



**Generación de materia orgánica acoplada a la
eliminación de CO₂ por *Anabaena* sp. ATCC 33047
y su utilización para la remoción de cadmio.**

Memoria presentada por la licenciada **Marta Esteban Clares** para optar al
grado de Doctora en Biología por la Universidad de Sevilla

Directores:

Dr. Miguel García Guerrero

Dra. Mercedes García González

A mi familia

ÍNDICE

<u>I. INTRODUCCIÓN</u>	1
I.1. EL PROBLEMA DEL CO ₂	3
I.1.1. El calentamiento global	3
I.1.2. Mitigación de las emisiones de CO ₂	5
I.1.2.1. Tecnologías para la captura de CO ₂	6
I.1.2.2. Tecnologías para el almacenamiento de CO ₂	7
I.1.2.3. Mitigación del CO ₂ mediante la fotosíntesis	8
I.2. BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS	9
I.2.1. Aplicaciones de las microalgas	10
I.2.1.2. Producción de compuestos de interés	10
I.2.1.2.a. Exopolisacáridos	11
I.2.1.2.b. Pigmentos	12
I.2.1.2.c. Ácidos grasos	13
I.2.1.2.d. Compuestos con actividad biológica	13
I.2.1.2. Alimentación humana	14
I.2.1.3. Alimentación animal	14
I.2.1.4. Agricultura	15
I.2.1.5. Producción de biocombustibles	15
I.2.1.6. Biorremediación	16
I.2.2. Cultivo de microalgas a la intemperie	20
I.2.2.1. Sistemas abiertos	21
I.2.2.2. Sistemas cerrados y semicerrados	22
I.2.2.2.a. Reactor tubular	23
I.2.2.2.b. Reactor plano vertical	23
I.2.3. Factores que afectan a la productividad de los cultivos a la intemperie	24
I.2.4. Cosechado de la biomasa	26
I.3. LAS CIANOBACTERIAS	26
I.3.1. <i>Anabaena</i> sp. ATCC 33047	29
<u>II. OBJETIVOS</u>	31
<u>III. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	35
III.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO	37
III.2. CULTIVO EN FOTOQUIMIOSTATOS	39
III.3. CULTIVO A LA INTEMPERIE	41
III.3.1. Cultivo en estanque de 1m ²	41
III.3.2. Cultivo en fotobiorreactor tubular	42
III.3.3. Cultivo en reactor plano vertical	43

III.4. MÉTODOS Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS	45
III.4.1. Determinación de la concentración de biomasa	45
III.4.2. Determinación del carbono orgánico total	45
III.4.3. Determinación de componentes celulares	46
III.4.3.1. Determinación de carbohidratos	46
III.4.3.2. Determinación de proteínas	47
III.4.3.3. Extracción y determinación de lípidos	47
III.4.4. Determinación de la composición elemental	48
III.4.5. Determinación de la velocidad de sedimentación	50
III.4.6. Separación de la biomasa y el EPS	50
III.4.6.1. Tratamiento térmico	50
III.4.6.2. Agitación	51
III.4.7. Determinación de Cadmio	51
III.4.8. Reología de los cultivos	51
III.4.9. Ensayo de actividades enzimáticas	52
III.4.9.1. Ensayo de actividad nitrogenasa	52
III.4.9.2. Ensayo de actividad fotosintética	53
III.5. INMOVILIZACIÓN DE <i>Anabaena</i> EN SOPORTE DE POLIURETANO	53
III.6. MEDIDA DE IRRADIANCIA	54
III.7. CÁLCULOS	55
III.7.1. Velocidad específica de crecimiento	55
III.7.2. Productividad en cultivo continuo	55
III.7.3. Tasa de fijación de CO ₂	56
III.7.4. Productividad de un cultivo semicontinuo	56
III.7.5. Eficiencia fotosintética	56
IV. RESULTADOS	59
IV.1. CULTIVO CONTINUO DE <i>Anabaena</i> EN FOTOQUIMIOSTATO	61
IV.1.1. Cultivo continuo con ciclo simulado de irradiancia	61
IV.1.1.1. Efecto de la velocidad de dilución	61
IV.1.1.2. Efecto de la temperatura	67
IV.1.1.3. Efecto de la agitación	69
IV.1.1.4. Efecto del pH	70
IV.1.1.5. Composición del medio de cultivo	71
IV.1.1.5.a. Efecto de la concentración de fosfato	72
IV.1.1.5.b. Influencia de la concentración de cloruro	73
IV.1.1.5.c. Efecto de la concentración de bicarbonato	74
IV.1.1.6. Efecto de la irradiancia incidente	75
IV.1.2. Establecimiento de condiciones óptimas para la fijación de CO ₂	77

IV.1.3. Obtención de un modelo de crecimiento y producción de EPS en cultivos continuos de <i>Anabaena</i>	77
IV.1.3.1. Definición de un modelo de crecimiento en función de la velocidad de dilución y la irradiancia	77
IV.1.3.2. Definición de un modelo de acumulación de EPS en función de la velocidad de dilución y la irradiancia	79
IV.1.3.3. Definición de un modelo de crecimiento en función de la temperatura	81
IV.1.3.4. Obtención de un modelo de acumulación de EPS en función de la temperatura	82
IV.1.3.5. Simulación del comportamiento de <i>Anabaena</i> en cultivo continuo	83
IV.1.4. Rendimiento al exterior de cultivos continuos de <i>Anabaena</i> en fotoquimiostato	84
IV.1.5. Viscosidad de los cultivos de <i>Anabaena</i> en fotoquimiostato	85
IV.2. CULTIVO DE <i>Anabaena</i> sp. ATCC 33047 AL EXTERIOR	88
IV.2.1. Cultivo de <i>Anabaena</i> en estanque abierto	88
IV.2.2. Cultivo de <i>Anabaena</i> en reactor tubular	92
IV.2.3. Cultivo de <i>Anabaena</i> en reactor plano vertical	96
IV.3. ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICA Y NITROGENASA DE <i>Anabaena</i> DURANTE EL CICLO DIARIO	101
IV.3.1. Actividades fotosintética y nitrogenasa en cultivos continuos en fotoquimiostato	101
IV.3.2. Actividades fotosintética y nitrogenasa en cultivos en RPV	103
IV.4. SEDIMENTACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>Anabaena</i>	104
IV.5. SEPARACIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO GENERADO POR <i>Anabaena</i>	106
IV.5.1. Tratamiento térmico	106
IV.5.2. Agitación	107
IV.6. REMOCIÓN DE Cd ⁺² POR <i>Anabaena</i> EN UN SISTEMA INMOVILIZADO	107
IV.6.1. Inmovilización de <i>Anabaena</i>	108
IV.6.1.1. Selección y preparación del soporte	108
IV.6.1.2. Efecto de la densidad celular inicial sobre la inmovilización de <i>Anabaena</i>	112
IV.6.1.3. Efecto de la superficie total de soporte sobre la inmovilización de <i>Anabaena</i>	113
IV.6.2. Remoción de Cd ⁺² por <i>Anabaena</i> inmovilizada en esponja de poliuretano	115
<u>V. DISCUSIÓN</u>	121
V.1. GENERACIÓN DE BIOMASA Y FIJACIÓN DE CO ₂ POR <i>Anabaena</i>	123

V.1.1. Cultivos en fotoquimiostatos	123
V.1.2. Cultivos a la intemperie	130
V.1.3. Autofloculación de la biomasa de <i>Anabaena</i>	137
V.2. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO POR <i>Anabaena</i>	137
V.3. INMOVILIZACIÓN DE <i>Anabaena</i> EN SOPORTE DE POLIURETANO	143
V.4. RETENCIÓN DE CADMIO POR BIOMASA INMOVILIZADA DE <i>Anabaena</i>	145
<u>VI. CONCLUSIONES</u>	149
<u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u>	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emisiones de gases de efecto invernadero.	4
Figura 2. Emisiones globales de CO ₂ .	5
Figura 3. Imagen al microscopio óptico de <i>Anabaena</i> sp. ATCC 33047.	30
Figura 4. Cultivos de mantenimiento de <i>Anabaena</i> sp. ATCC 33047.	38
Figura 5. Instalación de fotoquimiostatos.	39
Figura 6. Esquema del fotoquimiostato empleado en los experimentos en continuo.	40
Figura 7. Cultivo en estanques. Estanques de 3 m ² y 1 m ² .	41
Figura 8. Fotobiorreactor tubular.	43
Figura 9. Reactor plano vertical.	44
Figura 10. Sistemas de cultivo para la inmovilización de <i>Anabaena</i> (A). Fragmentos de soporte con biomasa de <i>Anabaena</i> inmovilizada (B).	54
Figura 11. Efecto de la velocidad de dilución sobre la densidad celular de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	62
Figura 12. Efecto de la velocidad de dilución sobre el contenido en carbohidratos totales (negro) y en EPS (rojo) de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	63
Figura 13. Efecto de la velocidad de dilución sobre la relación biomasa/EPS en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	64
Figura 14. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	65
Figura 15. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de exopolisacárido en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	65
Figura 16. Influencia de la temperatura sobre la concentración de biomasa en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	67
Figura 17. Fotoquimiostatos con cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo, mantenidos a 35 °C (izquierda) ó 45 °C (derecha).	67
Figura 18. Influencia de la temperatura sobre la concentración de carbohidratos (negro) y EPS (rojo) en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	68
Figura 19. Efecto de la agitación sobre la productividad de biomasa (negro) y EPS (rojo) de cultivos de <i>Anabena</i> en régimen continuo.	69
Figura 20. Efecto del pH sobre la productividad de biomasa (negro) y EPS (rojo) de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	71
Figura 21. Influencia de la concentración de fosfato sobre la productividad de biomasa (negro) y EPS (rojo) de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	72

Figura 22. Influencia de la concentración de cloruro sódico sobre la productividad de biomasa (negro) y de EPS (rojo) de <i>Anabaena</i> en cultivo continuo.	74
Figura 23. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de biomasa y EPS de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	76
Figura 24. Relación entre la irradiancia promedio y la irradiancia incidente máxima del periodo iluminado para cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	78
Figura 25. Efecto de la irradiancia promedio sobre la tasa específica de crecimiento en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	79
Figura 26. Efecto de la velocidad de dilución sobre la tasa específica de la acumulación de EPS.	80
Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la tasa específica máxima de acumulación de EPS.	82
Figura 28. Influencia de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre productividad de biomasa en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	83
Figura 29. Influencia de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre productividad de EPS en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	83
Figura 30. Influencia de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre la tasa de fijación de CO ₂ en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	84
Figura 31. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo al exterior.	85
Figura 32. Influencia de la presencia de EPS en la viscosidad de cultivos de <i>Anabaena</i> .	86
Figura 33. Relación entre velocidad de cizalla y esfuerzo de cizalla para un cultivo continuo de <i>Anabaena</i> conteniendo 0,134 g EPS l ⁻¹ .	87
Figura 34. Efecto de la concentración de EPS en cultivos continuos en fotoquimiostato sobre los valores de n_2 y K .	88
Figura 35. Evolución de la densidad celular de un cultivo de <i>Anabaena</i> en estanque abierto.	89
Figura 36. Efecto de la densidad celular mínima (0,1 g l ⁻¹ en azul; 0,2 g l ⁻¹ en rojo; 0,3 g l ⁻¹ en verde; 0,4 g l ⁻¹ en negro) sobre el comportamiento de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en estanque abierto.	90
Figura 37. Evolución de un cultivo semicontinuo de <i>Anabaena</i> con dilución diaria en reactor tubular.	94
Figura 38. Evolución de la densidad celular en un cultivo semicontinuo de <i>Anabaena</i> en reactor vertical plano.	99
Figura 39. Evolución de la actividad fotosintética en cultivos continuos de <i>Anabaena</i> en fotoquimiostato a lo largo de un ciclo de iluminación.	102

Figura 40. Evolución de la actividad nitrogenasa de un cultivo de <i>Anabaena</i> en régimen continuo en fotoquimioestado a lo largo de un ciclo diario.	103
Figura 41. Evolución de la actividad fotosintética en un cultivo de <i>Anabaena</i> en reactor plano vertical.	103
Figura 42. Evolución de la actividad nitrogenasa en un cultivo de <i>Anabaena</i> en reactor plano vertical.	104
Figura 43. Sedimentación de biomasa de <i>Anabaena</i> procedente de RPV.	105
Figura 44. Efecto de la densidad celular del cultivo en reactor plano vertical sobre la sedimentación de su biomasa.	106
Figura 45. Efecto de la intensidad y duración de la agitación sobre la recuperación del EPS generado por <i>Anabaena</i> .	107
Figura 46. Cultivos de <i>Anabaena</i> en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de cubos de esponja de poliuretano, tras uno (A) y cuatro (B) días de cultivo.	109
Figura 47. Imágenes al microscopio óptico de filamentos de <i>Anabaena</i> inmovilizados en esponja de poliuretano.	109
Figura 48. Efecto de la densidad celular inicial sobre la inmovilización de <i>Anabaena</i> .	112
Figura 49. Efecto de la superficie total de soporte sobre la inmovilización de biomasa total y por unidad de superficie.	113
Figura 50. Efecto de la superficie total de soporte sobre la inmovilización de biomasa total y por unidad de superficie.	114
Figura 51. Efecto del volumen de medio sobre el porcentaje de cadmio remanente.	115
Figura 52. Cinética de retirada de Cd^{2+} de una disolución conteniendo 100 ppm. Soporte embebido en agua, en medio de cultivo y sistema inmovilizado conteniendo 0,44 g de biomasa.	116
Figura 53. Retirada de cadmio en función de la concentración de biomasa inmovilizada.	117
Figura 54. Retirada de cadmio por <i>Anabaena</i> inmovilizada en poliuretano. Efecto de la concentración inicial del metal sobre su concentración en condiciones de equilibrio.	118
Figura 55. Isoterma de Langmuir para la unión de cadmio a la biomasa de <i>Anabaena</i> inmovilizada.	119
Figura 56. Representación gráfica de la isoterma de Langmuir lineal y ajuste.	120
Figura 57. Simulación del efecto de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo y datos experimentales.	129
Figura 58. Simulación del efecto de la irradiancia y la velocidad de dilución	

sobre la tasa de fijación de CO₂ en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo y datos experimentales. 129

Figura 59. Simulación del efecto de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre productividad de EPS en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo y datos experimentales. 140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de <i>Anabaena</i> .	37
Tabla 2. Patrones para el análisis elemental.	49
Tabla 3. Efecto de la velocidad de dilución sobre concentración de carbono orgánico y tasa de fijación de CO ₂ en cultivos continuos de <i>Anabaena</i> en estado estacionario.	66
Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre productividad de biomasa y EPS y tasa de fijación de CO ₂ en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	69
Tabla 5. Efecto de la agitación sobre la tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	70
Tabla 6. Efecto del pH sobre la tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	71
Tabla 7. Efecto de fosfato sobre la tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	73
Tabla 8. Efecto de la concentración de cloruro sódico sobre la tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>Anabaena</i> operados en régimen continuo.	74
Tabla 9. Influencia de la concentración de bicarbonato sobre la productividad de biomasa y de EPS en cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	75
Tabla 10. Efecto de la irradiancia máxima incidente sobre la tasa de fijación de CO ₂ de cultivos de <i>Anabaena</i> en régimen continuo.	76
Tabla 11. Productividad de biomasa y EPS en cultivos de <i>Anabaena</i> en fotoquimiostato mantenidos en régimen continuo y expuestos a iluminación solar natural.	85
Tabla 12. Efecto de la densidad celular mínima sobre productividad de biomasa, productividad de EPS y tasa de fijación de CO ₂ en cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en estanque abierto.	90
Tabla 13. Efecto del pH sobre el rendimiento de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en estanques abiertos.	91
Tabla 14. Rendimiento de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en estanques abiertos.	91
Tabla 15. Efecto del intervalo de dilución sobre la productividad de biomasa y EPS de cultivos de <i>Anabaena</i> en reactor tubular.	93
Tabla 16. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de biomasa y EPS y la tasa de fijación de CO ₂ de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en reactor tubular.	93
Tabla 17. Efecto del intervalo de dilución sobre la productividad de biomasa y la tasa de fijación de CO ₂ de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en reactor tubular mantenidos a densidad celular mínima constante.	94
Tabla 18. Productividad de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en reactor tubular mantenidos en régimen de dilución diaria y a distinto valor de densidad celular mínima.	95

Tabla 19. Efecto del intervalo de dilución sobre la productividad de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en RPV.	96
Tabla 20. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de biomasa de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en RPV.	97
Tabla 21. Efecto de la irradiancia incidente y la densidad celular mínima sobre la productividad de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en RPV.	98
Tabla 22. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en RPV mantenidos con un régimen de dilución diaria.	99
Tabla 23. Efecto de la irradiancia incidente y la densidad celular mínima sobre la productividad de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en RPV mantenidos con un régimen de dilución diaria.	100
Tabla 24. Efecto del tamaño de los fragmentos cúbicos de esponja de poliuretano sobre su capacidad de carga en la inmovilización de <i>Anabaena</i> .	111
Tabla 25. Efecto de la geometría de los fragmentos de esponja de poliuretano sobre su capacidad de carga en la inmovilización de <i>Anabaena</i> .	111
Tabla 26. Comparación entre sistemas de cultivo utilizados.	134
Tabla 27. Productividad de distintos organismos en diversos sistemas de cultivo.	134
Tabla 28. Productividad de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en estanque, reactor tubular y RPV.	135
Tabla 29. Tasa de fijación de CO ₂ de cultivos semicontinuos de <i>Anabaena</i> en estanque, reactor tubular y RPV.	136
Tabla 30. Productividad de EPS de diferentes organismos.	141
Tabla 31. Valores de $q_{m\acute{a}x}$ y b para cadmio en diferentes organismos.	147

ÍNDICE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolos y abreviaturas:

a	Parámetro de ajuste para el cálculo de $Y_{EPS/bio}$ (sin unidades)
A_1, A_2	Constantes relacionadas con la producción de EPS por <i>Anabena</i> (h^{-1})
Abs	Absorbancia
b	Constante de Langmuir ($l\ mg^{-1}$)
c	Parámetro de ajuste para el cálculo de β (sin unidades)
C_b	Densidad celular del cultivo ($g\ l^{-1}$)
C_e	Concentración de cadmio en el equilibrio ($ppm\ Cd^{+2}$)
C_0	Concentración inicial de cadmio ($ppm\ Cd^{+2}$)
CHT	Carbohidratos totales
D	Velocidad de dilución (h^{-1})
E_1, E_2	Energías de activación ($J\ mol^{-1}$)
EPS	Exopolisacárido
f	Parámetro de ajuste para el cálculo de β (sin unidades)
h	Parámetro característico de la tasa específica máxima de acumulación de EPS con respecto a la temperatura (K^{-1})
I_{av}	Irradiancia promedio ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)
I_o	Irradiancia incidente ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)
Ik	Constante de semisaturación de biomasa para la irradiancia ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)
$Ik_{qEPS/bio}$	Constante de semisaturación de producción de EPS para la irradiancia ($\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)
K	Índice de consistencia del fluido ($mPa\ s$)
K_a	Coeficiente de extinción de la suspensión celular ($m^2\ g^{-1}$)
m	Parámetro característico de la tasa específica máxima de acumulación de EPS con respecto a la temperatura ($g\ EPS\ g^{-1}\ biomasa\ d^{-1}$)
n	Índice de comportamiento de flujo (Sin unidades)
n_2	Parámetro característico de la ecuación de la tasa de crecimiento (Sin unidades)
p	Paso de luz del reactor (m)
P_{EPS}	Productividad de EPS ($g\ l^{-1}\ d^{-1}$)

q_e	Cantidad de Cd^{+2} retenido por gramo de biomasa en el equilibrio ($\text{mg Cd}^{+2} \text{ g}^{-1}$ biomasa)
q_{EPS}	Tasa específica de acumulación de EPS (g EPS g^{-1} biomasa)
$q_{m\acute{a}x}$	Capacidad máxima de retención de cadmio por unidad de biomasa ($\text{mg Cd}^{+2} \text{ g}^{-1}$ biomasa)
R	Eficiencia fotosintética (g MJ^{-1})
RPV	Reactor plano vertical
RT	Reactor tubular
t	Tiempo (días)
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
$Y_{EPS/bio}$	Rendimiento en EPS por gramo de biomasa del metabolismo primario (g EPS g^{-1} biomasa)
Y	Parámetro de ajuste de $Y_{EPS/bio}$ (g EPS g^{-1} biomasa h^{-1})

Letras griegas:

β	Rendimiento en EPS por gramo de biomasa del metabolismo secundario (g EPS g^{-1} biomasa)
μ	Tasa de específica de crecimiento (h^{-1})
$\mu_{m\acute{a}x}$	Tasa específica máxima de crecimiento (h^{-1})

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL PROBLEMA DEL CO₂

I.1.1. El calentamiento global

El exterior de la atmósfera terrestre recibe continuamente unos 1350 W m^{-2} de energía radiante procedente del Sol. Gran parte de esta energía no alcanza la biosfera ya que aproximadamente un 30% se devuelve por reflexión al espacio y un 20% queda retenido por la atmósfera (ozono). De la fracción que alcanza la superficie terrestre, casi un 50% se disipa en forma de calor (De la Rosa y col., 1990). Parte de este calor queda retenido por algunos de los gases que componen la atmósfera, calentando el planeta. Este “efecto invernadero” es responsable de la vida en la tierra tal como la conocemos hoy en día. No obstante, desde hace unas décadas la concentración de los gases responsables del efecto invernadero (GEI) se ha incrementado notablemente, reteniendo más energía y generando un desequilibrio que ha desembocado en el calentamiento global del planeta.

Según el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático, la temperatura media del planeta se ha incrementado $0,6 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el siglo XX (IPCC, 2001), tendencia que continúa en la actualidad. Este efecto podría ser responsable de cambios detectados en el clima como el incremento de las precipitaciones en el hemisferio norte y de la frecuencia de tormentas y huracanes, periodos de sequía más prolongados que favorecen la desertificación, etc. La temperatura de los océanos ha aumentado $0,31 \text{ }^\circ\text{C}$ durante los últimos 50 años, provocando la reducción de la extensión de la capa de hielo en un 7-8% por década desde los años 70 (Serreze y col., 2007; Vinnikov y col., 1999), de manera que el nivel de los océanos asciende actualmente una media de 3 mm año^{-1} a causa del deshielo (Merrifield y Merrifield, 2009). Estas variaciones en las condiciones climáticas repercuten en los ecosistemas, causando cambios en los ritmos estacionales de las especies, pérdida de hábitats, migraciones y extinción de especies (Parmesan, 2006; Thomas y col., 2004). Este efecto se agrava en el medio marino, debido a que la absorción del dióxido de carbono provoca la acidificación de los océanos (Doney y col., 2009), afectando negativamente a los organismos con estructuras y esqueletos compuestos por carbonato cálcico, como los corales (Hughes y col., 2003).

Los gases de efecto invernadero son, básicamente: vapor de agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2), clorofluorocarbonados (CFC), hidrofluorocarbonados (HFC),

metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) (Rao y Riahi, 2006). Exceptuando los compuestos CFC y los HFC que tienen origen antropogénico, el resto de los GEI se generan tanto de forma natural como por acción del hombre. Teniendo en cuenta los GEI generados exclusivamente por la actividad humana, la mayor fuente de emisiones es la quema de combustibles fósiles (petróleo, carbón, gas natural) aportando aproximadamente el 75% del CO_2 y gran parte del metano (IPCC, 2001; 2005). Estas emisiones se han incrementado particularmente en las últimas dos décadas del siglo XX, como se muestra en la Figura 1. Otros dos focos fundamentales de emisión de GEI de origen antropogénico son la deforestación, vinculada al aumento del CO_2 , y la agricultura, que está directamente relacionada con el incremento de metano y óxido nitroso atmosférico.

