sp. En P5 y P6 volvieron a ser las *Pseudanabaena* sp. las dominantes del cultivo. Entre los reactores con limitación de nitrógeno y con limitación de fósforo cabe destacar que en los que hubo limitación de fósforo se detectó más presencia de *Aphanocapsa* sp.

Haciendo una revisión de las poblaciones cianobacterianas de todos los reactores se podría decir que la presencia de *Aphanocapsa* sp. fue superior en los reactores con limitación de fósforo, las especies *Rivularia* sp. y *Tolypothrix* sp sólo se observaron en medio sintético, la especie *Oscillatoria* sp. es fue abundante en cultivos con agua residual y la especie *Pseudanabaena* sp. fue mayoritaria en los reactores con limitación de fósforo y menor en los cultivos con limitación de nitrógeno.

## 9. Conclusiones

Del trabajo realizado y los resultados obtenidos en este proyecto se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- Se consigue un proceso de tratamiento de aguas residuales con una mayor eficacia en la eliminación de nitrógeno.
- En los procesos de tratamiento también se puede conseguir la producción de polímeros siempre y cuando haya limitación de nutrientes en el cultivo.
- El modo de operación de los reactores influye en la producción de polímeros. El reactor operado a mayor tiempo de retención (TRH=10d) produjo más cantidad de carbohidratos y PHB.
- Con limitación de fósforo se consiguen valores superiores en la producción de carbohidratos y PHB respecto a la limitación de nitrógeno.
- La adición de carbono inorgánico favorece la acumulación de polímeros.
- La limitación del nitrógeno y fósforo puede causar clorosis en el cultivo de cianobacterias.
- La procedencia de la biomasa influye en la evolución de la población cianobacteriana.
- La limitación del nitrógeno y fósforo influye en la evolución de la población cianobacteriana y, a la vez, esta población influye en la producción de polímeros.

## 10. Recomendaciones futuras

Para trabajos futuros es recomendable continuar investigando en cuáles son aquellas condiciones en las que se consiguen mayores cantidades de polímeros. Con los resultados del presente estudio se llega a la conclusión de que es en ausencia de fósforo cuando se consigue una mayor producción. Por ese motivo, se puede continuar investigando en qué condiciones con ausencia de este nutriente se consigue mayor producción de carbohidratos y PHB. Se podría realizar modificando el modo de operación, cambiando los tiempos de retención hidráulica, la alimentación...

También sería interesante estudiar cómo conseguir una mayor producción de PHB en general ya que en los experimentos realizados se consiguen unas producciones muy bajas, inferiores al 5%.

Para el estudio de las poblaciones de cianobacterias es recomendable antes de empezar las observaciones microscópicas saber cuáles son aquellas especies que se pueden encontrar y tener un amplio conocimiento para facilitar la detección de las especies durante las observaciones.

## Bibliografía

ABED, R.M.M., DOBRETSOV, S. y SUDESH, K., 2009. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* [en línea], vol. 106, no. 1, pp. 1-12. ISSN 13645072. DOI 10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19191979>.

AIKAWA, S., HO, S.H., NAKANISHI, A., CHANG, J.S., HASUNUMA, T. y KONDO, A., 2015. Improving polyglucan production in cyanobacteria and microalgae via cultivation design and metabolic engineering. *Biotechnology Journal*, vol. 10, no. 6, pp. 886-898. ISSN 18607314. DOI 10.1002/biot.201400344.

AIKAWA, S., NISHIDA, A., HO, S.H., CHANG, J.S., HASUNUMA, T. y KONDO, A., 2014. Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. *Biotechnology for Biofuels*, vol. 7, no. 1, pp. 3-5. ISSN 17546834. DOI 10.1186/1754-6834-7-88.

APHA/AWWA/WEF, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Stand. Methods* [en línea]. Disponible en: [https://www.mwa.co.th/download/file\\_upload/SMWW\\_1000-3000.pdf](https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf).

ARIAS, D.M., UGGETTI, E., GARCÍA-GALÁN, M.J. y GARCÍA, J., 2017. Cultivation and selection of cyanobacteria in a closed photobioreactor used for secondary effluent and digestate treatment. *Science of the Total Environment* [en línea], vol. 587-588, pp. 157-167. ISSN 18791026. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.02.097. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.097>.