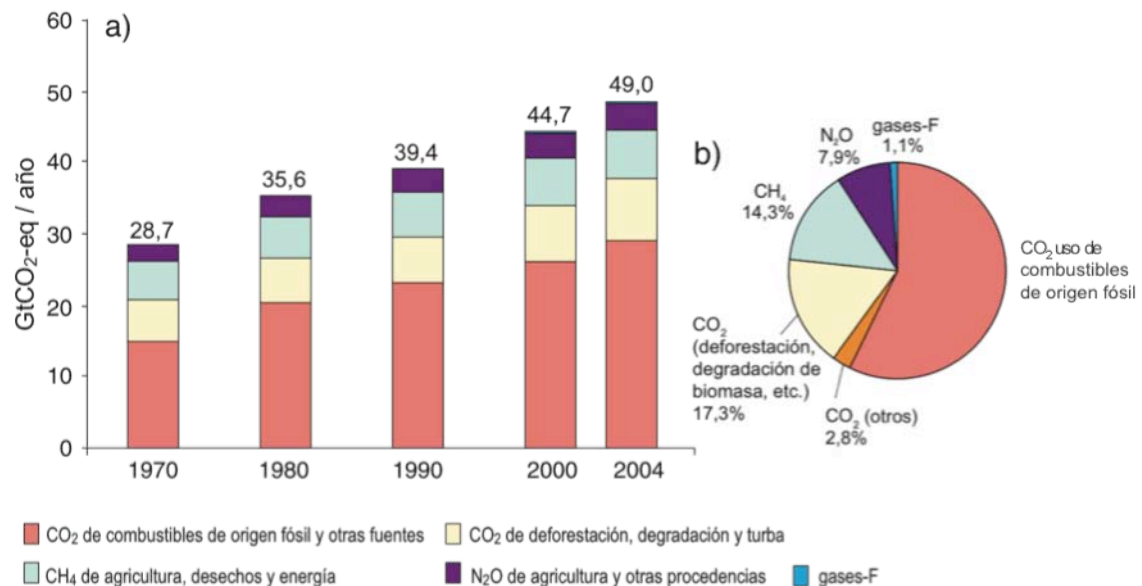


Figura 1. Emisiones de gases de efecto invernadero. a) Emisiones anuales mundiales de GEI de origen antropogénico entre 1970 y 2004. b) Parte proporcional que representan diferentes GEI de origen antropogénico respecto de las emisiones totales en 2004, expresados como equivalente CO_2 (Rubin y col., 1992). Fuente: informe IPCC, 2007.

Existe un equilibrio dinámico entre el CO_2 presente en la atmósfera, en la vegetación y los océanos que determina la concentración del gas en cada ubicación, amortiguando posibles modificaciones. Este equilibrio natural ha mantenido la concentración de CO_2 en la atmósfera con variaciones inferiores al 10% durante los diez mil años anteriores a la revolución industrial (IPCC, 2007). Sin embargo, a partir

de entonces, su concentración se ha incrementado en más del 30% (Figura 2), rompiendo este equilibrio, principalmente como consecuencia del consumo de combustibles fósiles ($5,4 \times 10^9$ t C año⁻¹) y del cambio de usos del suelo ($1,7 \times 10^9$ t C año⁻¹) pasando de 280 ppm en el año 1750 a 391 ppm en 2011 (Sarmiento y Gruber, 2002; Watson y col., 2000; National Oceanic and Atmospheric Administration, 2011).

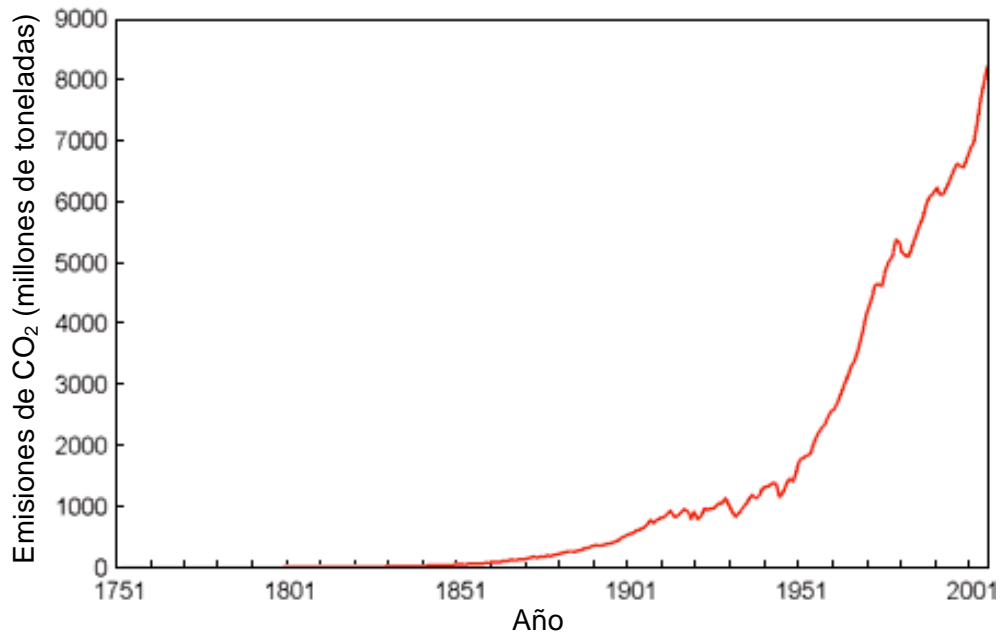


Figura 2. Emisiones globales de CO₂. Fuente: NOAA.

I.1.2. Mitigación de las emisiones de CO₂

Ante el mencionado aumento del nivel de CO₂ atmosférico, los países firmantes del Protocolo de Kyoto (1998) se han comprometido a “potenciar la investigación, promover, desarrollar y aumentar el uso de formas nuevas y renovables de energía, de tecnologías de secuestro del dióxido de carbono y de tecnologías avanzadas y novedosas, ecológicamente racionales”. Pero, para reducir el contenido atmosférico del CO₂ ya emitido sería necesario desarrollar además tecnologías de captura, almacenaje y reutilización del CO₂ (Hall y col., 1995).

Una parte importante de las emisiones de CO₂ de origen antropogénico se deben al sector del transporte. El hecho de que ésta sea una fuente difusa impide su captura directa. Para otras emisiones que se producen en focos estacionarios, sí es posible aplicar tecnologías que conlleven la captura de CO₂, si bien, dada la magnitud

de las emisiones de algunos sectores industriales, como el eléctrico (Dow y Downing, 2007), no es posible acometer su mitigación mediante una única tecnología. Actualmente, además de la reducción de emisiones por la generación de energía eléctrica a través de fuentes renovables o de energía nuclear, o el aumento en la eficiencia de los procesos, se están evaluando y/o desarrollando tecnologías relacionadas con la captura de CO₂ y el almacenamiento y/o valorización del mismo (Figueroa y col., 2008; Herzog y col., 1997; IPCC, 2005; Skjånes y col., 2007).

I.1.2.1. Tecnologías para la captura de CO₂

Las tecnologías físico-químicas dirigidas a la captura de CO₂ implican un procesamiento de los gases de combustión para obtener un gas con elevada concentración de CO₂, a alta presión, que pueda ser fácilmente transportado al lugar de almacenamiento. Dependiendo del proceso o la aplicación industrial de que se trate, existen tres métodos principales para captar el CO₂ generado por un combustible fósil primario (carbón, gas natural o petróleo), por biomasa o por una mezcla de estos combustibles:

1. Sistemas de *captación previa* a la combustión (precombustión). El combustible primario se procesa en un reactor con vapor y aire u oxígeno para producir una mezcla que contiene, principalmente, monóxido de carbono e hidrógeno. Mediante la reacción del monóxido de carbono con el vapor, en un segundo reactor, se produce CO₂ e hidrógeno adicional que pueden separarse, mediante técnicas de absorción física o química, en un flujo de CO₂ y un flujo de hidrógeno, que puede utilizarse para generar energía eléctrica y/o calor.
2. Sistemas de *captación posterior* a la combustión (postcombustión). Se separa el CO₂ de los demás gases producidos por la quema del combustible primario en presencia de aire, mediante el empleo de un solvente orgánico líquido.
3. Los sistemas de *combustión de oxígeno-gas* (oxicombustión). Estos sistemas utilizan oxígeno en lugar de aire en la combustión del combustible primario, para producir un gas compuesto principalmente por vapor de agua y CO₂, con la posterior sustracción del vapor de agua mediante el enfriamiento y la compresión del flujo de gas.

I.1.2.2. Tecnologías para el almacenamiento de CO₂

Tras su captura, el CO₂ debe ser retenido mediante métodos físico-químicos, como el almacenamiento geológico, el almacenamiento oceánico o la carbonatación mineral (IPCC, 2005). El almacenamiento geológico de CO₂ se consigue mediante su inyección, en forma condensada, en una formación rocosa subterránea. La aplicación de diversos mecanismos de retención, tanto físicos como geoquímicos, evitarían que el CO₂ inyectado se desplazase hacia la superficie. Las formaciones rocosas porosas que contienen o han contenido anteriormente fluidos, como gas natural, petróleo o salmuera, son candidatos potenciales para este almacenamiento.

El almacenamiento oceánico consiste en la inyección directa del CO₂ captado en los fondos oceánicos, a más de mil metros de profundidad, donde el CO₂ se disuelve y difunde, incorporándose al ciclo global del carbono, quedando en su mayor parte aislado de la atmósfera durante siglos. Para ello es necesario el transporte de CO₂ mediante gasoductos o buques al lugar de almacenamiento oceánico.

La carbonatación mineral se refiere a la fijación de CO₂ mediante el uso de óxidos alcalinos y alcalinotérreos, como el óxido de magnesio (MgO) y el óxido de calcio (CaO), que están presentes en las rocas de silicatos de formación natural. Las reacciones químicas entre estos materiales y el CO₂ producen sílice y carbonatos, que se mantienen estables durante largos períodos de tiempo y que, por tanto, pueden almacenarse en minas o reutilizarse como material de construcción. Este proceso es técnicamente factible porque la cantidad de óxidos metálicos presentes en las rocas de silicatos que pueden encontrarse en la corteza terrestre excede de las cantidades necesarias para fijar todo el CO₂ que produciría la combustión de todas las reservas de combustibles fósiles existentes. Sin embargo, no es viable desde un punto de vista económico ya que requeriría la explotación minera, la trituración y la molienda de los minerales, así como su transporte a una planta de tratamiento donde reaccionaría con el flujo concentrado de CO₂.

Estas tecnologías están en fase de evaluación y/o desarrollo debido a que no se conoce con exactitud su impacto ambiental y porque, a pesar de su viabilidad técnica, implican un aumento del consumo de energía en los procesos, que conlleva una disminución de la eficiencia energética y un encarecimiento del 30-50% en el coste de la energía (Gambini y Vellini, 2003; IPCC, 2005).

I.1.2.3. Mitigación del CO₂ mediante la fotosíntesis

Una alternativa a estos procesos de captación y almacenamiento del CO₂ es su fijación fotosintética mediante organismos vegetales superiores o microalgas. Las masas forestales y los cultivos agrícolas son sumideros naturales de CO₂ que pueden llegar a capturar $1,9 \times 10^9$ t C año⁻¹ (Sarmiento y Gruber, 2002). Para incrementar estas tasas de fijación mediante cultivos agrícolas se requeriría procesos de mejora genética que aumentasen su eficiencia. Por otro lado, los métodos actuales de explotación agrícola suponen una liberación a la atmósfera de una parte importante del C que se ha fijado. La implantación de prácticas más sostenibles para la gestión de los cultivos y el desarrollo de tecnologías adecuadas para la transformación de la biomasa vegetal en materiales de interés industrial y energético haría más favorable el balance de C (Alig, 2010; Gressel, 2008; Hall, 1995 y 1997).

La opción de secuestrar el CO₂ presente en emisiones industriales mediante el cultivo de microalgas constituye una prometedora opción (Benemann, 1993, 1997; Moheimani y Borowitzka, 2006; Padroni y col., 2005). Las microalgas presentan una elevada eficiencia fotosintética, con rendimientos superiores al resto de los vegetales, pudiéndose cultivar todo el año en zonas no aptas para explotaciones agrícolas, empleando aguas de baja calidad y sin utilizar pesticidas y herbicidas, no compitiendo, por tanto, con la agricultura tradicional. El carecer de estructuras de soporte, producir metabolitos secundarios de gran interés y presentar una gran diversidad metabólica y ecológica aumentan sus posibilidades de utilización. La naturaleza hidráulica de los cultivos de microalgas facilita la manipulación de los mismos, así como su instalación contigua a la propia fuente emisora de CO₂, posibilitando un uso directo del gas (Dismukes y col., 2008; Pulz, 2001). Por contra, los propuestos sumideros naturales de carbono sólo fijan el CO₂ una vez que éste se ha incorporado a la atmósfera, como contaminación difusa.

Algunas cepas de microalgas son capaces de crecer en medios a los que se aporta directamente gases de combustión. En este modo de operación, el pH de la mayoría de los medios de cultivo desciende hasta valores entre 3 y 5, mientras que la temperatura puede subir hasta los 50 °C, limitando el número de especies capaces de crecer en estas condiciones (Ono y Cuello, 2003). Los mejores resultados publicados corresponden a la microalga *Chlorococcum littorale*, para la que se han extrapolado tasas de fijación equivalentes a $0,5$ t CO₂ ha⁻¹ d⁻¹ (Kurano y col., 1995). Aunque esta tecnología de inyección continua de CO₂ sin considerar las condiciones óptimas de

cultivo sigue en investigación por su sencillez, se ha propuesto otros enfoques manteniendo las condiciones de cultivo óptimas suministrando CO₂ que procede de gases de combustión de manera que no se alteren sustancialmente la temperatura y el pH. Con este segundo enfoque se han descrito tasas de fijación extrapoladas de 0,45 t CO₂ ha⁻¹ d⁻¹ con *Tetraselmis suecica* (Pedroni y col., 2004) y 0,8 t CO₂ ha⁻¹ d⁻¹ con *Chlorella vulgaris* (Doucha y col., 2005).

Este método de eliminación de CO₂ genera una biomasa de origen vegetal que podría utilizarse directamente como fuente de energía, ya que posee considerable valor energético próximo a 20 kJ g⁻¹ (Illman y col., 2000). Por otra parte, la biomasa puede ser utilizada como materia prima para la obtención de biocombustibles (bioetanol, biodiesel), como biofertilizante, o como fuente de productos de interés industrial y comercial (Chisti, 2007).

La eficiencia y el éxito de los sistemas de microalgas para la fijación de carbono inorgánico dependen en gran medida del microorganismo seleccionado, así como del sistema de producción y de la optimización de los parámetros de operación. Adicionalmente, han de considerarse las propiedades de los productos generados y el posterior aprovechamiento de los mismos (Ono y Cuello, 2003). Este carbono procedente de la fijación del CO₂ representa la mitad del peso seco de la biomasa y forma parte de una gran diversidad de moléculas constituyentes de la misma. Otros productos de la fotosíntesis que pueden ser secretados por las células, tales como polímeros de naturaleza orgánica, contienen también carbono originalmente presente en el CO₂. La síntesis de dichos polímeros aumenta la tasa de fijación de CO₂ de la materia orgánica.

I.2. BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos sustancialmente diferentes en cuanto a estructura y organización celular (eucariotas las microalgas y procariotas las cianobacterias) y por tanto taxonómicamente diferenciados, aunque en biotecnología y ficología aplicada, se consideran colectivamente como microalgas: microorganismos poseedores de clorofila *a*, junto a otros pigmentos, con capacidad para llevar a cabo fotosíntesis oxigénica (Guerrero y Losada, 1991).

La biotecnología de microalgas persigue la aplicación de estos organismos o de compuestos obtenidos a partir de ellos para la producción de bienes y servicios útiles para el hombre. A pesar de que algunas microalgas se han empleado para la alimentación humana desde tiempos remotos, los primeros cultivos monoespecíficos de microalgas a gran escala se desarrollaron en 1950 en EE.UU. y Alemania. Una década después, comenzó el cultivo con fines comerciales de *Chlorella* en Japón, seguido por el cultivo de *Spirulina* en Méjico y Tailandia en la década de los 70 y de *Dunaliella* en Israel y Australia en los años 80 (Borowitzka, 1999). Desde 1980, la biotecnología de microalgas ha evolucionado paralelamente a los progresos en el diseño de sistemas de cultivo, el conocimiento de la fisiología de estos organismos y los métodos de recuperación y tratamiento de los productos. La idoneidad de las microalgas para una variedad de aplicaciones de carácter práctico se ha puesto de manifiesto en diversidad de instancias (Chisti, 2006; Richmond, 2004). En la actualidad muchas microalgas tienen aplicaciones biotecnológicas, como *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Phorphyridium*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Anabaena*, *Spirulina* y *Nostoc*, para obtener pigmentos, ácidos grasos y exopolisacáridos, entre otros productos (Metting, 1996; Pulz y Gross, 2004; Spolaore y col., 2006). La posibilidad de modificar genéticamente algunas microalgas (Beer y col., 2009), o de inmovilizarlas convirtiéndolas en pequeños reactores (Abdel Hameed y Hammouda, 2007), incrementa las posibilidades biotecnológicas de estos versátiles organismos.

I.2.1. Aplicaciones de las microalgas

I.2.1.1. Producción de compuestos de interés

Las microalgas pueden servir como fuente de una gran diversidad de compuestos con valor comercial. Estos organismos son, de hecho, la primera fuente natural de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (araquidónico, linolénico, eicosapentaenoico o docosahexaenoico) esenciales para el hombre. Estos organismos son asimismo productores de una variedad de metabolitos bioactivos, de composición química y actividad biológica diversa, incluyendo desde toxinas a principios activos de medicamentos (Berry y col., 2008; Cragg y col., 2009). Microalgas y cianobacterias producen, y a menudo liberan, polisacáridos con variadas aplicaciones. Son igualmente una fuente de pigmentos y precursores de vitaminas (Sharma y col., 2010).

1.2.1.1.a. Exopolisacáridos

Numerosas microalgas producen exopolisacáridos (EPS) que permanecen fuertemente unidos a la superficie celular formando una capa densa (polisacáridos capsulares) o bien se liberan al medio durante el crecimiento, al estar vinculados débilmente a esta superficie celular (Li y col., 2001; Volk y col., 2007).

Los polisacáridos liberados por las cianobacterias están compuestos en el 80% de los casos por 6-10 azúcares diferentes. Los azúcares glucosa, galactosa, manosa, y ramnosa, son componentes habituales de los EPS, siendo la glucosa el componente más frecuente (De Philippis y col., 1998, 2000; Huang y col., 1998; Moreno y col., 2000). La mayoría de los EPS presentan ácidos urónicos en su composición, habiéndose además detectado en algunos EPS la presencia de aminoácidos, que pueden acentuar el carácter aniónico de la macromolécula (Flaibani y col., 1989). La composición de los EPS se puede modificar químicamente, añadiendo por ejemplo grupos sulfato para ampliar su utilidad (Geresh y col., 2002), ya que algunos EPS sulfatados presentan actividad antiviral (Ascencio y col., 2004; Panoff y col., 1988; Witvrouw y De Clercq, 1997).

Gran parte del éxito ecológico de las cianobacterias se debe a la producción de EPS, que cumplen múltiples funciones, dependiendo de la estirpe que lo sintetice y de las propiedades físico-químicas del ambiente en el que se encuentre (De Philippis y Vincenzini, 1998). Los polisacáridos capsulares juegan un papel crítico en la protección de las células frente a los ambientes extremos y las condiciones de cultivo adversas (Potts, 1999). Frente a la desecación y condiciones de alta salinidad, los EPS actúan como depósito de agua y evitan la fusión de las membranas (Hill y col., 1994, 1997), prestando además protección frente a la radiación UV, directamente (Chen y col., 2003; 2008) o mediante la unión a pigmentos protectores (Ehling-Schulz y col., 1997; Quesada y col., 1999). La cubierta polisacarídica puede también repeler a posibles depredadores (Pajdak-Stós y col., 2001; Yang y col., 2008).

La naturaleza hidrofóbica de los polisacáridos es un requisito para su adhesión a sustratos, formación de estructuras (Sutherland, 1990; Flaibani y col., 1989, Fattom y Shilo, 1984b), unión a hospedadores (Gantar y col., 1995) y floculación de partículas (Avnimelech y col., 1982; Fattom y Shilo, 1984a; Bar-Or y Shilo, 1987). La hidrofobicidad de los EPS puede variar con la presencia de cationes, las condiciones de cultivo y la edad del mismo (Fattom y Shilo, 1984b; Walsby, 1968). La actividad

quelante del EPS es fundamental en la captación de metales que están presentes a nivel de trazas en la naturaleza y son imprescindibles para el crecimiento de las cianobacterias (De Philippis y col., 1991; Bender y col., 1994).

Entre las múltiples utilidades de los EPS son destacables su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica, su empleo en biorremediación, tratamiento de aguas residuales y recuperación de suelos para uso agrícola (De Philippis y col. 1998).

1.2.1.1.b. Pigmentos

Las microalgas contienen otros pigmentos, además de la clorofila, como son las ficobiliproteínas y los carotenoides, cuya síntesis se modula en función de la luz incidente entre otros factores (Pulz y Gross, 2004).

Los carotenoides contribuyen a la captación de luz, mantienen la estructura y función de complejos fotosintéticos, amortiguan los estados triplete de la clorofila, secuestran especies reactivas de oxígeno y disipan el exceso de energía (Demming-Adams y Adams, 2002). La estructura química de los carotenoides deriva del licopeno, una cadena poliénica de 40 átomos de carbono con dobles enlaces conjugados que, generalmente, presenta 2 grupos cíclicos terminales (anillos). Los carotenoides se dividen en 2 grupos: las xantofilas y los carotenos, que se diferencian por la presencia o ausencia respectivamente de grupos funcionales que contienen oxígeno en los anillos. Los carotenoides procedentes de microalgas que tienen mayor valor comercial son el β -caroteno producido por la microalga *Dunaliella salina*, la astaxantina procedente de *Haematococcus* y la luteína de *Muriellopsis sp.* y *Scenedesmus almeriensis* (Del Campo y col., 2007; Guedes y col., 2011). Los carotenoides tienen un gran valor comercial por sus propiedades antioxidantes (Guerin y col., 2003; Higuera Ciapara y col., 2006; Hussein y col., 2006). La luteína puede aplicarse en el tratamiento preventivo de la aterosclerosis, la formación de cataratas y la degeneración macular (Granado y col., 2003; Krinsky y Johnson, 2005; Olmedilla y col., 2003).

Las ficobiliproteínas actúan como principales pigmentos antena del fotosistema II interviniendo en la captación activa de luz. Las ficobiliproteínas son polipéptidos unidos covalentemente a ficobilinas o cromóforos, y pueden llegar a constituir el 50% del contenido proteico de la célula. Las principales ficobiliproteínas son: ficocianina,

ficoeritrina y aloficocianina, abundantes en cianobacterias pertenecientes a los géneros *Spirulina*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Synechococcus* y en el alga roja *Porphyridium* (Moreno y col., 1995; Postius y col., 1996). Se pueden usar como marcadores fluorescentes en biología celular y como colorante en alimentación y en cosmética (Cohen, 1986; Glazer, 1994).

1.2.1.1.c. Ácidos grasos

En términos generales el contenido total en lípidos de microalgas eucariotas oscila entre el 10 y el 30% del peso seco. Su acumulación se induce generalmente en la fase estacionaria del cultivo o cuando se somete a situaciones de estrés, alcanzando en algunos casos el 60% del peso seco (Illman y col., 2000). Las cianobacterias presentan un contenido inferior, oscilando entre el 5 y el 10% (Vargas y col., 1998).

El perfil de ácidos grasos y el nivel de insaturación de los mismos depende de la estirpe y de las condiciones de cultivo. Los ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs tienen múltiples aplicaciones en alimentación humana y acuicultura, presentando ventajas frente a los de origen animal (Pulz y Gross, 2004). Los ácidos araquidónico, γ -linoleico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico son los PUFAs de mayor interés (Spolaore y col., 2006). Algunos ejemplos de organismos productores de PUFAs son: *Spirulina* que produce γ -linolénico, *Phorphyridium* acumula principalmente ácido araquidónico; *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum* y *Nitzschia* acumulan ácido eicosapentaenoico; *Cryptocodinium* y *Schizochytrium* producen ácido docosahexaenoico e *Isochrysis* y *Tetraselmis* con alto contenido en los dos últimos (Chini Zittelli y col., 1999; Molina y col., 1991; Robles Medina y col., 1998).

1.2.1.1.d. Compuestos con actividad biológica

Los compuestos con actividad biológica tienen importancia en biomedicina y agronomía para el desarrollo de fármacos, herbicidas y pesticidas (Berry y col., 2008; Cragg y col., 2009). Los compuestos bioactivos aislados de la biomasa de cianobacterias pertenecen al grupo de amidas, alcaloides, ácidos grasos y péptidos, entre otros (Nunnery y col., 2010). Cianobacterias como *Spirulina* sp., *Phormidium* sp.

y *Lyngbya majuscula* producen compuestos con diversas actividades biológicas (Sharma y col., 2010). *Phormidium* sp. inhibe el crecimiento de bacterias gram negativas, gram positivas, levaduras y hongos. *L. majuscula* produce numerosos compuestos nitrogenados, incluyendo lipopéptidos y péptidos cíclicos, con diversas funciones: activación de la proteína quinasa C, promotor de tumores, inhibidor del ensamblaje de microtubulinas, antimicrobiano, fungicida y bloqueador de los canales de sodio (Liu y Rei, 2010).

I.2.1.2. Alimentación humana

La biomasa de microalgas posee en general excelentes cualidades para el consumo humano, de hecho, biomasa procedente de *Spirulina*, *Chlorella*, *Anabaena*, y *Nostoc* se consume como alimento humano en distintos países. La utilización de microalgas como producto alimentario deriva de su elevado contenido en proteínas con valores superiores al 50% del peso seco y con un aminograma similar al de la harina de soja (Becker, 2007). *Spirulina platensis* se cultiva en lagos naturales y reactores, comercializándose en forma de polvo, pastillas y cápsulas, como suplemento alimentario debido a su digestibilidad y su riqueza en proteínas, β -caroteno, tiamina, vitamina B12 y riboflavinas (Abed y col., 2009).

El elevado coste de producción de estos organismos frente al de otras fuentes convencionales de proteínas ha desplazado el interés sobre la biomasa de microalgas y sus derivados hacia el mercado de productos nutraceúticos, es decir, sustancias farmacológicamente activas que potencian, inhiben o modifican la fisiología o el metabolismo, actuando como inmunoestimuladores, antioxidantes, antivirales o anticancerígenos (Hardy, 2000; Hernández Corona y col., 2002; Schaeffer y Krylov, 2000).

I.2.1.3. Alimentación animal

Aproximadamente el 30% de la producción mundial de microalgas se emplea en alimentación animal (Becker, 2007). La presencia de un 5-10% de biomasa de *Chlorella*, *Scenedesmus* o *Spirulina* en los piensos de animales de granja es suficiente para suplementar adecuadamente su alimentación, afectando positivamente a su fisiología (Becker, 2004; Belay y col., 1993, 1996).

Las microalgas se emplean regularmente en acuicultura, ya que constituyen la base de la cadena alimenticia natural. Suponen una fuente esencial de alimento para larvas de crustáceos y de peces, moluscos y rotíferos, empleados a su vez para la nutrición de larvas de peces (Lavens y Sorgeloos, 1996). La alimentación con microalgas puede hacerse extensiva a peces adultos, ya que proporciona beneficios adicionales, como resaltar la coloración en peces ornamentales, dar color rosado a los salmónidos e incluso potenciar el sistema inmune (Benemann, 1992; Gupta y col., 2007; Shahidi y col., 1998). De entre las más de cuarenta especies de microalgas que se emplean en acuicultura, las más importantes son *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira* (Spolaore y col., 2006). Las estirpes destinadas a este fin deben cumplir varios requisitos como ser nutritivas, inocuas y fáciles de cosechar, además de poseer un tamaño adecuado y una pared celular digerible.

I.2.1.4. Agricultura

Las microalgas se pueden emplear para abonar y acondicionar el suelo para cultivos agrícolas (Painter, 1993; Vaishampayan y col., 2001). Cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc* favorecen el crecimiento de plantas, como el arroz o el maíz, mediante la fijación de nitrógeno atmosférico y la producción de sustancias bioactivas (Maqubela y col., 2010; Metting, 1996). Otras, como *Anabaena azollae*, son capaces de establecer relaciones simbióticas con plantas (Watanabe y Liu, 1992). Los EPS generados por algunas cianobacterias tienen un papel fundamental en el acondicionamiento y la recuperación de suelos para uso agrícola, especialmente en zonas áridas, puesto que estabilizan las superficies, evitando la erosión de las mismas, y potencian el almacenamiento de agua (Hu y col., 2003; Jiménez Aguilar y col., 2009; Zulpa de Caire y col., 1997). En condiciones de estrés salino, el EPS liberado por cianobacterias del género *Nostoc* es capaz de retirar parte del sodio presente facilitando la germinación de las semillas de maíz, trigo y arroz (Arora y col., 2010).

I.2.1.5. Producción de biocombustibles

La búsqueda de fuentes de energía renovables se ha centrado recientemente en el aprovechamiento de la fotosíntesis y de los organismos que llevan a cabo este

proceso, habiéndose focalizado en gran medida sobre las microalgas (Greenwell y col., 2010; Williams y Laurens, 2010). Existen diversos procedimientos para transformar componentes de la biomasa de microalgas en combustibles, ya sea metano, etanol, hidrógeno o biodiésel (Wang y col., 2008).

La producción de bioetanol consta de dos fases realizadas por dos organismos diferentes: la generación fotosintética de biomasa y la conversión de parte de la misma en etanol, con desprendimiento de CO₂ (Nguyen y col., 2009; Posten y Schaub, 2009). Ambos procesos conllevan numerosos estadios a lo largo de los cuales se pierde eficiencia. Para reducir esta pérdida se podría unir ambos procesos en un solo organismo (Hirano y col., 1997). La producción mediante ingeniería metabólica de estirpes de cianobacterias capaces de generar fotosintéticamente etanol a partir de CO₂ (Deng y Coleman, 1999, Vidal, 2009), es una interesante alternativa a la producción de bioetanol en dos etapas.

Los aceites, base para la fabricación de biodiésel, se componen mayoritariamente de triglicéridos, con tres moléculas de ácido graso esterificadas con una molécula de glicerol. Los triglicéridos se hacen reaccionar con exceso de metanol en una reacción de transesterificación, generándose ésteres metílicos de los ácidos grasos (biodiésel) y glicerol como subproducto. Para la producción de biodiésel a partir de microalgas se precisa de biomasa con un alto contenido en ácidos grasos saturados o monoinsaturados. Las microalgas eucariotas, en general, pueden presentar un contenido en ácidos grasos de un 10-30% de los cuales, hasta el 70% pueden ser saturados y monoinsaturados dependiendo de las condiciones de cultivo y la estirpe empleada. En condiciones de estrés, como la ausencia de nitrógeno, algunas microalgas pueden incrementar la síntesis de ácidos grasos (Gouveia y Oliveira, 2009), favoreciéndose en algunos casos la producción de saturados y monoinsaturados (Piorreck y Pohl, 1984; Solovchenko y col., 2008).

I.2.1.6. Biorremediación

Aparte del posible empleo de cultivos de microalgas y cianobacterias para la eliminación de CO₂, considerado anteriormente, se han propuesto para estos microorganismos fotosintéticos múltiples aplicaciones vinculadas a la biorremediación, desde la retirada de metales pesados y pesticidas, hasta la depuración de aguas residuales. La principal contribución de las microalgas al tratamiento de aguas

residuales urbanas se fundamenta en la producción de oxígeno, que es empleado por las bacterias para la oxidación de la materia orgánica. A su vez, el crecimiento de microalgas, como *Chlorella* y *Scenedesmus*, facilita la retirada de nitrato, fosfato e iones metálicos (Mallik, 2002; Martínez y col., 2000). Muchas actividades industriales y agrícolas generan efluentes con sustancias tóxicas que deben ser retiradas para reducir el impacto ambiental. Las cianobacterias y microalgas pueden emplearse con este fin, como es el caso de la eliminación de fenol por *Phormidium valderianum* (Shashirekha y col., 1997) y de *Chlorella*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaena* o *Scenedesmus* que pueden emplearse para desactivar o retirar pesticidas y plaguicidas (Cáceres y col., 2008; El-Bestawy y col., 2007). Incluso el crudo puede ser degradado en medio marino por la actividad de ciertas cianobacterias (Raghukumar y col., 2001). Algunos exopolisacáridos tienen aplicación industrial en la concentración, adsorción, detección y eliminación de iones metálicos de aguas residuales debido al carácter aniónico que les confiere la presencia de ácidos urónicos en su composición (Bender y col., 1994; Lamelas y col., 2006).

Actividades industriales como la minería y la metalurgia generan efluentes con metales pesados que deben ser tratados (Nriagu y Pacyna, 1988). La toxicidad de los metales pesados, su capacidad para contaminar el agua y acumularse en la cadena trófica, junto con la necesidad de reutilizarlos debido a su escasez, ha motivado la búsqueda de soluciones al tratamiento de estos efluentes. De entre los metales pesados contenidos en efluentes industriales destacan plomo, níquel, cromo, cobre, zinc y cadmio, siendo este último el de mayor riesgo para la salud humana. El cadmio puede provocar fallo renal, degeneración ósea, insuficiencia respiratoria, daños en el hígado e hipertensión (Nordberg y col., 1993). Por ello forma parte de diversas listas negras como agente contaminante y compuesto carcinógeno (Informe EPA 40 CFR; Directiva europea 76/464/EEC). La captación y recuperación del cadmio y otros metales pesados puede llevarse a cabo mediante métodos físico-químicos como la precipitación, el intercambio iónico y métodos electrolíticos, pero son poco efectivos y costosos, particularmente cuando se trata de retirar metales pesados presentes en baja concentración (Aderhold y col., 1996; Atkinson y col., 1998). Por esta razón se ha centrado la atención en métodos biológicos utilizando biomasa procedente de hongos, algas, plantas, levaduras, bacterias, microalgas y cianobacterias (Singh y Goyal, 2007; Volesky y Holan, 1995). El empleo de biomasa de microalgas supone una ventaja frente a los métodos físico-químicos convencionales, ya que la velocidad de retirada de metales pesados es más rápida, es efectiva a concentraciones del orden de micromolar, la biomasa puede ser reutilizada y permite el tratamiento de vertidos

contaminados simultáneamente con varios metales (Wilde y Benemann, 1993). La retención del metal por parte de la biomasa puede ser un proceso metabólico (bioabsorción) o un proceso pasivo de unión a la superficie celular (bioadsorción). El proceso de bioadsorción está ligado a la presencia de grupos funcionales: carboxilatos, fosfatos, aminos, sulfidrilos y tioles, que establecen uniones reversibles con los iones metálicos. La quelación de metales por los exopolisacáridos aniónicos liberados por estos organismos aumenta su potencial para la biorremediación (Shah y col., 2000). En los procesos de bioadsorción se puede emplear biomasa inactiva, inmovilizada o liofilizada (Chojnacka y col., 2005; Katircioglu y col., 2008), evitándose el gasto de medio de cultivo (Garnham, 1997). La capacidad de retención de metales pesados puede variar con el pH (Hamdy, 2000), el soporte de inmovilización y el metal considerado (Blanco y col., 1999).

La aplicación comercial de microalgas para retener metales e iones ha sido cuestionada por el pequeño tamaño de las partículas, baja densidad, escasa resistencia mecánica y rigidez, además de la necesidad de la separación sólido-líquido (Volesky y Holan, 1995). La inmovilización de la biomasa en una matriz apropiada puede solucionar estos problemas derivados del empleo de organismos libres.

De forma general una célula inmovilizada se define como una célula viva cuyo movimiento se ve restringido total o parcialmente por su unión a un soporte o ligando, reteniendo sus propiedades y pudiendo ser utilizada repetidamente. Sólo en algunas ocasiones se puede emplear biomasa muerta. Los productos resultantes difunden fuera del soporte, facilitando su recogida mientras que la biomasa retenida se puede reutilizar en ciclos repetidos. Importantes cuestiones a valorar son: la eficiencia del sistema, el coste del soporte y el coste del proceso de inmovilización. Las principales ventajas de trabajar con sistemas inmovilizados son la alta concentración de biomasa en el sistema (Cohen, 2001), su elevada actividad metabólica (Lau y col., 1998), la mayor resistencia de las células a compuestos tóxicos (Cassidy y col., 1996), la simplicidad de manipulación, así como la posibilidad de coinmovilizar varios organismos. La mayoría de las técnicas de inmovilización utilizadas con microorganismos son de aplicación para microalgas, teniendo en consideración que se trata de organismos fotosintéticos, que requieren luz. La inmovilización puede ser pasiva o activa.

Inmovilización pasiva.- algunos grupos de microalgas tienen una tendencia natural a unirse a ciertas superficies y crecer sobre ellas (Robinson y col., 1986). Esta

característica se puede explotar para inmovilizar células sobre diversos soportes. Son procesos fácilmente reversibles, liberando las células y contaminando el medio circundante. Los soportes adsorbentes pueden ser naturales o sintéticos. Entre los naturales cabe destacar la esponja de lufa (soporte fibroso que envuelve los frutos del género *Luffa*), no tóxica ni reactiva, barata, resistente mecánicamente y estable en el tiempo (Liu y col., 1998). Este soporte se ha utilizado en la inmovilización de *Chlorella sorokiniana* para la remoción de níquel (Akhtar y col., 2004) y de *Synechococcus* sp. y *Phormidium* sp. para la retirada de cadmio (Iqbal y Saeed, 2011; Saeed e Iqbal, 2006). El problema de este soporte es la reproducibilidad de las experiencias, ya que la estructura varía de una planta a otra y según las condiciones de cultivo. Entre los materiales sintéticos utilizados para la inmovilización de microalgas se encuentran el polivinilo y el poliuretano empleados en la inmovilización de *Scenedesmus obliquus* para eliminar nitrato (Urrutia y col., 1995). Se han utilizado asimismo filamentos de *Anabaena* inmovilizados en vidrio para experiencias de producción de H₂ (Robinson y col., 1986).

Inmovilización activa.- implica la utilización de agentes floculantes, un ataque químico o la retención en geles (naturales o sintéticos). El polisacárido quitosano empleado en floculación, se ha utilizado para la recolección de microalgas del medio líquido, pero este proceso de inmovilización es poco utilizado por su inestabilidad. La inmovilización mediante ataque químico es de escasa utilidad para células vivas, porque se dañan las superficies celulares, afectándose la viabilidad. El método más ampliamente utilizado para inmovilizar algas es la retención en gel. Los soportes utilizados pueden ser sintéticos (acrilamida, resinas de entrecruzamiento, poliuretano), proteínas (gelatina, colágeno) o polisacáridos (agar, carragenato, alginato). Estas últimas matrices han sido las más utilizadas para microalgas. Moreno Garrido y col. (2005) inmovilizaron 11 estirpes de microalgas en perlas de alginato comprobando su estabilidad y utilidad para su empleo en la detección y remoción de metales pesados.

En general los soportes naturales son menos estables y vulnerables a degradación ambiental por bacterias. Sin embargo, difunden mejor y su producción es menos peligrosa (Leenen y col., 1996).

La inmovilización de microalgas en geles o polímeros aumenta la viabilidad de los organismos cuando se almacenan largos periodos de tiempo. Esta propiedad es muy práctica para el mantenimiento de colecciones de cultivos, ya que algunas estirpes, tras 3 años a 4 °C en ausencia de medio y en oscuridad encapsuladas en

alginato, recuperan la actividad al interactuar con medio fresco (Romo y Pérez Martínez, 1997; Chen, 2001 y 2003).

I.2.2. Cultivo de microalgas a la intemperie

La implantación de sistemas de producción masiva de microalgas a la intemperie representa una revolución en producción vegetal, en cuanto a los organismos y sistemas de cultivo empleados, que difieren considerablemente de los utilizados tradicionalmente en agricultura, si bien se encuentran igualmente sujetos a variación estacional. De hecho, tanto la temperatura como la radiación solar son factores que determinan la productividad de los cultivos fototróficos de algas al exterior. Los niveles de los principales nutrientes deben monitorizarse y mantenerse próximos a los establecidos como óptimos. El diseño y rendimiento del reactor son extremadamente importantes, así como sus condiciones de operación, entre las que destacan la densidad de población y la turbulencia, debiendo combinarse adecuadamente con el paso de luz (diámetro o profundidad) del sistema de cultivo, a efectos de propiciar la utilización de la irradiancia luminosa por las células del cultivo de la forma más eficiente (Borowitzka y Borowitzka 1988; Richmond 2004).

El costo de producción de la biomasa microalgal supone el principal factor limitante del éxito comercial de los sistemas de producción masiva. Si bien son esperables mejoras en las tecnologías de recogida y deshidratación de la biomasa, así como en la extracción y purificación de los productos específicos, la reducción más significativa de costos se derivaría de aumentos sustanciales en la productividad de los cultivos y del abaratamiento de los costos de construcción y mantenimiento de los reactores.

Los sistemas de cultivo empleados para el cultivo de microalgas pueden clasificarse como abiertos, semicerrados o cerrados, dependiendo del grado de contacto de la suspensión celular con la atmósfera. Se conoce gran variedad de sistemas para el cultivo de microalgas a la intemperie (Acién Fernández y col., 2007; Chisti, 2006; Richmond, 2004; Ugwu y col., 2008). La idoneidad del sistema de cultivo depende principalmente del organismo que se va a cultivar, la localización geográfica de la explotación, así como de las propiedades y el valor comercial del producto que se va a obtener (Borowitzka y Borowitzka, 1989).

I.2.2.1. Sistemas abiertos

Los estanques abiertos fueron los primeros sistemas de cultivo a la intemperie desarrollados a escala industrial para el cultivo de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*. La explotación de estos sistemas de cultivo puede ser intensiva o extensiva. El sistema abierto de tipo extensivo utiliza grandes superficies (entre 5 y 50 ha) sin agitación mecánica, con una orientación tal que la turbulencia ocasionada por los vientos predominantes en la zona permitan una cierta homogeneización y movimiento de la masa líquida. La explotación extensiva se corresponde con el modo de operación de los lagos naturales, que se han empleado en la producción de hasta $20 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ de biomasa comestible (Chaumont, 1993). Los sistemas de cultivos intensivos son estanques horizontales poco profundos tipo carrusel o *raceway*. Cada unidad de cultivo ocupa un área de entre varios cientos y pocos miles de metros cuadrados, estando compuesta de dos o más pistas niveladas de 2 a 10 m de ancho y 15-30 cm de profundidad, separadas entre sí por tabiques verticales, pudiendo adoptar un sistema de meandros. A lo largo de estos canales, cuyo piso y paredes suelen estar recubiertos por una capa de plástico inerte, fluye la suspensión celular a una velocidad de $0,2$ a $0,5 \text{ m s}^{-1}$, impulsada por la acción de paletas giratorias, hélices o bombas. El sistema se opera extrayendo la suspensión de manera intermitente y devolviendo al estanque en lo posible el líquido sobrante, una vez recogidas las células. La concentración de los diferentes nutrientes se estima a intervalos regulares, corrigiéndose para evitar limitaciones en los mismos. El carbono inorgánico se suministra según las necesidades del cultivo, lo que se controla generalmente por medio de un pHstato y una válvula solenoide, de forma que se insufla CO_2 cuando el pH supere un valor crítico, hasta restablecer el pH óptimo para el crecimiento. El cultivo en masa de microalgas en estanques abiertos combina características típicas de los cultivos agrícolas (uso extensivo de terreno, agua y nutrientes, así como dependencia del clima y de la radiación solar), con otras que asemejan la acuicultura y, sobre todo, con aquellas propias de procesos industriales para el cultivo de microorganismos, tales como operación continua, aporte dosificado de nutrientes y control del proceso de producción (Guerrero, 2009).

Este reactor es el más económico y sencillo, aunque su explotación presenta notables limitaciones debido a la falta de control de temperatura y al empleo ineficiente de la luz. Se alcanzan valores bajos de densidad celular puesto que el paso de luz es amplio (20-30 cm), y la agitación con paletas no permite la apropiada sucesión de ciclos de luz-oscuridad que requieren los cultivos de microorganismos fotosintéticos

(Grobbelaar, 1994) ni una buena transferencia de materia. El control de la temperatura es inviable debido a las dimensiones de las instalaciones, por ello la mayoría de las explotaciones al exterior de microalgas en estanques se realizan en climas templados. En algunos casos, los cultivos son posibles únicamente en determinadas épocas del año (Borowitzka, 1999). Las características de los sistemas abiertos dificultan el mantenimiento de cultivos monoalgales y libres de predadores, por lo que su empleo a gran escala se ha limitado a estirpes de muy rápido crecimiento (*Chlorella*) o que se desarrollan adecuadamente en condiciones restrictivas de pH (*Arthrospira*) o salinidad (*Dunaliella*).

I.2.2.2. Sistemas cerrados y semicerrados

Los sistemas de cultivo cerrados, de mayor sofisticación tecnológica, representan la alternativa a los estanques abiertos, aportando mejores y más controladas condiciones para cultivar cualquier microalga, dificultando la invasión por organismos contaminantes. (Pulz, 2001).

Los sistemas cerrados presentan múltiples ventajas frente a los reactores abiertos como un uso más eficiente de la irradiancia, que conduce a la producción de cultivos más concentrados, la posibilidad de cultivar todo el año, una disminución de las pérdidas por evaporación, un mejor control de algunas variables como la temperatura y mayor facilidad de operación en continuo (Borowitzka, 1999; Grobbelaar, 2009; Tredici y Materassi, 1992).

Los reactores cerrados son apropiados para el cultivo de microalgas que generen productos de interés de alto valor comercial, puesto que el coste de construcción y mantenimiento de estos reactores es elevado. Este hecho, unido al riesgo de inhibición de la fotosíntesis por la presencia de oxígeno, y la complejidad de su escalado, suponen los inconvenientes principales de los sistemas de cultivo cerrados (Eriksen, 2008).

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

1.2.2.2.a. Reactor tubular

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

1.2.2.2.b. Reactor plano vertical

En los reactores planos, el cultivo queda dispuesto en una lámina orientada para que la luz incida directamente sobre ella. Los primeros reactores planos se desarrollaron en la década de los 50 (Burlew, 1953). Su diseño y componentes han variado desde su origen (Hu y Richmond, 1996; Pulz y col., 1995; Tredici y Materassi 1992) hasta la actual bolsa de PVC contenida y soportada por una estructura rígida, que supone una reducción sustancial del coste de estos reactores (Sierra y col., 2008; Tredici y Rodolfi, 2004). El sistema puede termostatizarse mediante un intercambiador de calor colocado en su interior o por aspersion de agua. La agitación se realiza

generalmente inyectando aire en la base del mismo, lo que supone en algunos casos estrés hidrodinámico para las células (Sánchez Mirón y col., 1999). La operación puede estar controlada y automatizada. Estos sistemas semiabiertos, con propiedades híbridas de estanques y sistemas cerrados, presentan un interesante potencial para su empleo en aproximaciones masivas, como las dirigidas al aprovechamiento de las microalgas para la captura de CO₂ y/o la generación de biomasa para su empleo como materia prima de biocombustibles. Se ha citado mayor productividad por unidad de área para estos sistemas que la de estanques y reactores tubulares para el cultivo de *Chlorella* en Alemania (Pulz y col., 1995).