ARIAS, D.M., UGGETTI, E., GARCÍA-GALÁN, M.J. y GARCÍA, J., 2018. Production of polyhydroxybutyrates and carbohydrates in a mixed cyanobacterial culture: Effect of nutrients limitation and photoperiods. *New Biotechnology* [en línea], vol. 42, pp. 1-11. ISSN 1871-6784. DOI 10.1016/J.NBT.2018.01.001. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871678417303321>.

BALAJI, S., GOPI, K. y MUTHUVELAN, B., 2013. A review on production of poly  $\beta$  hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *ALGAL* [en línea], vol. 2, pp. 278-285. DOI 10.1016/j.algal.2013.03.002. Disponible en: <http://projeuni.ir/wp-content/uploads/2013/11/1-s2.0-S2hdxgfx2119gfdgf26413000465-gcvgnmain.pdf>.

CIRÉS GOMEZ, S. y QUESADA DEL CORRAL, A., 2011. *Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas*. S.l.: Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. ISBN 9788449110726.

DROSG, B; FRITZ, I.; GATTERMAYR, F.; SILVESTRINI, L., 2015. Photo-autotrophic Production of Poly(hydroxyalkanoates) in Cyanobacteria. *Chem. Biochem. Eng. Q - Universität für Bodenkultur (Tulln, Austria)* [en línea], vol. 29, no. 2, pp. 145-156. DOI 10.15255/CABEQ.2014.2254. Disponible en: [http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29\\_2\\_2015/Cabeq 2015-02-web Drosg.pdf](http://pierre.fkit.hr/hdki/cabeq/pdf/29_2_2015/Cabeq%2015-02-web%20Drosg.pdf).

HALL, D.O., MARKOV S.A., W.Y. y R.K.K., 1995. The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynthesis Research*, vol. 46, pp. 159-167.

KHAJEPOUR, F., HOSSEINI, S.A., GHORBANI NASRABADI, R. y MARKOU, G., 2015. Effect of Light Intensity and Photoperiod on Growth and Biochemical Composition of a Local Isolate of *Nostoc calcicola*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 176, no. 8, pp. 2279-2289. ISSN 15590291. DOI 10.1007/s12010-015-1717-9.

LAU, N.-S., MATSUI, M. y ABDULLAH, A.A.-A., 2015. Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *BioMed research international* [en línea], vol. 2015, pp. 754934. ISSN 2314-6141. DOI 10.1155/2015/754934. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26199945>.

MARÍA LUÍSA PELEATO SÁNCHEZ, 2011. *Las cianobacterias: cooperación versus competencia*. 2011. Zaragoza: Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza.

MONSHUPANEE, T. y INCHAROENSAKDI, A., 2014. Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the

cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 116, no. 4, pp. 830-838. ISSN 13652672. DOI 10.1111/jam.12409.

MUR, L.R., SKULBERG, O.M. y UTKILEN, H., 1999. Chapter 2. Cyanobacteria in the environment. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, pp. 30. ISSN 0921-8971. DOI 10.1016/j.ecoleng.2012.12.089.

NOZZI, N.E., OLIVER, J.W.K. y ATSUMI, S., 2013. Cyanobacteria as a Platform for Biofuel Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [en línea], vol. 1, no. September, pp. 1-6. ISSN 2296-4185. DOI 10.3389/fbioe.2013.00007. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2013.00007/abstract>.

PANDA, B., JAIN, P., SHARMA, L. y MALLICK, N., 2006. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*, vol. 97, no. 11, pp. 1296-1301. ISSN 09608524. DOI 10.1016/j.biortech.2005.05.013.

STREBLE, HEINZ; KRAUTER, D., 1987. *Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce*. Ediciones. Barcelona: Ediciones Omega, S.A. ISBN 84-282-0800-X.

TALUKDER, A.H., MAHMUD, S., LIRA, S.A. y AZIZ, A., 2015. Phycoremediation of Textile Industry Effluent by Cyanobacteria (*Nostoc muscorum* and *Anabaena variabilis*). *BioResearch Communications*, vol. 1, no. 2, pp. 124-127.

WHITTON, B.A. y POTTS, M., 2000. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. S.l.: Kluwer Academic. ISBN 9780792347552.