I.2.3. Factores que afectan a la productividad de los cultivos a la intemperie

La irradiancia es el factor más relevante en el cultivo a la intemperie de microalgas, debiendo establecerse condiciones en las que las células utilicen de forma óptima la luz solar incidente, para así maximizar la productividad. Entre los factores a considerar, densidad celular, agitación y profundidad son de especial relevancia a este respecto (Acién Fernández y col., 1998; Richmond y Hu, 1997). Todos estos factores influyen en la cantidad de luz que reciben las células, que están sometidas a periodos intermitentes de luz y oscuridad, debido a su desplazamiento por el reactor entre la zona más superficial del mismo y la zona donde las células están fotolimitadas debido al efecto del sombreado. La sucesión de los periodos de luz-oscuridad influencia la productividad del cultivo (Acién Fernández y col., 2003). La irradiancia promedio es un indicativo de la irradiancia que recibe una célula que se desplaza aleatoriamente por el interior del reactor (Molina Grima y col., 1999). A pesar del efecto del sombreado, la mayoría de los cultivos a la intemperie están sometidos a saturación lumínica (fotoinhibición), lo que supone en su conjunto una gran limitación en la eficiencia del empleo de la irradiancia, aprovechándose sólo entre el 5 y el 10% de la irradiancia incidente (Goldman, 1979). Este hecho condiciona el valor de la eficiencia fotosintética, indicativa de la capacidad de almacenar la energía lumínica en forma de biomasa (Acién Fernández y col., 1998).

La temperatura es, después de la irradiancia, el factor más influyente en la productividad de los cultivos a la intemperie. Cada estirpe tiene una temperatura óptima de crecimiento que limita su distribución ecológica (Payer y col, 1980) y que debe ser considerada en su explotación al exterior. Así, el cultivo de *Spirulina*, es dominante a temperaturas superiores a 25 °C y es contaminado por *Chlorella* sp.

cuando la temperatura desciende (Vonshak y col., 1983). Los sistemas de cultivo a la intemperie a gran escala requieren una gran inversión para ser atemperados, de forma que para reducir el coste la mayoría de las explotaciones se sitúan en climas cálidos. Se han descrito una variedad de métodos para el control de la temperatura, como sumergir la región fotosintéticamente activa del reactor en una piscina con agua a temperatura controlada, instalar intercambiadores de calor, situar las instalaciones bajo invernadero, o pulverizar la superficie del reactor con agua cuando la temperatura excede un determinado valor (Chisti, 2007; Lehr y Posten, 2009; Rodolfi y col., 2009).

La velocidad de circulación del cultivo, que viene determinada por la agitación del mismo, es otro de los parámetros más relevantes en la productividad de microalgas, independientemente del tipo de reactor empleado (Grobbehaar, 1994; Richmond y Hu, 1997). La agitación determina la mezcla del medio, la distribución de las células en el reactor, la disponibilidad de nutrientes, la retirada del O₂ y la absorción de CO₂ (Hu y Richmond, 1996). Una función fundamental de la agitación es evitar la sedimentación de las microalgas, ya que, si se produce acumulación de células, disminuye la productividad, aumentando el riesgo de contaminación y deterioro del cultivo. Además la agitación del cultivo está directamente relacionada con la alternancia luz-oscuridad que experimentan las células, debido a su desplazamiento dentro del reactor, y con el aprovechamiento de la luz por parte de las microalgas (Janssen y col., 2002). La tecnología apropiada para la agitación depende de la configuración del sistema de cultivo, aunque es común aunar agitación, aporte de CO₂ y retirada de O₂ usando una corriente de aireación.

En condiciones naturales, el metabolismo y crecimiento de los organismos fotosintéticos provoca una disminución de la concentración de carbono inorgánico disuelto, específicamente en sus formas CO₂ y bicarbonato, incrementándose el pH del medio. El cambio del pH puede provocar la disociación de sales, y puede reducir la solubilidad de algunos elementos traza necesarios para el crecimiento de las microalgas. En los cultivos de microalgas es importante mantener el pH en los límites de tolerancia del organismo en cuestión, para lo que se puede utilizar un medio de cultivo tamponado e inyectar CO₂. El suministro de CO₂ puede ser continuo o a demanda, ya sea mezclado con aire (Chini Zitelli y col., 1996) o inyectado directamente al cultivo (Molina Grima y col., 1994). La transferencia de CO₂ al medio líquido es ineficiente, de manera que la inyección de CO₂ puede ser uno de los componentes más costosos en la producción de microalgas (Putt y col., 2011). Se puede incrementar la eficiencia de la transferencia gas-líquido de CO₂, mediante el

aumento de la concentración de CO₂ en la mezcla gaseosa (Jacob Lopes y col., 2008), recirculando el gas saliente de los reactores o disponiendo de varios reactores en cadena (Jacob Lopes y col., 2009).

La concentración de nutrientes en el medio de cultivo generalmente excede los requerimientos nutricionales, ya que parte de estos nutrientes pueden precipitar por cambios en el pH y la temperatura, disminuyendo su disponibilidad. Este aspecto es fundamental en el caso de los nutrientes esenciales: carbono, nitrato, fosfato, azufre, hierro e incluso silicio (Reboloso Fuentes y col., 2001). Para reducir el coste del medio de cultivo, en el caso de estirpes marinas se puede emplear agua del mar suplementada con nitrato, fosfato y algunos micronutrientes (Molina Grima y col., 1999; Van Bergeijk y col., 2010), e incluso aguas residuales para el crecimiento mixotrófico y heterotrófico de microalgas (Markou y Georgakakis, 2011).

I.2.4. Cosechado de la biomasa

Uno de los procesos más costosos de la producción a gran escala de microalgas es la recogida de la biomasa, que supone un 20-30% del coste total. Los procesos habitualmente empleados en la recuperación de biomasa son: centrifugación, filtración y sedimentación gravitacional. Para productos de escaso valor de mercado, la opción más adecuada es la sedimentación gravitacional o la recuperación por flotación (Kim y col., 2005). Estos procesos pueden estar precedidos por un paso previo de floculación para reducir el volumen de cultivo (Molina Grima y col., 2003). Los floculantes que se emplean comúnmente y con mejor resultado son sales metálicas como cloruro férrico (Chow y col., 1998), sulfato de aluminio y sulfato férrico. También se han descrito, procesos de autofloculación vinculados a la presencia de EPS (Lavoie y de la Noüe, 1986) o a la modificación del pH (Knuckey y col., 2006) y la temperatura (González López y col., 2009).

I.3. LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son eubacterias gram-negativas fototautotróficas que realizan fotosíntesis oxigénica similar a la de plantas superiores, contribuyendo significativamente a la productividad primaria de los océanos (Ting y col., 2002; 2009).

Los datos geológicos más recientes, junto al análisis comparativo de genomas cianobacterianos y de bacterias fotosintéticas anaerobias, sugieren que los primeros microorganismos eran ancestros anaeróbicos de cianobacterias (Allen y Martin, 2007; Mulkidjanian y col., 2006), apareciendo posteriormente los primeros organismos aeróbicos. Aunque existe controversia acerca de la datación exacta, actualmente se acepta que las primeras cianobacterias fotosintéticas productoras de oxígeno aparecieron hace entre 3400 y 2300 millones de años (Allen y Martin, 2007; Fischer, 2008; Summons y col., 1999). La aparición de la fotosíntesis oxigénica tuvo como consecuencia un incremento del oxígeno atmosférico hace unos 2300 millones de años (Bekker y col., 2004), con un profundo impacto en la química de la atmósfera terrestre. El cambio de una atmósfera reductora a una atmósfera oxidante, debido a la proliferación de las primeras cianobacterias, condicionó la evolución del resto de organismos.

A pesar de ser organismos fotoautotróficos, algunas cianobacterias son capaces de vivir en oscuridad alimentándose de sustratos orgánicos, y otras realizan fotosíntesis anoxigénica con azufre como donador de electrones (Oren y Shilo, 1979; Padan y Cohen, 1982). La diversidad fisiológica de este grupo de microorganismos les confiere una amplia distribución ecológica (Whitton y Potts, 2000). En la mayoría de los hábitats naturales iluminados estudiados, ya sean acuáticos, terrestres o ambientes extremos, se ha registrado con frecuencia abundante presencia de cianobacterias (Thajuddin y Subramanian, 2005).

Las cianobacterias se han diversificado a lo largo de la evolución en formas unicelulares y multicelulares. Las multicelulares son denominadas tricomas, y pueden estar formadas por cientos de células en el caso de algunas especies. La mayoría de las cianobacterias se dividen por fisión binaria, pero algunas lo hacen siguiendo patrones típicos de bacterias mediante fisión múltiple o gemación. Algunas cianobacterias filamentosas presentan células diferenciadas en heterocistos, aquinetos y/o hormogonios. Los heterocistos son las células especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico, los aquinetos son formas de resistencia (esporas) y los hormogonios son pequeños filamentos móviles para la dispersión de especies bentónicas (Rippka y col., 1979).

El aparato fotosintético de las cianobacterias contiene dos fotosistemas similares a los de plantas superiores, localizados en la membrana tilacoidal. La mayoría poseen exclusivamente clorofila *a*, aunque algunos géneros, que se engloban

en un grupo denominado proclorofitas, poseen también clorofila *b*, típica de eucariotas fotosintéticos, y excepcionalmente, la especie *Acaryochloris marina* contiene fundamentalmente clorofila *d* (Maquardt y col., 1997; Schiller y col., 1997). Una característica distintiva de las cianobacterias es la presencia de ficobilisomas en su aparato fotosintético. Los ficobilisomas son complejos supramoleculares de ficobiliproteínas que actúan como principales pigmentos antena del fotosistema II, presente también en algas rojas (Grossman y col., 1993). Las ficobiliproteínas, que constituyen hasta el 50% del contenido proteico de la célula, son polipéptidos unidos covalentemente a ficobilinas, o cromóforos. Su función es la captación activa de luz, permitiendo a las cianobacterias adaptarse a la intensidad y calidad de luz. Las proclorofitas carecen de ficobilisomas y poseen complejos captadores de luz diferentes al resto de cianobacterias (Ting y col., 2002).

En la naturaleza, la mayoría de cianobacterias están sometidas a ciclos diarios de luz-oscuridad. Actividades tan diversas como la división celular, el transporte de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la respiración o la síntesis de glucógeno se encuentran bajo el control de dicho reloj (Kucho y col., 2005).

La asimilación fotosintética de CO₂ asociada a la cadena de transporte de electrones fotosintética se realiza a través del ciclo reductivo de las pentosas fosfato o ciclo de Calvin. El carbono fijado es conducido a un ciclo de Krebs incompleto, con un papel esencialmente anabólico, al carecer del complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa, por lo que genera α -cetoglutarato como producto final. El α -cetoglutarato es el esqueleto carbonado sobre el que se incorpora el nitrógeno amónico, siendo el compuesto esencial a través del que se conectan los metabolismos de carbono y nitrógeno.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de N₂ a NH₄⁺ por el complejo enzimático nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera. Esta enzima se inactiva irreversiblemente con la presencia de oxígeno, de manera que la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis no pueden realizarse simultáneamente. Algunas cianobacterias han desarrollado distintas estrategias como expresar la nitrogenasa sólo en condiciones de anaerobiosis, separar temporalmente la fotosíntesis y la fijación del nitrógeno o confinar la nitrogenasa en un pequeño porcentaje de las células que no realizan la fotosíntesis oxigénica (Gallon, 2001). En el último grupo,

formado por algunas cianobacterias filamentosas, la separación espacial se basa en la diferenciación de células especializadas para la fijación de nitrógeno denominadas heterocistos. Estas células no son fotosintéticamente activas al carecer de fotosistema II (Donze y col., 1972), y además presentan una cubierta de glicolípidos que su vez está protegida por una capa de polisacáridos dificultando la difusión de O₂ (Flores y Herrero, 2010). Las células vegetativas adyacentes a los heterocistos transfieren compuestos reducidos en forma de azúcares a los heterocistos que, mediante la glutamina sintetasa, son transformados en glutamina y devueltos a las células vegetativas. El proceso de diferenciación es una de las respuestas celulares a la ausencia de nitrógeno combinado, y está gobernado por la proteína reguladora NtcA. Además de NtcA, para la formación de heterocistos se requiere un regulador específico de la diferenciación HetR (Flores y Herrero, 2010). Dos de los géneros más representativos de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos son *Nostoc* y *Anabaena* que presentan un 7% de las células diferenciadas en heterocistos a intervalos regulares (Böhme, 1998). Cianobacterias pertenecientes a estos géneros son de gran interés biotecnológico debido a su capacidad para crecer en todo tipo de ambientes en ausencia de una fuente de nitrógeno combinado y a la gran diversidad de metabolitos que sintetizan (Berry y col., 2008; Dembitsky y Rezanka, 2005; El-Bestawy, 2008). La concurrencia de dos procesos metabólicos tan importantes como la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis en las cianobacterias las hace organismos únicos y de vital importancia para el mantenimiento de la biosfera.

I.3.1. *Anabaena* sp. ATCC 33047

Anabaena sp. ATCC 33047 es una cianobacteria filamentosas formadora de heterocistos y fijadora de nitrógeno, perteneciente al sección IV de la clasificación de Rippka y col. (1979). Este grupo incluye las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos que siguen un patrón lineal de división.

Anabaena sp. ATCC 33047, denominada originalmente como *Anabaena* CA (Stacey y col., 1977) posee características de interés biotecnológico, como una elevada tasa de crecimiento en condiciones diazotróficas (Stacey y col., 1977) y fácil cosechado por su capacidad de sedimentación-floculación. Su alto contenido en ficobiliproteínas amplía su aplicabilidad industrial como fuente de productos de interés (Moreno y col. 1995, 2003; Xiankong y col., 1983). Su carácter de organismo fijador de nitrógeno incide en la reducción de coste del medio de cultivo, al no requerir fertilizante

nitrogenado, disminuyéndose por otra parte el riesgo de contaminación por organismos no diazotróficos. Presenta una gran tolerancia a variaciones de pH y temperatura, lo que contribuye a su consideración como organismo idóneo para su cultivo a la intemperie (Moreno y col., 1995).



Figura 3. Imagen al microscopio óptico de *Anabaena* sp. ATCC 33047.

En determinadas condiciones de cultivo, *Anabaena* sp. ATCC 33047 produce un exopolisacárido (Figura 3) que presenta interesantes propiedades en relación a su aprovechamiento práctico, ya que tiene un comportamiento pseudoplástico similar al de la goma xantano. La caracterización del EPS de *Anabaena* sp. ATCC 33047 realizada por Moreno y col. (2000) revela que está compuesto por xilosa, galactosa, glucosa, y manosa, siendo el componente mayoritario la xilosa. El alto contenido en ácido urónico del EPS (19% del peso seco) y la presencia de material polipeptídico (7% del peso seco), le confiere un marcado carácter aniónico (Moreno y col., 1995).

Todas estas consideraciones hacen de *Anabaena* un organismo idóneo para su empleo en la fijación de CO₂ procedente de gases de combustión, como se recoge en la patente de García Guerrero y col. (2006). La retirada de CO₂ estaría vinculada a la producción de compuestos de interés biotecnológico, ya sea EPS, biomasa o ambos.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo es desarrollar una tecnología para la eliminación de CO₂ en gases de escape de industrias emisoras de este gas, mediante la generación de biomasa y exopolisacáridos por cultivos de *Anabaena* sp. ATCC 33047. Son objetivos concretos del proyecto:

1. Optimizar las condiciones de cultivo de *Anabaena* sp. ATCC 33047 para obtener la máxima producción de materia orgánica.
2. Seleccionar el sistema de cultivo a la intemperie más apropiado de entre las opciones siguientes: estanque, reactor plano vertical y reactor tubular.
3. Establecer condiciones idóneas de operación de los sistemas de cultivo para una eficiente generación de los productos.
4. Determinar métodos útiles para la separación de la materia orgánica y la extracción del exopolisacárido de *Anabaena* sp. ATCC 33047.
5. Aplicar la biomasa de *Anabaena* sp. ATCC 33047 para la biorremediación de metales pesados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO

En este trabajo se utiliza la cianobacteria filamentosa, fijadora de nitrógeno, *Anabaena* sp. ATCC 33047 procedente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection) de Rockville (EE.UU.).

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de *Anabaena* es una modificación del medio Arnon (Arnon y col., 1974) descrita por Moreno y col. (1987) cuya composición se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de *Anabaena*.

Componente	Concentración (mM)
NaCl	85,86
KCl	8,05
NaVO ₃	1,96 x 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	5,21 x 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	46,26 x 10 ⁻³
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,15 x 10 ⁻³
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,77 x 10 ⁻³
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,32 x 10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,17 x 10 ⁻³
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,34
KH ₂ PO ₄	1,00
NaHCO ₃	50,00

El medio de cultivo contiene además 1 ml de una solución de Fe-EDTA que se prepara disolviendo, por una parte 16 g de EDTA y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua destilada y por otra parte 13,7 g de FeSO₄·7H₂O en 364 ml de agua destilada. Una vez preparadas ambas soluciones, se mezclan y se gasea con aire durante 10-12 horas, hasta que adquiera un color oscuro como consecuencia de la oxidación. Se almacena a 4 °C, en oscuridad.

Para evitar la precipitación del medio de cultivo es necesario preparar de manera independiente la solución que contiene KH_2PO_4 y NaHCO_3 y la solución base con el resto de los componentes. Las dos soluciones se esterilizan en autoclave por separado y, una vez frías, se mezclan en el momento de su uso.

La conservación y mantenimiento de la estirpe en condiciones de esterilidad se efectúa en tubos de agar inclinado. El medio sólido se prepara suplementando el medio líquido anteriormente descrito con Bactoagar-Difco al 1,5% (p/v). Se realizan resiembras cada 6 semanas.

Los cultivos líquidos utilizados como inóculo para los distintos experimentos se crecen fotoautotróficamente en cámara climatizada a 30 °C, en condiciones axénicas, utilizando tubos cilíndricos de base cónica de 4,5 cm de diámetro y 200 ml de capacidad, conteniendo 150 ml del medio inorgánico estándar descrito en el apartado anterior. Los tubos cilíndricos se tapan con algodón hidrófobo atravesado por una varilla de vidrio que alcanza el fondo del recipiente. La mezcla gaseosa aportada a los cultivos se compone de aire suplementado con CO_2 al 1% (v/v) que se pasa por un filtro *Millipore* de 0,2 μm \varnothing . La iluminación de los inóculos se lleva a cabo con una batería de tubos fluorescentes (daylight-20W *PHILIPS*), que suministran al cultivo una irradiancia incidente de 70-80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4). En el primer salto de escala para la generación de inóculo se emplean frascos de Roux (1 l) preparados de manera similar y en las mismas condiciones de cultivo.



Figura 4. Cultivos de mantenimiento de *Anabaena* sp. ATCC 33047.

III.2. CULTIVO EN FOTOQUIMIOSTATOS

El cultivo en laboratorio en régimen continuo se desarrolla en fotoquimiostatos tipo columna de burbujeo de 1,8 l de capacidad (Figura 5). Las dimensiones se detallan en la Figura 6. Están provistos de doble pared, formando una camisa de termostatación por la que se hace circular agua procedente de un baño para mantener la temperatura de cultivo. Para su operación en modo continuo, dispone de una salida por rebosadero que sirve de punto de toma la muestra. La parte superior se cierra con un tapón atravesado por una varilla de vidrio de 4 mm de diámetro interno que permite la entrada de medio fresco. La varilla alcanza la mitad del reactor, para asegurar la mezcla adecuada del medio incorporado.



Figura 5. Instalación de fotoquimiostatos.

El suministro de aire y de CO₂ se realiza por la base del reactor, a través de una tubería de silicona de 5 mm de diámetro interno, que atraviesa el tapón. Este sistema de aireación asegura la homogeneización del cultivo. El caudal de aire se regula mediante rotámetros. Para el control de pH, el reactor dispone de un electrodo combinado de pH (*Crison*, modelo 3100/225), conectado a un medidor-controlador de pH (*Crison*, modelo pH 214/220-R1). Este sistema mantiene el pH del cultivo en el intervalo de consigna establecido (entre 8,90 y 9,0). El controlador actúa sobre una electroválvula, de manera que al superar el valor de pH 9,0 la electroválvula abre el paso de CO₂ puro hasta recuperar el pH 8,9, cerrándose de nuevo.

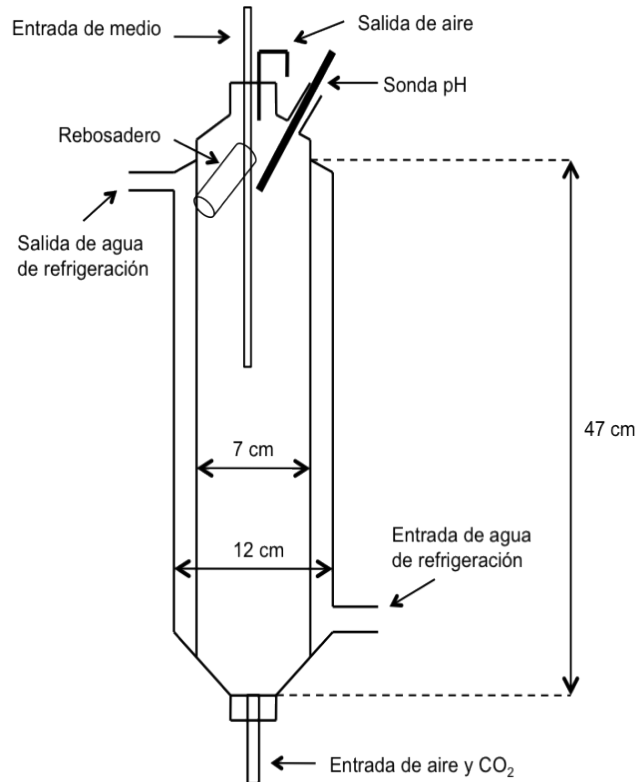


Figura 6. Esquema del fotoquimiostato empleado en los experimentos en continuo.

El medio de cultivo a añadir en la operación en continuo se distribuye en 2 recipientes de 10 litros de capacidad para evitar la precipitación de las soluciones. Uno contiene fosfato y bicarbonato y el otro el resto de las sales, mezclándose mediante una “Y” de poliuretano a la entrada de la bomba peristáltica (P-3, *Pharmacia*), que inyecta medio en continuo las 12 horas de iluminación, al flujo establecido para cada experimento.

Los reactores se iluminan 12 horas mediante un sistema de tubos fluorescentes de potencia regulable mediante reostatos, controlados por una aplicación informática desarrollada por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, que permite modificar la irradiancia simulando un ciclo circadiano, desde 0 hasta $2800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada reactor se ilumina con 6 tubos fluorescentes de 50 cm, *Osram* FQ 24W/840 HO que lo rodean completamente, asegurando una iluminación homogénea.

III.3. CULTIVO A LA INTEMPERIE

La instalación de cultivos a la intemperie se sitúa en la azotea del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja en Sevilla (latitud 37° 24' 43", longitud 6° 0' 25") y consta de fotobiorreactor tubular, estanques y reactores planos verticales.

III.3.1. Cultivo en estanque de 1m²

Los estanques son de poliéster y fibra de vidrio, (1,25 x 0,8m) operados a 10 cm de profundidad (volumen de cultivo, 100 l). Están divididos a lo largo de su eje longitudinal por un tabique vertical de 0,75 m de longitud, con objeto de formar dos canales de circulación. Próximos a cada uno de los extremos del tabique longitudinal se disponen dos pequeños tabiques verticales curvos del mismo material para facilitar la circulación de la suspensión celular (Figura 7).



Figura 7. Cultivo en estanques. Estanques de 3 m² (izquierda) y 1 m² (derecha).

La agitación se consigue mediante un motor que hace girar a velocidad regulable tres paletas de 28 x 32 cm de superficie, dispuestas en ángulos de 120 °C

entre sí, sumergidas parcialmente en la suspensión celular, proporcionando así una turbulencia continua que promueve el desplazamiento de la suspensión celular a una velocidad de $0,3 \text{ m s}^{-1}$ (16 r.p.m.).

El pH se controla mediante la inyección de CO_2 en burbujas de pequeño tamaño a través de un tubo poroso situado en el fondo del estanque. Un electrodo de pH (HI 2910, *Hanna Instruments*) sumergido en la suspensión envía la señal al controlador (HI 931700, *Hanna Instruments*) para activar la electroválvula que permite la entrada de CO_2 cuando el pH supera el valor determinado. Este sistema no dispone de control de temperatura.

Los cultivos se mantienen en régimen semicontinuo, renovándose parcialmente la suspensión celular con medio fresco, hasta dejar el cultivo a la densidad celular mínima establecida en cada experimento.

Los estanques se inoculan con biomasa adaptada a la intemperie a una densidad inicial de $0,2 \text{ g l}^{-1}$. Previo a la toma de las muestras se completa el volumen perdido por evaporación.

III.3.2. Cultivo en fotobiorreactor tubular

El fotobiorreactor tubular (Figura 8) está constituido por tubos de plexiglas de 2,4 cm de diámetro interno y 90 m de longitud, con una superficie fotosintéticamente activa de $2,2 \text{ m}^2$, superficie total 12 m^2 y volumen útil 55 l. Está provisto de un sistema *air-lift* para impulsar la suspensión celular a través de los tubos a una velocidad de $0,3 \text{ m s}^{-1}$. Para evitar el depósito de células en las paredes de los tubos, se hacen circular dos bolas de caucho de diámetro ligeramente inferior al diámetro interior de los tubos.

Este sistema de cultivo está constituido por un compresor de aire a presión, que provoca la circulación y agitación de la suspensión celular, tubos transparentes, donde se realiza mayoritariamente la fotosíntesis, situados en paralelo y conectados entre sí por medio de piezas en forma de “u” del mismo material, y un cilindro de degasificación. Los tubos se encuentran sumergidos en agua, que actúa como elemento termostizador del cultivo, en una piscina de dimensiones 1,8 x 6,0 x 0,15 m, provista de circuito cerrado de circulación con elementos calentadores y enfriadores. El sistema impulsor de aire (*air-lift*) termina en un cilindro de 52 cm de alto

por 26 cm de diámetro externo, situado a 2,8 m de altura desde la horizontal del reactor, donde se desprende el O_2 generado durante el recorrido por los tubos horizontales. En este cilindro se encuentran los orificios de salida de gas, protegidos por filtros de 0,2 μm , la entrada para llenado rápido del reactor, la entrada de medio fresco para operar en continuo, el sensor de nivel y la entrada de aire, previo paso por un filtro de 0,2 μm , además de las sondas de pH y temperatura.

El pH del cultivo se mantiene constante mediante la inyección de CO_2 a demanda. Cuando el electrodo de pH detecta un valor superior a 8,5 se activa un controlador (I-252, *Crison*) de manera que la electroválvula permite la entrada de CO_2 .



Figura 8. Fotobiorreactor tubular.

El reactor tubular (RT) se inocula a una densidad celular de 0,6 g l^{-1} a partir de cultivos en cámara.

III.3.3. Cultivo en reactor plano vertical

Los reactores planos verticales (RPV) están formados por una estructura rígida de hierro que sustenta un recipiente tipo bolsa que contiene el cultivo (Sierra y col., 2008) como se muestra en la Figura 9. Las dimensiones de la estructura son 1,5 m de alto por 2,5 m de largo, con una separación de 7 cm entre las dos láminas, que es el

paso de luz del cultivo. Atendiendo a estas dimensiones, el volumen de cultivo es 350 ó 400 l dependiendo de la altura hasta la que se complete el reactor. La superficie total ocupada por el reactor es 2,5 m² al considerar 1 metro de separación entre varios RPV dispuestos en paralelo. El material de la bolsa de cultivo es poliuretano de 0,74 µm de espesor y 95% trasmittancia en el espectro fotosintéticamente activo.

Un tubo de metal perforado cada 10 cm situado en la base de la bolsa, suministra aire a 8,6 l aire l⁻¹ cultivo h⁻¹ para mantener el cultivo en suspensión. Por este mismo tubo se dispensa CO₂ a demanda para mantener el pH del cultivo a 8,5.



Figura 9. Reactor plano vertical.

Un intercambiador de calor de acero en forma de serpentín, de 9 m de longitud, con una sección de 25 mm de diámetro, ubicado dentro de la bolsa, a través del cual circula agua fría o caliente permite mantener la temperatura del cultivo en un intervalo de ± 5 °C respecto a la preestablecida.

El RPV se inocula con biomasa previamente adaptada al exterior, a una densidad celular inicial superior a 0,2 g l⁻¹ para asegurar la viabilidad del inóculo. Se recupera el volumen perdido por evaporación previo a la toma de muestras.

III.4. MÉTODOS Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS

III.4.1. Determinación de la concentración de biomasa

La determinación de biomasa se realiza a partir de la medida de turbidez del cultivo (densidad óptica a 700 nm) relacionada con el peso seco mediante una recta patrón, según la ecuación:

$$\text{Biomasa (g l}^{-1}\text{)} = 0,647 \cdot \text{Abs}_{700\text{nm}} \quad \text{[Ecuación 1]}$$

El peso seco se determina centrifugando el cultivo (12000 xg) y secándolo en estufa a 80 °C, en tubos de centrifuga previamente tarados. El peso de la biomasa se calcula por diferencia de pesada.

En algunas experiencias de inmovilización la biomasa se calcula a partir del contenido en clorofila, considerando que ésta supone el 1,5% del peso seco de la biomasa. El contenido en clorofila se determina por extracción en metanol según el método descrito por Mackinney (1941) y empleando un coeficiente de extinción de 74,46 mg⁻¹ ml cm⁻¹.

III.4.2. Determinación del carbono orgánico total

Para la determinación de carbono orgánico total (*Total Organic Carbon*, TOC) se emplea un analizador de carbono orgánico elemental TOC-V_{CSH} (*Shimadzu*) con el módulo de inyección automático ASI-V (*Shimadzu*). Las muestras se diluyen en agua ultrapura hasta una concentración apropiada para el rango de sensibilidad del analizador. Las muestras se agitan continuamente para evitar su sedimentación.

El contenido en TOC de la muestra se calcula por diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico. La inyección de la muestra en una cámara de reacción, rellena con un catalizador oxidante, a 680°C, provoca la vaporización del agua y la oxidación del carbono total (orgánico e inorgánico) a CO₂. Este CO₂ se transporta en corriente de aire y se mide en un analizador de infrarrojos no dispersivo. El carbono inorgánico se determina en otra cámara de reacción distinta, que contiene ácido fosfórico al 25%. Bajo condiciones ácidas todo el carbono inorgánico se convierte en

CO₂, que se mide en el analizador de infrarrojos. En estas condiciones el carbono orgánico no se oxida, por lo que sólo se determina el carbono inorgánico.

La señal del analizador de infrarrojos se compara con los valores de las rectas patrón de carbono total y carbono inorgánico realizadas previamente a partir de soluciones de ftalato de hidrógeno de potasio (C₈H₅KO₈), y Na₂CO₃/HNaCO₃, respectivamente.

III.4.3. Determinación de componentes celulares

III.4.3.1. Determinación de carbohidratos

Para determinar el contenido en carbohidratos se emplea el método de Dubois y col. (1956), siguiendo la técnica descrita por Kochert (1978). El método se basa en la reacción del grupo reductor libre de los carbohidratos con fenol en medio ácido (ácido sulfúrico) para producir un complejo de color anaranjado. El reactivo de fenol se prepara disolviendo 8,1 g de fenol en agua destilada, hasta un volumen total de 10 ml.

Para el procedimiento de determinación espectrofotométrica, a una alícuota de 0,1 ml de muestra dispuesta en un tubo de ensayo, se añaden 0,9 ml de agua destilada, adicionándose entonces 25 µl de reactivo del fenol y, tras agitar, 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado (98%). Después de homogenizar por agitación, y tras 30 minutos de reposo a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 485 nm frente a un blanco de 1,0 ml de agua destilada tratado de la misma forma que las muestras problema. La concentración de carbohidratos se calcula por referencia a una recta de calibrado obtenida con una serie de patrones preparados con cantidades conocidas de glucosa, tratados de la misma forma que las muestras problema.

La concentración de carbohidratos totales en el cultivo (CHT) se calcula siguiendo la Ecuación 2. Debido a la dificultad de la separación de la biomasa y el EPS se recurre a la Ecuación 3 para el cálculo del contenido en EPS. En dicha expresión se resta a los carbohidratos totales, los contenidos en la biomasa (estimados en un 25% de la biomasa total).

$$\text{CHT (g l}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs}_{485\text{nm}} - 0,008}{0,0148 \times \text{Vol.muestra (}\mu\text{l)}} \quad \text{[Ecuación 2]}$$

$$\text{EPS}(\text{gl}^{-1}) = \text{CHT}(\text{gl}^{-1}) - [0,25 \times \text{biomasa}(\text{gl}^{-1})] \quad \text{[Ecuación 3]}$$

III.4.3.2. Determinación de proteínas

La determinación del contenido en proteínas de la biomasa se realiza siguiendo el método descrito por Lowry y col. (1951) modificado por Herbet y col. (1971). El método se basa en la formación de un producto coloreado como consecuencia de dos reacciones: la reacción de Biuret -de sales de cobre con sustancias que presentan dos o más enlaces peptídicos, fundamentalmente proteínas-, y la reacción de reducción de los iones fosfomolibdato y fosfotungstato, presentes en el reactivo de Folin, por los restos de tirosina y triptófano de las proteínas.

Se toman 100 μl de la muestra en tubos de ensayo (100 μl de NaOH para el blanco), se le añaden 300 μl de NaOH (1M) y 400 μl de agua destilada. Se le adiciona a cada muestra 2 ml de la solución A, se agita, se espera 10 minutos, se añaden 400 μl de la solución B y se vuelve a agitar. Se lee la absorbancia a 750 nm tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Reactivo A: se prepara inmediatamente antes de su uso. Para ello, se mezclan 50 ml de Na_2CO_3 al 5% (p/v) con 2,4 ml de una solución 1:1 de tartrato sódico potásico 2% (p/v) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v). Reactivo B: se diluye el reactivo Folin-Ciocalteu con agua destilada (1:1).

El valor de la concentración de proteínas se determina a partir de la recta de patrón realizada a partir de diluciones de una solución de albúmina (BSA):

$$\text{Proteínas}(\text{mg ml}^{-1}) = \frac{\text{Abs}_{750} - 0,0189}{5,7 \times \text{Vol.muestra}(\text{ml})} \quad \text{[Ecuación 4]}$$

III.4.3.3. Extracción y determinación de lípidos

La extracción de la fracción lipídica de la biomasa se realiza calentando 20 mg de biomasa liofilizada en 1 ml de cloroformo:metanol (1:1) a 70 °C durante 1 hora. Este extracto se centrifuga a 12000 $\times g$ 5 minutos. Se recupera el sobrenadante en tubos de

vidrio de centrifuga de 10 ml. Se repite la extracción resuspendiendo el sedimento en cloroformo:metanol (1:1) y centrifugando de nuevo, recuperando el sobrenadante y repitiendo el proceso hasta que el pellet esté completamente azul.

El método de determinación de lípidos es una adaptación del método gravimétrico descrito por Kochert (1978). Al total de los sobrenadantes obtenidos tras los ciclos necesarios de extracción, se le añade 300 μ l de $MgCl_2$ 0,5% (p/v) y 3 ml de HCl 1 N, se agita y se centrifuga para separar las proteínas. Con una pipeta se recoge la fase inferior de color oscuro y se deposita en viales de vidrio previamente lavados con hexano, secados en estufa a 80 °C y tarados.

El contenido de los viales se deja secar en una campana de vacío y se determina la cantidad de lípidos de la muestra por diferencia de pesada. El contenido en lípidos como porcentaje se calcula a partir del peso seco inicial del liofilizado.

III.4.4. Determinación de la composición elemental

Para la determinación de la composición elemental se utiliza un Analizador Elemental CHN-O/S de *Carlo Erba Strumentazione*, modelo 1106/R, conectado a un integrador. El aparato consta de dos columnas de cuarzo o reactores, que permiten la determinación simultánea del contenido en N, C y H por un lado y de O por otro.

Para la determinación de N, C y H las muestras, colocadas en cápsulas de estaño, se introducen en una columna o reactor vertical de cuarzo, a 1030°C, a través del cual pasa un flujo constante de helio. Cuando se introduce la muestra, el caudal de helio se enriquece temporalmente con oxígeno puro. Ésto produce la combustión de la muestra, que se completa al pasar los gases producidos a través de Cr_2O_3 (material que contiene la columna correspondiente). En este paso, el C se oxida a CO_2 , el H a H_2O y el N queda como N_2 y una mezcla de óxidos de nitrógeno. A continuación, los gases de la combustión se hacen pasar a través de la columna de reducción, a 650°C, que se encuentra rellena de cobre, para eliminar el exceso de oxígeno y reducir los óxidos de nitrógeno a N_2 . Por último, la mezcla de gases se hace pasar a través de una columna cromatográfica de Porapak QS, a 100°C, para separar los distintos gases, que eluyen sucesivamente ($N_2-CO_2-H_2O$), y se miden con el detector cuya señal es proporcional a la concentración del gas respectivo y que, convenientemente amplificada, se registra gráficamente.

Para la determinación de O, se utiliza la técnica descrita en el manual del analizador (Instruction Manual for the Elemental Analyzer mod. 1106/R). Las muestras, colocadas en cápsulas de plata, se introducen en una columna o reactor vertical de cuarzo, a 1060°C, a través del cual pasa un flujo constante de helio. El oxígeno que contiene la muestra se convierte en monóxido de carbono por la acción de carbón activo niquelado (contenido en la columna). A continuación, la mezcla de gases producida se hace pasar a través de una columna cromatográfica rellena de un tamiz molecular de 5 Å, a 100°C, para separar el CO de los otros gases producidos (N₂, CH₄ y H₂), que se mide con un detector, cuya señal es proporcional a la concentración del gas y que, convenientemente amplificada, se registra gráficamente.

Previo a su utilización, las cápsulas se lavan con cloroformo y acetona, para eliminar posibles residuos orgánicos y se secan a 80-100°C.

Para el análisis elemental, se toman 10 ml de cultivo y se centrifugan a 3000 x g 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y se lava el sedimento con formiato amónico (p/v). Se centrifuga de nuevo y se guarda el sedimento en estufa a 80°C al menos 48 h. Una vez secas las muestras se dejan 60-120 minutos en un desecador, hasta que alcancen la temperatura ambiente. A continuación se pesan, en una balanza de precisión, alícuotas de las muestras secas en las cápsulas previamente lavadas. La cantidad pesada ha de estar comprendida entre 500 y 1500 µg. Una vez anotado el peso de la muestra, se cierra la cápsula cuidadosamente, y se coloca en el contenedor de muestras. Los análisis se efectúan, al menos por duplicado, utilizando cantidades similares de los compuestos indicados en la Tabla 2 como patrones.

Tabla 2. Patrones para el análisis elemental.

Patrón	Proporción teórica (%)			
	N	C	H	O
Ácido benzoico	-	68,85	4,95	26,20
Sulfanilamida	16,27	41,84	4,68	18,58
Ciclohexanona-2,4-dinitro-fenil-hidrazona	20,14	51,79	5,07	23,00

El integrador representa los cromatogramas correspondientes y suministra asimismo, identificadas por sus tiempos de elución, las áreas integradas de los picos

que aparecen, correspondientes a N₂, CO₂ y H₂O, que se corresponden a su vez con los contenidos en N, C y H de las muestras analizadas.

En el caso del O₂, los picos corresponden a N₂ y CO, siendo este último el que se corresponde, a su vez, con el contenido en O de las muestras analizadas.

III.4.5. Determinación de la velocidad de sedimentación

Para los ensayos de velocidad de sedimentación se emplea biomasa recogida de cultivos al exterior. Se toma 1,5 l de cultivo, se distribuye en probetas de 100 ml y se deja decantar. A los tiempos 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos se toman muestras en el punto medio de las probetas (altura marcada por los 50 ml) y se analiza el contenido en biomasa para establecer una cinética de sedimentación.

III.4.6. Separación de la biomasa y el EPS

La biomasa procedente de cultivos en cámara, a una densidad celular de 1,8 g l⁻¹, se pasa por un homogeneizador y se distribuye en fracciones de 100 ml que se someten a los diversos tratamientos de agitación y/o térmico para separar el EPS y las células.

Las muestras obtenidas después de cada uno de los tratamientos se centrifugan a 27000 xg 45 minutos, recogiendo sobrenadante y precipitado. Este último se resuspende en un volumen igual de agua destilada. A ambas fracciones se les determina el contenido en biomasa, carbohidratos totales y carbono orgánico total por los métodos ya descritos para determinar el porcentaje de EPS en el sobrenadante y en el sedimento.

III.4.6.1. Tratamiento térmico

Se utiliza un baño para agua (*Selecta*). Se realizan dos aproximaciones:

- a) Mantener una temperatura constante de 70 °C y modificar el tiempo de incubación de las muestras (15, 30, 45 y 60 minutos).

- b) Fijar un tiempo de incubación de 15 minutos y modificar la temperatura de tratamiento (55, 70, 85 y 100 °C).

III.4.6.2. Agitación

Se utiliza un Omni-mixer 17220 (*Sorvall*), operado a dos velocidades de agitación: X y 1/2X (máxima y mitad de la máxima) y distintos tiempos de tratamiento (1, 5, 10 y 20 minutos). Para la velocidad máxima no se realiza el tratamiento de 20 minutos para evitar el calentamiento excesivo del motor.

III.4.7. Determinación de Cadmio

La concentración de cadmio de una solución acuosa se determina espectrofotométricamente (Lee y Choi, 2001). 200µl de esta solución se llevan a 1 ml con agua ultrapura. Se añade 0,5 ml de pirrolidinaditiocarbamato de amonio (APDC, *Sigma Aldrich*) al 0,1% (p/v) preparado en el momento de su uso, se agita y añade 1 ml de una solución Tween 80 (1% (p/v), *Sigma Aldrich*), se lleva hasta 10 ml con tampón K₂HPO₄ 1 M ajustado con NaOH a pH 7 y se agita. Tras 30 minutos de incubación, se mide la absorbancia de las muestras a 323 nm en cubeta de cuarzo. Todas las soluciones empleadas para estas determinaciones se preparan en agua ultrapura.

La cantidad de cadmio en las muestras se calcula por referencia a una recta patrón elaborada con nitrato de cadmio tetrahidratado en agua ultrapura, de acuerdo a la ecuación:

$$[\text{Cd}^{+2}](\text{ppm}) = \frac{(\text{Abs}_{323\text{nm}} - 0,0034) \times \text{Vol.ensayo}(\mu\text{l})}{0,0214 \times \text{Vol.muestra}(\mu\text{l})} \quad \text{[Ecuación 5]}$$

III.4.8. Reología de los cultivos

Para la determinación de la viscosidad del cultivo y su caracterización reológica se emplea un viscosímetro (*Visco Star Plus L*), formado por un cilindro o disco (husillo) suspendido de un muelle de cobre-berilio que gira a velocidad constante dentro del líquido muestra. Al estar inmerso en un fluido, el husillo se encuentra una resistencia

al giro, que estira el muelle. Para una combinación dada de velocidad de giro y husillo, se produce una deformación del muelle (valor de *torque*) que es proporcional a la fuerza que lo deforma, y es indicativo de la viscosidad del cultivo, expresada en mPa s. Para que las medidas sean fiables el valor de *torque* tiene que estar entre 15 y 100%.

La muestra (18 ml de cultivo sin homogeneizar) se coloca en el contenedor del adaptador para baja viscosidad (LCP), se introduce el husillo cilíndrico en la muestra y se realizan las determinaciones de la viscosidad y del esfuerzo de cizalla (N m^{-2}) incrementando la velocidad dentro del rango fiable de *torque*. La relación entre velocidad y esfuerzo de cizalla es una curva que se emplea para expresar el comportamiento reológico de los cultivos. Se realiza un ajuste potencial de la curva según la ecuación:

$$y = K x^n \quad \text{[Ecuación 6]}$$

donde, K = índice de consistencia del fluido (mPa s), n = índice de comportamiento de flujo. De manera que los tipos de fluidos se clasifican en:

- a) Fluidos newtonianos ($n = 1$): son los más simples, el gradiente de velocidad es proporcional al esfuerzo de cizalla.
- b) Fluidos no newtonianos, que pueden ser:
 - b.1. Pseudoplásticos ($n < 1$).
 - b.2. Dilatantes ($n > 1$).

III.4.9. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

III.4.9.1. Ensayo de actividad nitrogenasa

La actividad nitrogenasa del cultivo se determina *in vivo* utilizando células enteras, mediante la técnica de reducción de acetileno a etileno descrita por Stewart y col. (1967). Los ensayos se realizan en matraces erlenmeyers de 20 ml de capacidad, con 2 ml de suspensión celular en medio de cultivo, sellados con tapones de goma (Arthur Thomas, Co.) donde se inyectan 2 ml de acetileno (atmósfera del 10% (v/v) de acetileno en aire). Los matraces se agitan a 100 rpm en un agitador orbital a 30 °C, y

$100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La reacción se inicia encendiendo la luz y, después de 30 min de ensayo, se detiene apagándola. Se extrae con una jeringa 1 ml de la fase gaseosa y el etileno formado se determina por cromatografía de gases (GC-2010, *Shimadzu*). Se determina la concentración de biomasa en el ensayo y se expresa la producción de etileno por gramo de biomasa y tiempo de ensayo ($\mu\text{mol etileno g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

III.4.9.2. Ensayo de actividad fotosintética

La actividad fotosintética de las suspensiones celulares se determina como desprendimiento de oxígeno, detectado mediante un electrodo de oxígeno (*Oxygraph*, *Hansatech*). El conjunto del electrodo va montado sobre un agitador magnético: un registrador pasa los datos directamente al ordenador. Las gráficas se realizan y estudian con el programa *Oxygraph*.

Se enciende el electrodo una hora antes de su empleo y se deja estabilizar con agua destilada. Se retira el oxígeno del agua añadiendo ditionito sódico 85% (p/v) (*Sigma*) para fijar el punto 0 de oxígeno disuelto y establecer la línea base. Para realizar las medidas se añaden 2 ml de cultivo al compartimento de medida, se activa la agitación y se enciende la luz para que se inicie la fotosíntesis ($900 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Se registra la evolución del desprendimiento de oxígeno hasta que la pendiente de la recta se estabiliza. Posteriormente, se apaga la lámpara y se determina el consumo de oxígeno como la pendiente negativa de la recta.

La fotosíntesis se calcula como suma del oxígeno producido fotosintéticamente y del consumido en la respiración y se expresa en nmol min^{-1} , que se refiere a la biomasa presente en la muestra.

III.5. INMOVILIZACIÓN DE *Anabaena* EN SOPORTE DE POLIURETANO

Los fragmentos de poliuretano se lavan con agua destilada (4-5 pases) en agitación, se secan en estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 día y se colocan en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Para inmovilizar la biomasa se utilizan tubos cilíndricos de vidrio con 300 ml de medio de cultivo preparados del mismo modo que los recipientes para inóculo (Figura

10A) conteniendo el soporte. Se inoculan con un volumen de cultivo y se incuban los recipientes en cámara de cultivo a 30 °C y 80 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, agitados a 20 $\text{l l}^{-1} \text{min}^{-1}$ con una mezcla aire- CO_2 al 1% (v/v).

Para determinar la biomasa retenida (Figura 10B) se extraen las células del soporte en un volumen fijado de agua, con ayuda del homogeneizador y se determina la concentración de biomasa.

El tiempo de poliuretano así como el tamaño y la geometría de los fragmentos, la superficie total de soporte a inocular, el tiempo para retener la biomasa y la densidad celular inicial del inóculo, se han determinado experimentalmente.

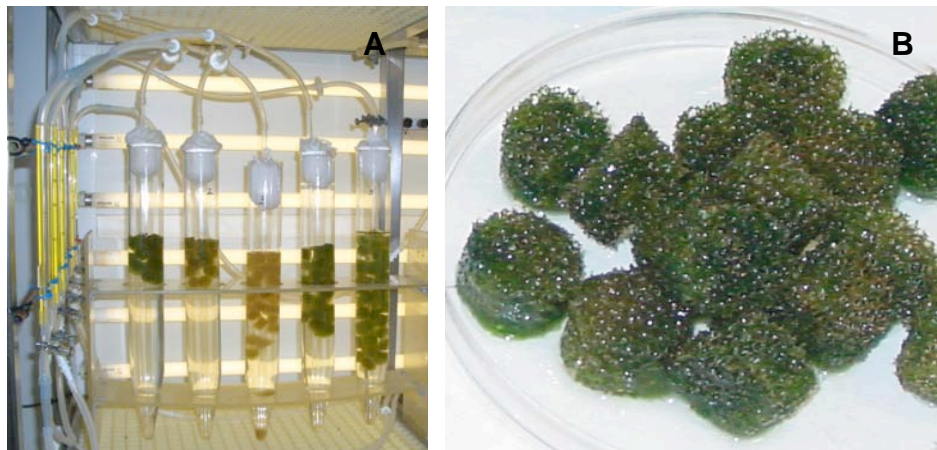


Figura10. Sistemas de cultivo para la inmovilización de *Anabaena* (A). Fragmentos de soporte con biomasa de *Anabaena* inmovilizada (B).

III.6. MEDIDA DE IRRADIANCIA

La irradiancia luminosa a la que se someten los cultivos en fotoquimiostatos se cuantifica con un medidor de radiación escalar QSL-100 (*Biospherical Instruments Inc.*) tipo 4π . Este medidor recoge y mide la radiación que le llega de todas las direcciones del espacio. La irradiancia incidente se determina en agua. La irradiancia promedio que llega al cultivo se calcula según la ecuación (Acién Fernández y col. 1997):

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

donde I_0 es la irradiancia incidente máxima (que alcanza el interior del reactor, en ausencia de células), p es el paso de luz (diámetro del reactor), C_b es la concentración de biomasa, y K_a el coeficiente de extinción de la suspensión celular. El valor de K_a para *Anabaena* sp. ATCC 33047 es $0,19 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ calculado según Molina Grima y col., 1994.

La irradiancia solar a la que están sometidos los cultivos al exterior se cuantifica mediante una estación meteorológica Datalogger IQ3000 (*Quimisar*) que consta de un sensor para radiación PAR expresada en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (PQS1 PAR Sensor, *Kipp & Zonen*), y otro (IQ-BUS) que recoge los datos de radiación total expresada en $\text{MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

III.7. CÁLCULOS

III.7.1. Velocidad específica de crecimiento

En los cultivos en estanco, la velocidad específica de crecimiento (μ) se determina durante la fase exponencial del cultivo, según la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad \text{[Ecuación 8]}$$

donde x_1 y x_2 representan la densidad celular a tiempos t_1 y t_2 . La unidad de la velocidad específica de crecimiento es tiempo^{-1} .

III.7.2. Productividad en cultivo continuo

La productividad de biomasa de un cultivo continuo es el resultado de la multiplicación del valor de la velocidad de dilución (D , d^{-1}), por el de la concentración de biomasa en el cultivo (C_b , g l^{-1}). La productividad de biomasa se expresa en $\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De forma análoga se calcula la productividad de exopolisacárido, considerando la concentración de este compuesto en el cultivo (g l^{-1}).

$$\text{Prod. biomasa}(\text{gl}^{-1} \text{ d}^{-1}) = C_b(\text{gl}^{-1}) \times D(\text{d}^{-1}) \quad \text{[Ecuación 9]}$$

Los resultados que se presentan de las experiencias realizadas en cultivo continuo son representativos de situaciones estabilizadas, correspondiendo a valores promedio de al menos 4 determinaciones en cada estado estacionario.

III.7.3. Tasa de fijación de CO₂

La estequiometría de la reacción de fijación de CO₂ indica que por cada gramo de carbono asimilado se retira de la atmósfera 3,66 g de CO₂. El cálculo de la tasa de fijación de CO₂ resulta de la multiplicación de la velocidad de dilución (d⁻¹) por la concentración de carbono orgánico de la muestra (g l⁻¹), y por 3,66.

$$\text{Tasa de fijación CO}_2 = 3,66 \times [\text{C orgánico}] (\text{g l}^{-1}) \times D(\text{d}^{-1}) \quad \text{[Ecuación 10]}$$

III.7.4. Productividad de un cultivo semicontinuo

La productividad de biomasa de un cultivo semicontinuo se expresa como el peso seco de la biomasa recogida por unidad de superficie o volumen, y por unidad de tiempo. Su cálculo es el producto de la concentración de biomasa del reactor en el momento de la dilución (g l⁻¹) por el volumen de dilución (l), dividido entre el periodo de dilución (días) y la superficie total ocupada por el reactor (m²) o el volumen total del mismo (l). De manera similar se calcula la productividad de exopolisacárido.

$$\text{Prod. biomasa} = \frac{C_b(\text{g l}^{-1}) \times \text{Vol. Dilución (l)}}{\text{Tiempo (d)} \times \text{Superficie (m}^2\text{)}} \quad \text{[Ecuación 11]}$$

III.7.5. Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética (R , g MJ⁻¹) es una medida de la capacidad de conversión de la energía solar en biomasa. Para su cálculo se divide la productividad referida a la superficie total ocupada por el reactor (g m⁻² d⁻¹) entre la irradiancia diaria que incide en el reactor expresada en MJ m⁻² d⁻¹ (Ecuación 12). La eficiencia fotosintética de los cultivos, expresada como porcentaje, se calcula según la Ecuación 13 multiplicando R por el calor de combustión de la biomasa, 22,44 KJ g⁻¹ (Moreno y col., 2003).

$$R \text{ (g MJ}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Productividad (g m}^{-2}\text{ d}^{-1}\text{)}}{\text{Irradiancia (MJ}^{-1}\text{ m}^{-2}\text{ d}^{-1}\text{)}} \quad \text{[Ecuación 12]}$$

$$\text{Eficiencia fotosintética (\%)} = \frac{R \text{ (g MJ}^{-1}\text{)}}{22,44 \text{ (KJ g}^{-1}\text{)}} \quad \text{[Ecuación 13]}$$

IV. RESULTADOS

IV.1. CULTIVO CONTINUO DE *Anabaena* EN FOTOQUIMIOSTATO

El aprovechamiento práctico de cultivos de *Anabaena* requiere dominar el cultivo de esta cianobacteria en sistemas a la intemperie. Para alcanzar este objetivo en las mejores condiciones, operando sobre bases científicas, se ha procedido en una primera fase a establecer las condiciones idóneas de cultivo en condiciones altamente controladas, empleando fotoquimiostatos del tipo columna de burbujeo operados en régimen continuo y sometidos a ciclos de luz. La optimización en continuo a escala de laboratorio es un paso obligado previo a la eficaz operación de los cultivos en el exterior, ya que la información que se obtiene debe permitir predecir el comportamiento del cultivo en función de las variables ambientales.

La asignación de los valores óptimos para las diferentes variables se lleva a cabo de manera secuencial, estudiando la incidencia de un parámetro dado sobre el rendimiento del cultivo, determinando el valor que se corresponde con la mayor productividad, y estableciendo dicho óptimo como condición fija para experiencias posteriores.

IV.1.1. Cultivo continuo con ciclo simulado de irradiancia

Las condiciones iniciales para el cultivo continuo de *Anabaena* en fotoquimiostato fueron: tasa de dilución $0,056 \text{ h}^{-1}$; temperatura $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$; pH constante de 9, mantenido mediante inyección de CO_2 ; flujo de aire 60 l por l de cultivo y h, empleándose medio de cultivo estándar. La adición de medio de cultivo, a la tasa de dilución indicada, se mantiene durante las 12 horas de duración del periodo de iluminación, la cual se suministra siguiendo un ciclo circadiano con un valor para la irradiancia máxima de $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

IV.1.1.1. Efecto de la velocidad de dilución

La velocidad de dilución es un parámetro fundamental en la operación de un cultivo en régimen continuo, puesto que de ella dependen características esenciales de las células, así como determina la densidad celular del cultivo y el volumen de

suspensión celular que se renueva por unidad de tiempo. En el estado estacionario la velocidad de dilución se corresponde con la velocidad de crecimiento.

Los datos que se recogen en la Figura 11 ponen de manifiesto la dependencia que presenta la densidad celular de la suspensión respecto a la velocidad de dilución, apreciándose una disminución de la concentración de biomasa a medida que se aumenta la tasa de dilución.

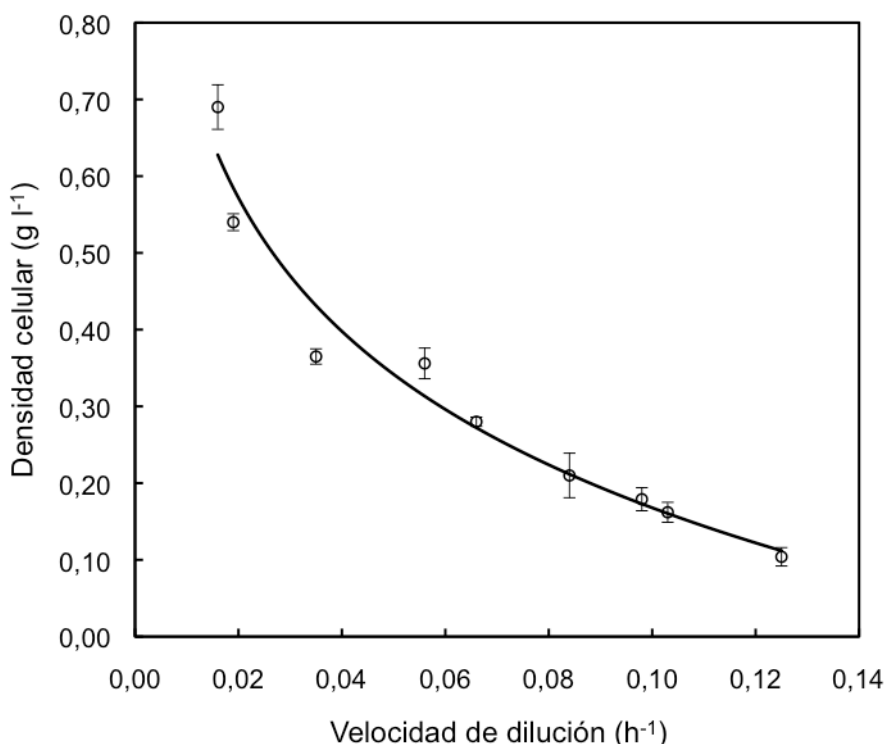


Figura 11. Efecto de la velocidad de dilución sobre la densidad celular de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones: ciclo circadiano de 12 h de luz, con irradiancia máxima de $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $35 \text{ }^\circ\text{C}$; $60 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; pH 9; medio de cultivo estándar.

Por otro lado, *Anabaena* genera carbohidratos que se acumulan intracelularmente, fundamentalmente como glucógeno, o se liberan al medio externo, mayoritariamente como exopolisacáridos (EPS). El nivel de carbohidratos totales y EPS en el cultivo se ve afectado por la velocidad de dilución (Figura 12), de manera similar a como lo hace la concentración de biomasa (Figura 11). Mientras que a velocidades de dilución bajas el contenido de carbohidratos y EPS del cultivo es elevado, al incrementarse la velocidad de dilución se reduce el nivel de carbohidratos y EPS. En las condiciones analizadas, el EPS representa entre el 30 y el 70% de los

carbohidratos totales presentes en el cultivo, variando esta proporción en respuesta al cambio en la velocidad de dilución. Así, los cultivos mantenidos a baja velocidad de dilución presentan entre el 60 y el 70% de sus carbohidratos en forma de EPS, frente al 30-50% que presentan los cultivos sometidos a una velocidad de dilución superior a $0,098 \text{ h}^{-1}$ (Figura 12).

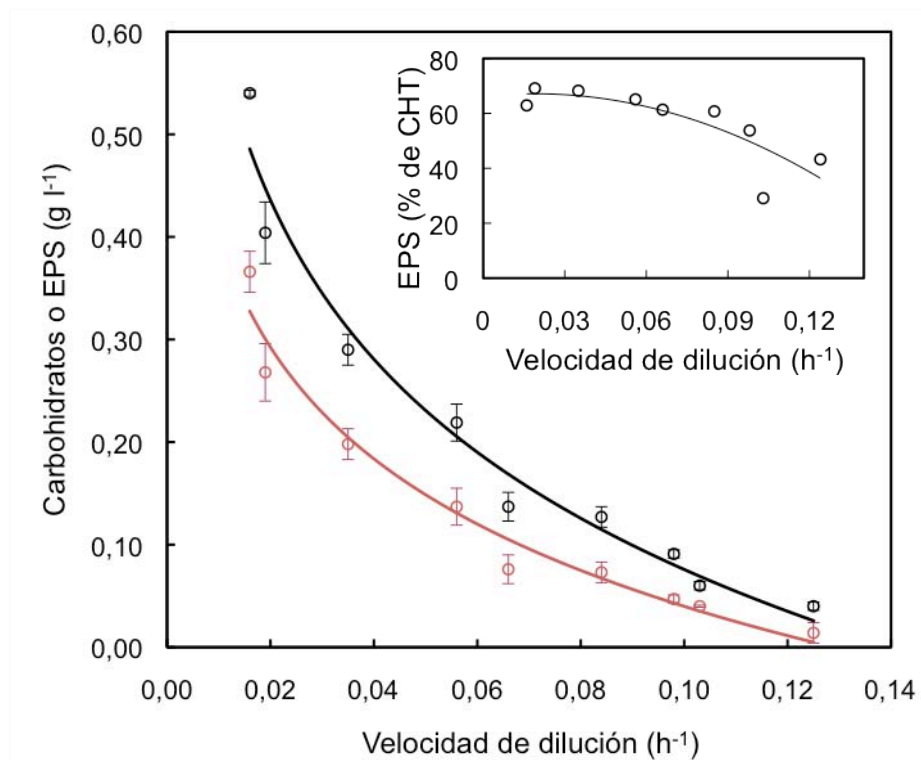


Figura 12. Efecto de la velocidad de dilución sobre el contenido en carbohidratos totales (negro) y en EPS (rojo) de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales como en Fig. 11.

La contribución del EPS a la materia orgánica total del cultivo disminuye al hacerle la tasa de dilución, lo que se visualiza al analizar la respuesta de la razón biomasa/EPS a los cambios en la velocidad de dilución (Figura 13). A baja velocidad de dilución, cuando la densidad del cultivo es elevada, la concentración de biomasa es el doble que la de EPS. En cultivos sometidos a elevada velocidad de dilución, la concentración de biomasa llega a ser casi ocho veces superior a la de EPS.

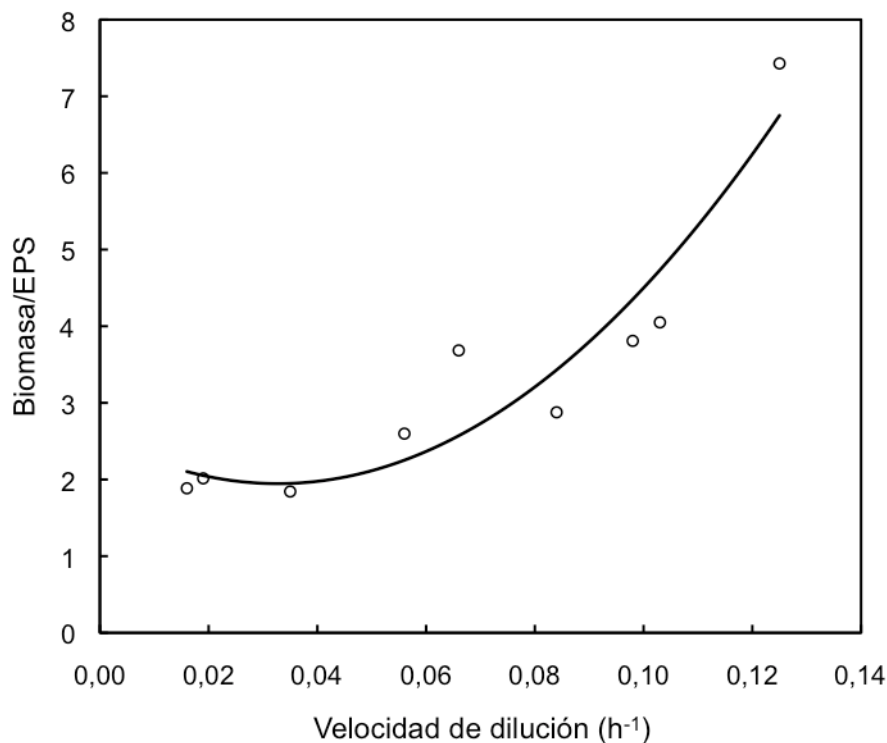


Figura 13. Efecto de la velocidad de dilución sobre la relación biomasa/EPS en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales como en Fig.11.

En cuanto a la productividad de biomasa, ésta es función directa de la densidad celular y de la tasa de dilución, de manera que la productividad máxima se alcanza para la mejor combinación de valores de ambos parámetros. La Figura 14 muestra que, en las condiciones ensayadas, la productividad de biomasa se incrementa inicialmente al hacerle la velocidad de dilución, alcanzándose un valor máximo de $0,23 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para una velocidad de dilución de $0,056 \text{ h}^{-1}$ (a la que corresponde una densidad celular de $0,4 \text{ g l}^{-1}$), y disminuye ligera pero progresivamente a partir de dicho valor. Para un tasa de dilución de $0,124 \text{ h}^{-1}$ ($0,114 \text{ g biomasa l}^{-1}$) la productividad de biomasa es de $0,15 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

La velocidad de dilución afecta también a la productividad de EPS, con un perfil ligeramente diferente respecto a cómo incide sobre la de biomasa, si bien alcanzan el valor máximo a la misma velocidad de dilución. Así, la productividad de EPS aumenta con la velocidad de dilución, hasta alcanzar su valor máximo ($0,09 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) a $0,056 \text{ h}^{-1}$. A partir de dicho valor, el incremento de la velocidad de dilución conlleva un marcado descenso en la productividad de EPS, que decae a $0,02 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para una tasa de dilución de $0,124 \text{ d}^{-1}$ (Figura 15).

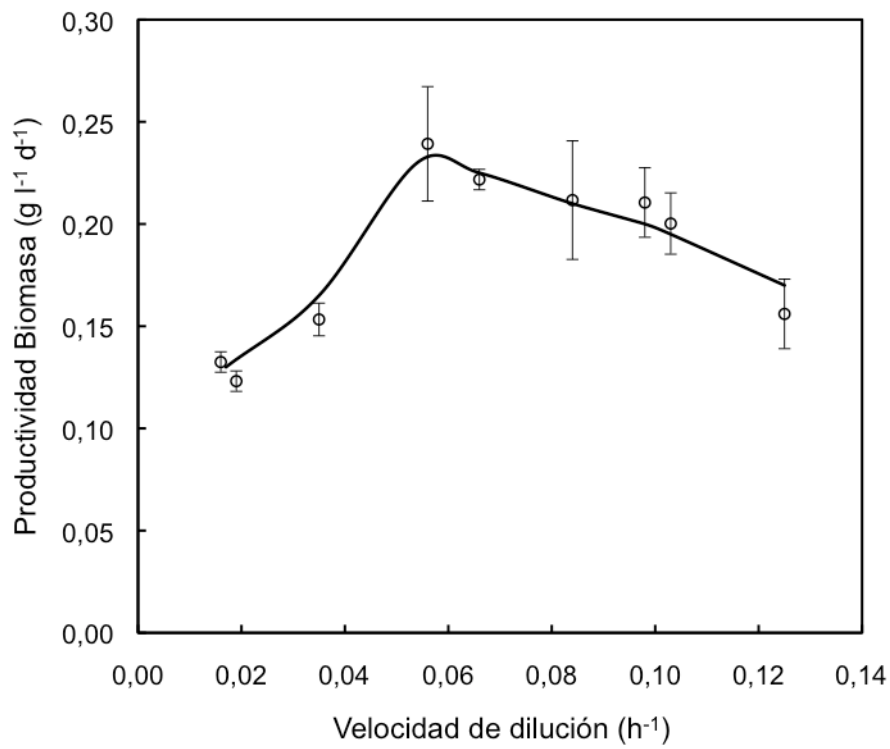


Figura 14. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales como en Fig. 11.

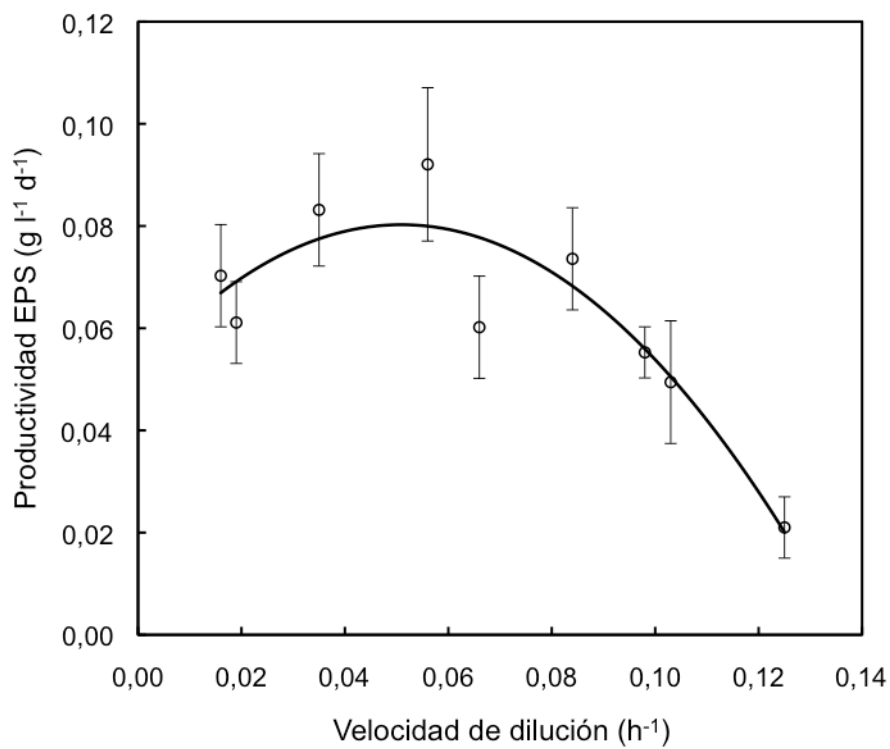


Figura 15. Efecto de la velocidad de dilución sobre la productividad de exopolisacárido en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales como en Fig. 11.

Un parámetro fundamental para determinar el potencial de los cultivos de *Anabaena* como sistema de eliminación de CO₂ es la tasa de fijación de carbono. El carbono asimilado pasa a formar parte de la biomasa, aunque una parte puede liberarse al medio en forma de compuestos orgánicos, como es el caso del EPS. El efecto de la velocidad de dilución sobre la tasa de fijación de CO₂ se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de la velocidad de dilución sobre concentración de carbono orgánico y tasa de fijación de CO₂ en cultivos continuos de *Anabaena* en estado estacionario.

Velocidad de dilución (h ⁻¹)	Carbono orgánico (g l ⁻¹)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
0,016	0,47 ± 0,01	0,33 ± 0,01
0,019	0,35 ± 0,02	0,29 ± 0,02
0,035	0,21 ± 0,01	0,33 ± 0,02
0,056	0,20 ± 0,01	0,49 ± 0,02
0,066	0,13 ± 0,02	0,39 ± 0,09
0,085	0,09 ± 0,01	0,38 ± 0,08
0,098	0,07 ± 0,02	0,35 ± 0,05
0,103	0,07 ± 0,02	0,33 ± 0,07
0,124	0,04 ± 0,02	0,21 ± 0,11

Condiciones experimentales como en Fig. 11.

De forma análoga a como lo hacen tanto la densidad celular como la concentración de EPS, la concentración de carbono orgánico en el cultivo disminuye al aumentar la velocidad de dilución. De forma similar a como responde la productividad de biomasa o EPS, la tasa de fijación de CO₂ aumenta inicialmente al hacerlo la velocidad de dilución, hasta alcanzar un máximo (0,5 g l⁻¹ d⁻¹) a 0,056 h⁻¹. A velocidades de dilución superiores, la tasa de fijación de CO₂ disminuye hasta 0,2 g l⁻¹ d⁻¹ para la tasa de dilución más alta ensayada (0,124 d⁻¹).

Teniendo en cuenta los comportamientos observados, se selecciona como óptimo el valor de 0,056 h⁻¹, siendo ésta la velocidad de dilución a mantener en experiencias posteriores.

IV.1.1.2. Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor que influye decisivamente el metabolismo de los seres vivos. En los cultivos de cianobacterias, como en los de otros microorganismos, la temperatura tiene una importante incidencia sobre la tasa de crecimiento y la producción de compuestos de interés. En el caso de *Anabaena*, temperaturas por encima del óptimo (35 °C) afectan negativamente a la densidad celular (Figuras 16 y 17) de manera que un incremento de 35 a 40 °C supone una disminución de un 33%, caída que alcanza el 76% si la temperatura llega a 45 °C.

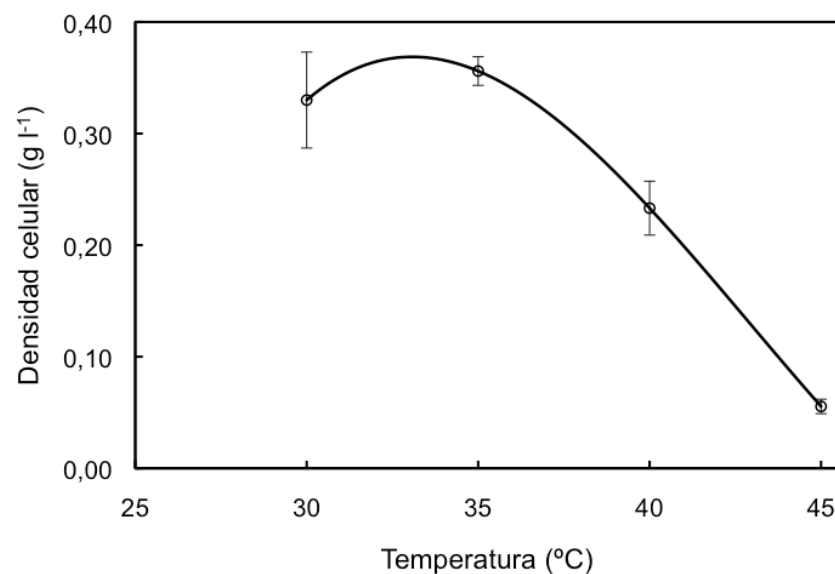


Figura 16. Influencia de la temperatura sobre la concentración de biomasa en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales: ciclo circadiano de 12 h de luz, con irradiación máxima de 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; velocidad de dilución, 0,056 h^{-1} ; pH 9; agitación 60 l aire $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$; medio de cultivo estándar.



Figura 17. Fotoquimiostatos con cultivos de *Anabaena* en régimen continuo, mantenidos a 35 °C (izquierda) ó 45 °C (derecha). Condiciones experimentales como en Fig. 16.

La temperatura afecta a la acumulación en el cultivo de carbohidratos totales y exopolisacáridos de manera similar. El nivel de carbohidratos y EPS permanece estable entre 30 y 35 °C, aumentando ligeramente a 40 °C, cuando registra el máximo, para decaer a temperaturas superiores (Figura 18). La contribución a los carbohidratos totales del componente de EPS se incrementa con la temperatura, de manera que entre 30 y 35 °C los EPS representan un 25% de los carbohidratos totales, porcentaje que se duplica a 40 °C, y que llega a representar hasta un 75% a 45 °C.

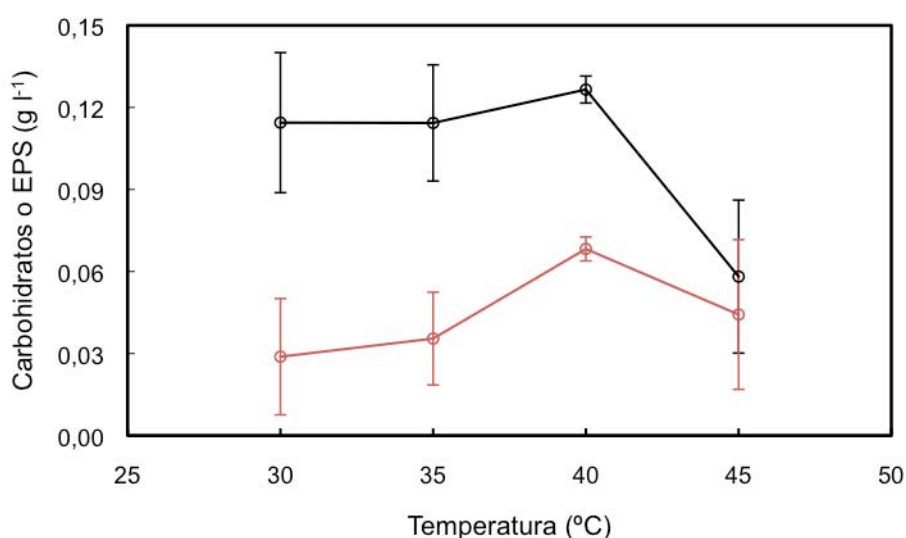


Figura 18. Influencia de la temperatura sobre la concentración de carbohidratos (negro) y EPS (rojo) en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales como en Fig. 16.

A valores de temperatura superiores a 35 °C, y en concordancia con una mayor acumulación de EPS, la viscosidad del cultivo aumenta considerablemente, modificándose la reología del mismo (Apartado IV.1.5).

La máxima productividad de biomasa ($0,22 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y la máxima tasa de fijación de CO_2 ($0,40 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se alcanzan a 35 °C, mientras que la máxima productividad de EPS ($0,04 \text{ g EPS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se registra a 40 °C (Tabla 4). A 45 °C, el EPS llega a suponer la mitad del total de la materia orgánica contenida en el cultivo, aproximándose el valor de la productividad de EPS al correspondiente al de biomasa.

Tomando en consideración el conjunto de los datos obtenidos, se selecciona 35 °C como temperatura óptima para las experiencias posteriores.

Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre productividad de biomasa y EPS y tasa de fijación de CO₂ en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo.

Temperatura (°C)	Productividad (g l ⁻¹ d ⁻¹)		
	Biomasa	EPS	Fijación de CO ₂
30	0,212 ± 0,028	0,018 ± 0,010	0,370 ± 0,030
35	0,228 ± 0,008	0,023 ± 0,009	0,403 ± 0,012
40	0,149 ± 0,002	0,044 ± 0,013	0,299 ± 0,016
45	0,036 ± 0,004	0,028 ± 0,012	0,096 ± 0,015

Condiciones experimentales como en Fig. 16.

IV.1.1.3. Efecto de la agitación

La agitación del cultivo, mediante el suministro continuo de aire desde la base del reactor, hace posible la necesaria homogeneidad de la suspensión celular respecto a temperatura, disponibilidad de nutrientes y luz. Se ha estudiado el efecto de la agitación sobre el rendimiento de cultivos de *Anabaena*, a través de la variación en el flujo de aire que se inyecta. Entre 20 y 80 l de aire por l de cultivo y hora no se aprecia que este factor tenga influencia significativa en las productividades de biomasa y EPS (Figura 19).

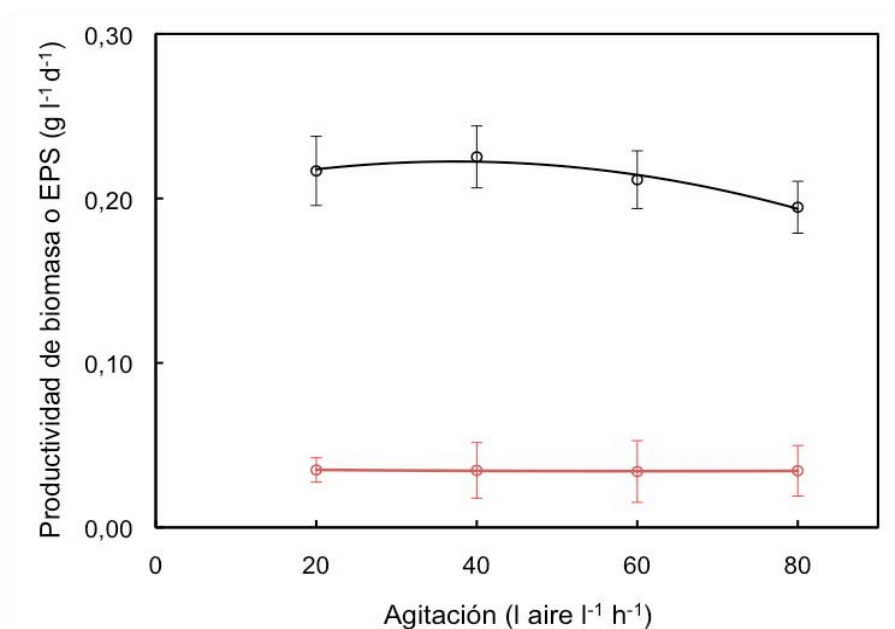


Figura 19. Efecto de la agitación sobre la productividad de biomasa (negro) y EPS (rojo) de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales: velocidad de dilución, 0,056 h⁻¹; ciclo circadiano de 12 h (irradiancia máxima, 1000 μE m⁻² s⁻¹); pH 9; 35 °C; medio de cultivo estándar.

Tabla 5. Efecto de la agitación sobre la tasa de fijación de CO₂ de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo.

Aireación (l aire l ⁻¹ h ⁻¹)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
20	0,40 ± 0,03
40	0,47 ± 0,05
60	0,40 ± 0,05
80	0,37 ± 0,07

Condiciones experimentales como en Fig. 19.

Dado que tanto la productividad de biomasa (Figura 19) como, especialmente, la tasa de fijación de CO₂ (Tabla 5) presentan valores ligeramente superiores en los cultivos agitados mediante aireación a 40 l aire l⁻¹ h⁻¹, se establece esta condición como óptima para las experiencias posteriores.

IV.1.1.4. Efecto del pH

Experiencias previas de cultivos en régimen discontinuo indicaban un amplio margen de tolerancia en relación al pH, posibilitando su cultivo en el intervalo de pH entre 7,5 y 10,0. Para verificar el comportamiento en régimen continuo, se ha ensayado la tolerancia de cultivos de esta cianobacteria a distintos valores de pH, tanto a 1000 como a 2800 μE m⁻² s⁻¹ de irradiancia máxima. Los resultados obtenidos para ambas irradiancias han sido análogos. Los resultados que se presentan son los obtenidos a una irradiancia máxima de 2800 μE m⁻² s⁻¹.

La productividad de biomasa aumenta con el pH hasta alcanzar su valor máximo a pH 9,0 (Figura 20). Por encima de este valor, el incremento de pH provoca un descenso en la concentración y productividad de biomasa de *Anabaena*. La productividad de EPS, por el contrario, tiene sus máximos a los valores más extremos de pH ensayados. El valor máximo alcanzado para la tasa de fijación de CO₂ se corresponde con la mayor acumulación de biomasa a pH 9 (Tabla 6). En base a estos resultados, se selecciona el valor de pH 9,0 como condición óptima de cultivo.

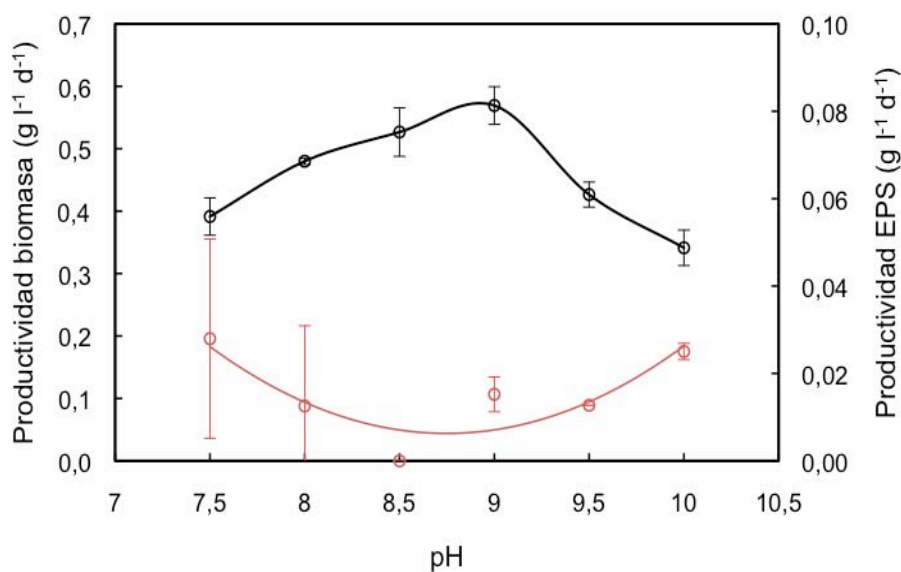


Figura 20. Efecto del pH sobre la productividad de biomasa (negro) y EPS (rojo) de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales: ciclo de luz circadiano de $2800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia máxima; velocidad de dilución, $0,056 \text{ h}^{-1}$; $35 \text{ }^\circ\text{C}$; aireación, $40 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; medio de cultivo estándar.

Tabla 6. Efecto del pH sobre la tasa de fijación de CO_2 de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo.

pH	Tasa de fijación de CO_2 ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
7,5	$0,65 \pm 0,04$
8	$0,76 \pm 0,05$
8,5	$0,81 \pm 0,04$
9	$0,90 \pm 0,05$
9,5	$0,68 \pm 0,04$
10	$0,56 \pm 0,03$

Condiciones experimentales como en Fig. 20.

IV.1.1.5. Composición del medio de cultivo

Dentro de los intentos dirigidos a maximizar la productividad y capacidad para fijar CO_2 de los cultivos de *Anabaena* operados en régimen continuo, se ha analizado el efecto de la disponibilidad de algunos componentes del medio de cultivo, como fosfato, cloruro y bicarbonato.

IV.1.1.5.a. Efecto de la concentración de fosfato

La disponibilidad de fosfato en el medio de cultivo se ha relacionado con la capacidad de generación de EPS por diversos organismos (Grillo y Gibson, 1979; Healey, 1973). A fin de conocer su influencia sobre el rendimiento de *Anabaena* se ha analizado el efecto de la concentración de fosfato sobre la producción de biomasa y EPS en cultivos de operados en régimen continuo.

El requerimiento de fosfato como nutriente fundamental para *Anabaena* se hace especialmente patente en el caso de los cultivos en régimen continuo, de manera que su carencia provoca una considerable disminución de la tasa de crecimiento, lo que se traduce en la progresiva dilución y lavado del cultivo. En experiencias con medios conteniendo concentraciones de fosfato entre 0,25 y 2,0 mM (Figura 21) se registra un efecto similar sobre la productividad de biomasa y la de EPS, alcanzándose valores máximos para 1 mM de fosfato, esto es, la concentración a la que se encuentra presente en el medio estándar. A 2 mM de fosfato, la productividad de biomasa disminuye ligeramente, mientras que la de EPS se reduce en mayor medida.

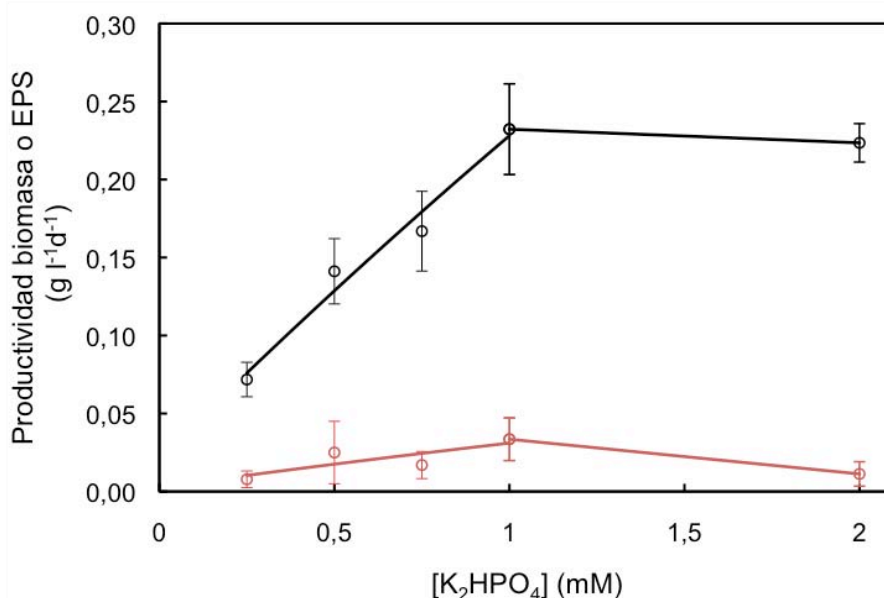


Figura 21. Influencia de la concentración de fosfato sobre la productividad de biomasa (negro) y EPS (rojo) de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales: velocidad de dilución 0,056 h⁻¹, ciclo circadiano de 12 h de luz, con irradiancia máxima 1000 μE m⁻² s⁻¹; 35 °C; aireación, 40 l l⁻¹ h⁻¹; pH 9; medio de cultivo estándar.

El comportamiento de la tasa de fijación de CO₂ es similar al de la biomasa (Tabla 7), por ser el componente fundamental de la materia orgánica producida por *Anabaena*. Por tanto la concentración de fosfato del medio de cultivo se mantiene a 1 mM para experiencias posteriores.

Tabla 7. Efecto de fosfato sobre la tasa de fijación de CO₂ de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo.

[K ₂ HPO ₄] (mM)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
0,25	0,12 ± 0,01
0,5	0,26 ± 0,03
0,75	0,28 ± 0,03
1	0,44 ± 0,04
2	0,41 ± 0,02

Condiciones experimentales como en Fig. 21.

IV.1.1.5.b. Influencia de la concentración de cloruro

Se ha estudiado el efecto de la concentración de NaCl sobre el rendimiento de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Los resultados obtenidos confirman que esta estirpe presenta un amplio margen de tolerancia a la salinidad, manteniendo un crecimiento vigoroso en el intervalo elegido de concentración de NaCl, entre 0 y 174 mM, dentro del cual ni la productividad de biomasa ni la de EPS se ven significativamente afectadas (Figura 22).

Tampoco la capacidad de fijación de CO₂ de *Anabaena* se ve influenciada de manera significativa por la concentración de NaCl presente en el medio de cultivo, permaneciendo prácticamente constante a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas (Tabla 8). Por su ligera superioridad para el rendimiento de los cultivos de *Anabaena*, así como para disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos dulceacuícolas, se decide mantener la concentración de NaCl en el medio de cultivo a 85 mM.

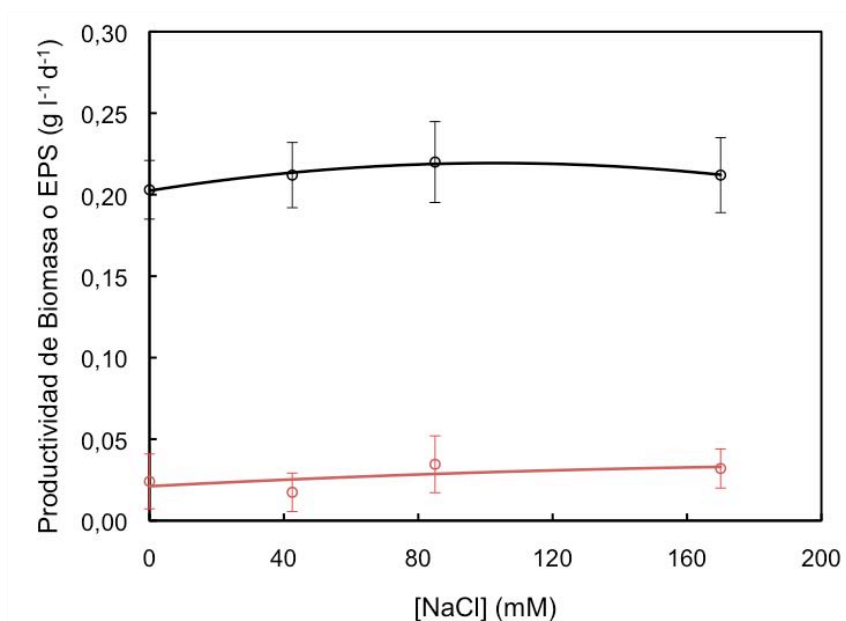


Figura 22. Influencia de la concentración de cloruro sódico sobre la productividad de biomasa (negro) y de EPS (rojo) de *Anabaena* en cultivo continuo. Condiciones experimentales como en Fig. 21.

Tabla 8. Efecto de la concentración de cloruro sódico sobre la tasa de fijación de CO₂ de cultivos de *Anabaena* operados en régimen continuo.

[NaCl] (mM)	Fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
0	0,30 ± 0,06
42,5	0,32 ± 0,06
85,0	0,35 ± 0,05
170,0	0,33 ± 0,06

Condiciones experimentales como en Fig. 21.

IV.1.1.5.c. Efecto de la concentración de bicarbonato

Se ha evaluado el efecto de la adición de bicarbonato sódico al medio de cultivo, con la intención de establecer límites de tolerancia para *Anabaena* con respecto a la concentración de carbono inorgánico presente. Esta información es de gran importancia en relación al potencial empleo de *Anabaena* para la eliminación de CO₂ empleando medios carbonatados, resultantes de la previa solubilización en el medio de cantidades sustanciales de CO₂. Para ello, es conveniente que la tolerancia de *Anabaena* al carbono inorgánico disuelto sea elevada. Se han ensayado

concentraciones de bicarbonato sódico iguales o superiores a 50 mM, concentración a la que se encuentra presente en el medio de cultivo estándar de *Anabaena*.

El aumento de la concentración de bicarbonato tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de los cultivos de *Anabaena* (Tabla 9). Así, al triplicar la concentración estándar de bicarbonato, la productividad de biomasa se reduce un 10%. A 186 mM de NaHCO₃, la disminución de la tasa de crecimiento no permite mantener el estado estacionario a la tasa de dilución establecida (0,056 h⁻¹), diluyéndose progresivamente el cultivo hasta hacerse inviable. No parece por ello recomendable que la concentración de carbono inorgánico en el cultivo supere el nivel de 0,14 M. Se mantiene 50 mM como la concentración idónea de bicarbonato en el medio.

Tabla 9. Influencia de la concentración de bicarbonato sobre la productividad de biomasa y de EPS en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo.

NaHCO ₃ añadido (mM)	Productividad (g l ⁻¹ d ⁻¹)	
	Biomasa	EPS
50	0,238 ± 0,020	0,061 ± 0,012
143	0,213 ± 0,020	0,038 ± 0,006
186	0	0

Condiciones experimentales como en Fig. 21.

IV.1.1.6. Efecto de la irradiancia incidente

Por ser la luz la fuente de energía que utilizan los organismos fotosintéticos, la irradiancia luminosa que incide sobre un cultivo es fundamental en la determinación del crecimiento de estos organismos, así como del rendimiento de sus cultivos. Tal dependencia se hace patente, para el caso de los cultivos de *Anabaena* en régimen continuo, en los datos que se presentan en la Figura 23. Existe una correlación entre la productividad de biomasa en el estado estacionario y la irradiancia incidente máxima durante el periodo iluminado (I_0). Se aprecia que el aumento de la irradiancia que incide sobre el cultivo conlleva un incremento de la productividad de biomasa, sin que se alcance la saturación en el margen de valores de I_0 ensayados. La productividad de EPS en el estado estacionario no tiene el mismo comportamiento que la de biomasa, sino que presenta un máximo (0,04 g l⁻¹ d⁻¹) a 1000 μE m⁻² s⁻¹, con un descenso a partir de este valor de irradiancia. La productividad máxima de biomasa es

de aproximadamente $0,6 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, correspondiente al cultivo expuesto a la máxima irradiancia.

La dependencia de la fijación de CO_2 respecto de la irradiancia incidente queda también patente a partir de los datos que se muestran en la Tabla 10. Como ocurre con la productividad de biomasa, el máximo observado para la tasa de fijación de CO_2 ($1 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se obtiene al valor más elevado de irradiancia máxima ensayado.

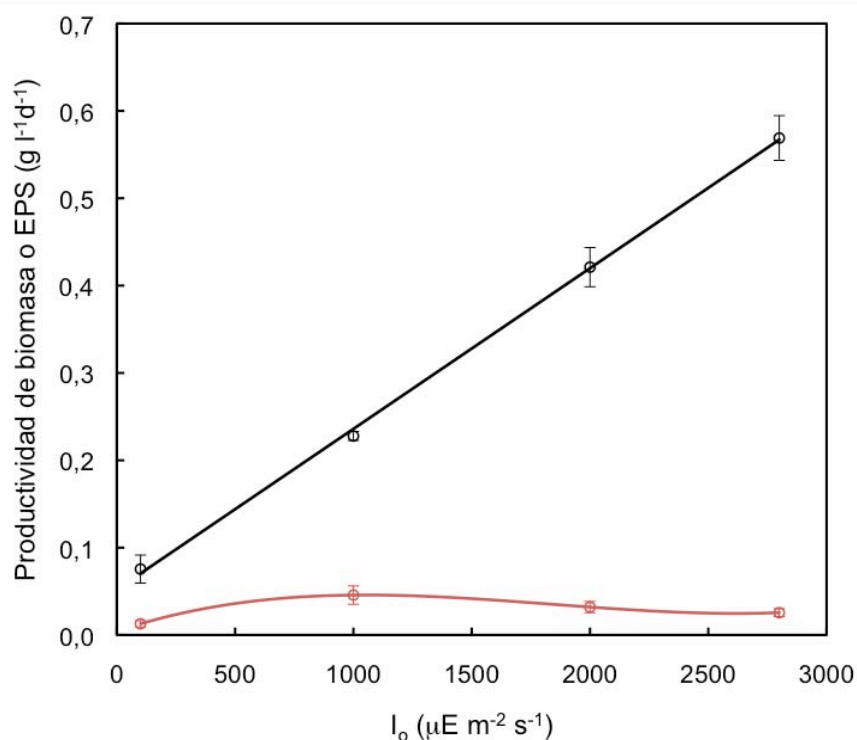


Figura 23. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de biomasa (negro) y EPS (rojo) de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones de ensayo: velocidad de dilución $0,056 \text{ h}^{-1}$; $35 \text{ }^\circ\text{C}$; aireación, $40 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; pH 9; medio de cultivo estándar; ciclo circadiano de 12 h de luz, con irradiancia máxima según se indica.

Tabla 10. Efecto de la irradiancia máxima incidente sobre la tasa de fijación de CO_2 de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo.

I_0 ($\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Tasa de fijación de CO_2 ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
100	$0,21 \pm 0,05$
1000	$0,68 \pm 0,03$
2000	$0,88 \pm 0,08$
2800	$0,99 \pm 0,10$

Condiciones experimentales como en Fig. 23.

IV.1.2. Establecimiento de condiciones óptimas para la fijación de CO₂

En base a los resultados obtenidos se establecen las condiciones idóneas de operación de los cultivos continuos de *Anabaena* en fotoquimiostato velocidad de dilución 0,056 h⁻¹, temperatura 35 °C, aireación de la suspensión celular 40 l aire l⁻¹ cultivo h⁻¹, pH 9, medio de cultivo estándar, e iluminación durante 12 h en ciclo circadiano con 2800 μE m⁻² s⁻¹ de irradiancia máxima. Fijando estas condiciones de operación, se alcanzan 0,6 g l⁻¹ d⁻¹ para la productividad de biomasa y 1 g l⁻¹ d⁻¹ para la tasa de fijación de CO₂.

IV.1.3. Obtención de un modelo de crecimiento y producción de EPS en cultivos continuos de *Anabaena*

Velocidad de dilución y temperatura son algunos de los parámetros estudiados que presentan mayor influencia sobre la productividad de los cultivos de *Anabaena*. Resulta por ello de gran interés el desarrollo de un modelo que pueda predecir el comportamiento de *Anabaena* respecto de estos parámetros.

IV.1.3.1. Definición de un modelo de crecimiento en función de la velocidad de dilución y la irradiancia

La irradiancia promedio, I_{av} , es la irradiancia que recibe una célula media del cultivo (Apartado III.6), la cual se relaciona directamente con la irradiancia incidente, e inversamente con el paso de luz del cultivo, la densidad celular del mismo y el coeficiente de extinción de luz de la biomasa. En este sentido el incremento de la irradiancia incidente sobre la superficie del reactor no implica necesariamente un aumento de la irradiancia promedio que reciben las células. De hecho, la densidad celular en el reactor puede aumentar, favorecida por el incremento de la irradiancia incidente, fomentándose con ello el sombreado mutuo entre células, sin que se modifique significativamente el valor de irradiancia promedio (Figura 24). Por otro lado, el valor de densidad celular, dependiente de la velocidad de dilución (Figura 11), también afecta a la I_{av} .

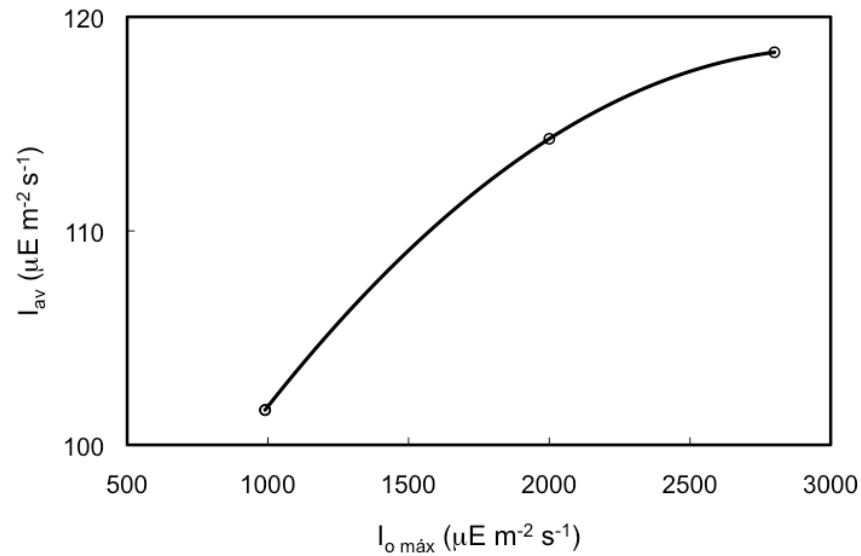


Figura 24. Relación entre la irradiancia promedio y la irradiancia incidente máxima del periodo iluminado para cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Condiciones experimentales como en Fig. 23.

El modelo propuesto por Monod (1949) relaciona la tasa de crecimiento de los microorganismos con la concentración de un sustrato limitante. En el caso de microorganismos fotosintéticos, y en condiciones de no limitación por nutrientes, la luz se convierte en el sustrato limitante. Tomando como base la ecuación de Monod (Ecuación 14), la tasa de crecimiento puede expresarse en función de la irradiancia promedio (I_{av}) en el cultivo (Molina Grima y col., 1994) donde μ es la tasa específica de crecimiento, $\mu_{máx}$ la tasa específica máxima en las condiciones de cultivo establecidas, Ik la constante de semisaturación para la irradiancia, y n_2 un parámetro geométrico de ajuste.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} I_{av}^{n_2}}{Ik^n + I_{av}^{n_2}} \quad \text{[Ecuación 14]}$$

A partir de datos obtenidos en las experiencias llevadas a cabo a diferentes velocidades de dilución, puede analizarse el efecto de la irradiancia promedio sobre la tasa específica de crecimiento, que en el estado estacionario de un cultivo continuo se corresponde con la velocidad de dilución impuesta. Como se muestra en la Figura 25, la tasa o velocidad específica de crecimiento presenta una respuesta hiperbólica al aumento de la irradiancia promedio.

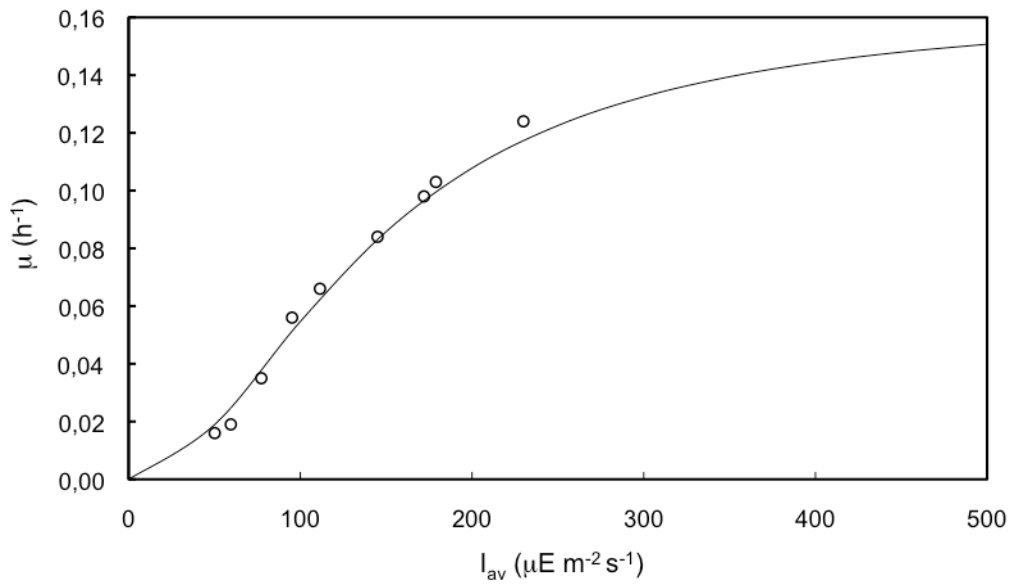


Figura 25. Efecto de la irradiancia promedio sobre la tasa específica de crecimiento en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Valores experimentales correspondientes al apartado IV.1.1.1 (puntos) y representación gráfica de la Ecuación 14 (Línea). Condiciones experimentales como en Fig. 11.

Mediante el ajuste de la Ecuación 14 a los datos experimentales, se calculan los parámetros característicos de *Anabaena* para dicha ecuación obteniéndose los siguientes valores: $\mu_{m\acute{a}x} = 0,164 h^{-1}$, $Ik = 143 \mu E m^{-2} s^{-1}$; $n_2 = 1,94$ y $r^2 = 0,9975$.

IV.1.3.2. Definición de un modelo de acumulación de EPS en función de la velocidad de dilución y la irradiancia

La producción y liberación al medio del EPS en cultivos de *Anabaena* también depende de la velocidad de dilución. Para describir la relación existente entre ambos parámetros se utiliza la tasa específica de acumulación de EPS (q_{EPS} , g EPS g⁻¹ biomasa d⁻¹), que depende a su vez de la productividad de EPS (P_{EPS}) y de C_b , la densidad celular del cultivo.

$$q_{EPS} = \frac{P_{EPS}}{C_b} \quad \text{[Ecuación 15]}$$

El comportamiento de q_{EPS} frente a diferentes velocidades de dilución indica una relación lineal positiva entre ambas variables (Figura 26).

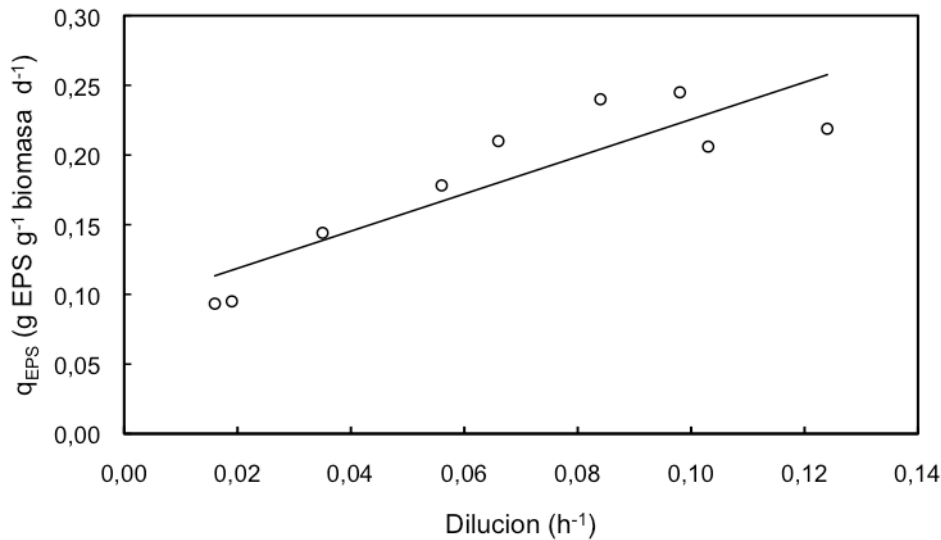


Figura 26. Efecto de la velocidad de dilución sobre la tasa específica de la acumulación de EPS. Valores experimentales (puntos) y representación gráfica de la Ecuación 16 (Línea). Condiciones experimentales como en Fig. 11.

La tasa específica de acumulación de EPS puede describirse matemáticamente como la suma del metabolismo primario y secundario para la producción de EPS según la Ecuación 16. $Y_{EPS/bio}$ refleja el rendimiento de EPS por gramo de biomasa producto del metabolismo primario y β expresa la correspondiente al metabolismo secundario. El estudio del comportamiento $Y_{EPS/bio}$ frente a $I_{omáx}$ muestra una relación exponencial entre el rendimiento del metabolismo primario e I_o que se corresponde con la Ecuación 17. Este metabolismo primario es el principal causante de la acumulación de EPS en los cultivos puesto que la producción de biomasa y de EPS tienen un comportamiento similar frente a la velocidad de dilución (Figuras 14 y 15).

$$q_{EPS} = Y_{EPS/bio} \mu + \beta \quad \text{[Ecuación 16]}$$

$$Y_{EPS/bio} = Y e^{a I_{o\max}} \quad \text{[Ecuación 17]}$$

El componente secundario del metabolismo de EPS es el responsable de la acumulación de EPS a elevada irradiancia, puesto que $Y_{EPS/bio}$ alcanza valores próximos a cero cuando el cultivo está sometido a irradiancias superiores a $2000 \mu E m^{-2} s^{-1}$. La relación entre el valor de β y la irradiancia incidente máxima sigue una

tendencia lineal, de manera que también disminuye con la irradiancia, según la Ecuación 18.

$$\beta = c + f I_{o\max} \quad \text{[Ecuación 18]}$$

A partir de los datos teóricos se realiza una regresión lineal con el programa Statgraphics y se calcula el valor de los parámetros Y (28,41), a (-0,003), c (0,097), f (-0,00005) con un r^2 de 0,8861. El valor de estos parámetros no puede compararse con el de otros organismos puesto que esta ecuación no se ha empleado previamente para caracterizar el comportamiento de otros organismos.

IV.1.3.3. Definición de un modelo de crecimiento en función de la temperatura

Además de la generación de un modelo que exprese la influencia de la velocidad de dilución (e irradiancia) en el comportamiento de los cultivos, es importante establecer los límites de tolerancia a la temperatura de *Anabaena*, así como la influencia de esta variable sobre el rendimiento de los cultivos de esta cianobacteria.

La ecuación de Arrhenius permite modelizar la influencia de la temperatura en procesos biológicos. Se propone la Ecuación 19 para relacionar la tasa máxima de crecimiento con la temperatura. En esta ecuación A_1 y A_2 son constantes características relacionadas con la producción de compuestos por microorganismos, ya sea a su favor (A_1 , término positivo) o en contra (A_2 , término negativo). El término positivo permite relacionar la tasa de crecimiento con la temperatura hasta 35 °C, y el término negativo considera la relación entre el crecimiento y la temperatura a partir de 35 °C. Además, E_1 y E_2 son las correspondientes energías de activación para cada uno de los términos.

$$\mu_{\max} = A_1 \exp\left(-\frac{E_1}{RT}\right) - A_2 \exp\left(-\frac{E_2}{RT}\right) \quad \text{[Ecuación 19]}$$

Ajustando los valores experimentales (Apartado IV.1.1.2) a la ecuación anteriormente propuesta, se determina el valor de los parámetros característicos de la misma: $A_1 = 2,84 \cdot 10^6 \text{ h}^{-1}$; $E_1 = 4,05 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$; $A_2 = 2,65 \cdot 10^{14} \text{ h}^{-1}$; $E_2 = 8,91 \cdot 10^4 \text{ J mol}^{-1}$; y $r^2 = 0,9251$, indicativos de la tolerancia de *Anabaena* a la temperatura.

IV.1.3.4. Obtención de un modelo de acumulación de EPS en función de la temperatura

En base a un análisis similar al mencionado en el apartado anterior, se determina la relación entre la tasa de producción de EPS y la temperatura. A partir de los datos experimentales se calcula la tasa específica máxima de producción de exopolisacárido, constatándose un incremento de la misma en función de la temperatura (Figura 27), de acuerdo con la Ecuación 20:

$$q_{\text{EPS/biomax}} = m e^{hT} \quad \text{[Ecuación 20]}$$

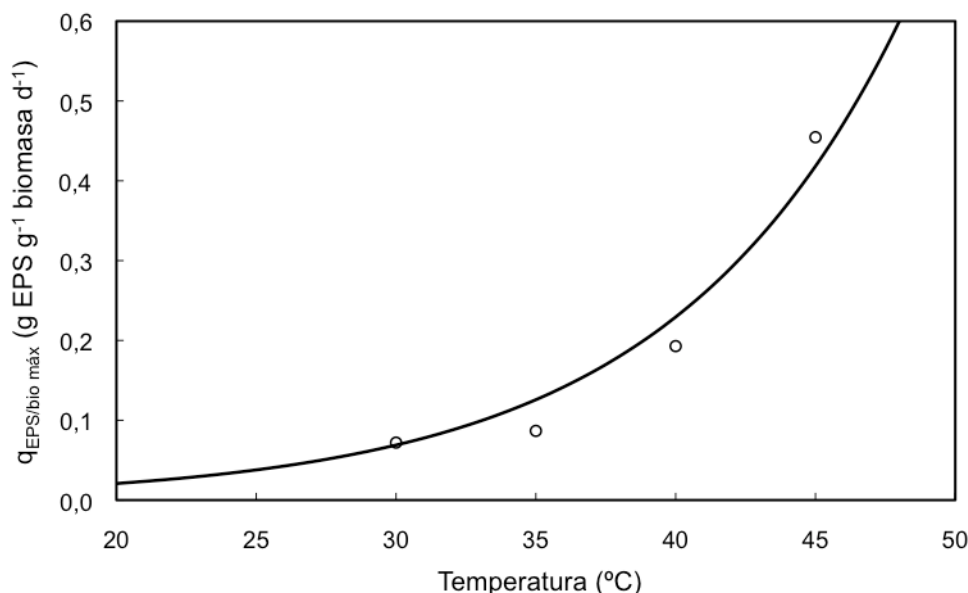


Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la tasa específica máxima de acumulación de EPS. Valores experimentales (puntos) y representación gráfica de la Ecuación 20 (Línea). Condiciones experimentales como en Fig. 16.

Ajustando los datos empíricos a esta ecuación mediante una regresión no lineal, se determinan los parámetros característicos: $m = 1 \cdot 10^{-17}$ g EPS g⁻¹ biomasa d⁻¹; $h = 1,2 \cdot 10^{-1}$ K⁻¹; y $r^2 = 0,9865$. Como en el caso de la velocidad de dilución el valor de los parámetros característicos no puede ser empleado para establecer comparaciones con otros organismos, puesto que esta ecuación no ha sido propuesta anteriormente para expresar la acumulación de compuestos, si bien posibilita simular la productividad de EPS en el intervalo de temperaturas considerado.

IV.1.3.5. Simulación del comportamiento de *Anabaena* en cultivo continuo

En base a los resultados y modelos desarrollados, se ha procedido a simular la influencia de la irradiancia incidente y de la tasa de dilución, en condiciones de temperatura óptima, sobre la productividad de biomasa y de EPS, así como sobre la tasa de fijación de CO₂ (Figuras 28, 29 y 30).

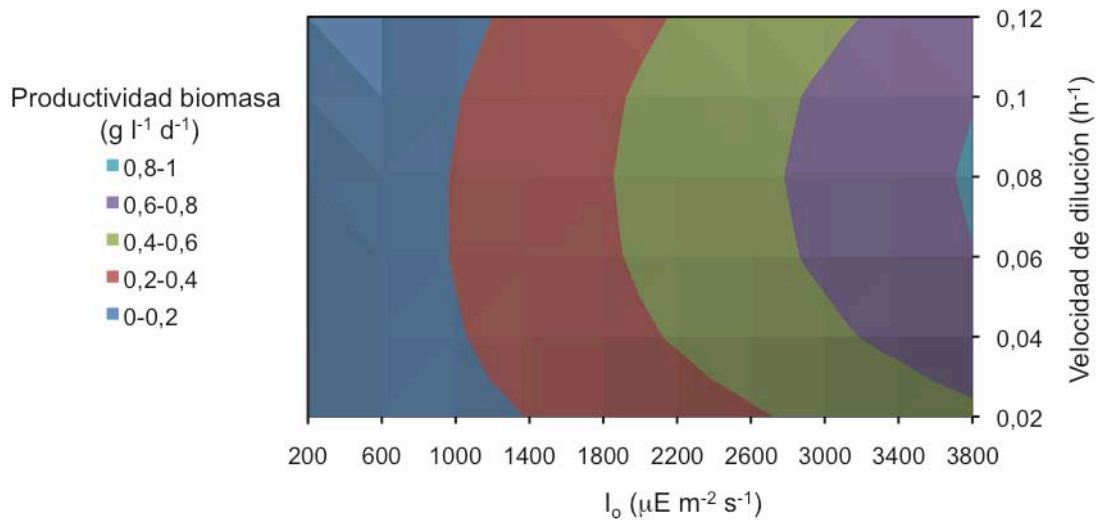


Figura 28. Influencia de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre productividad de biomasa en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Simulación realizada empleando las ecuaciones propuestas.

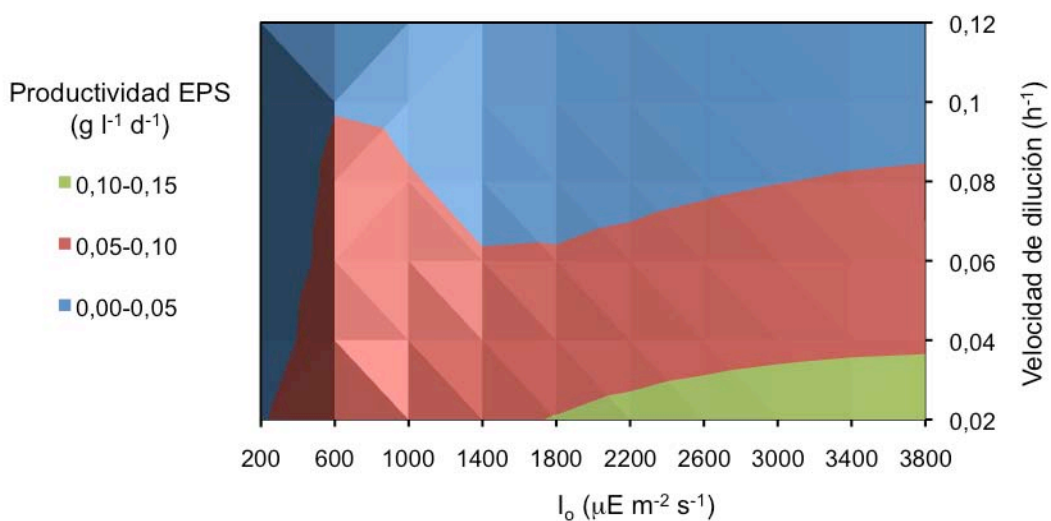


Figura 29. Influencia de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre productividad de EPS en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Simulación realizada empleando las ecuaciones propuestas.

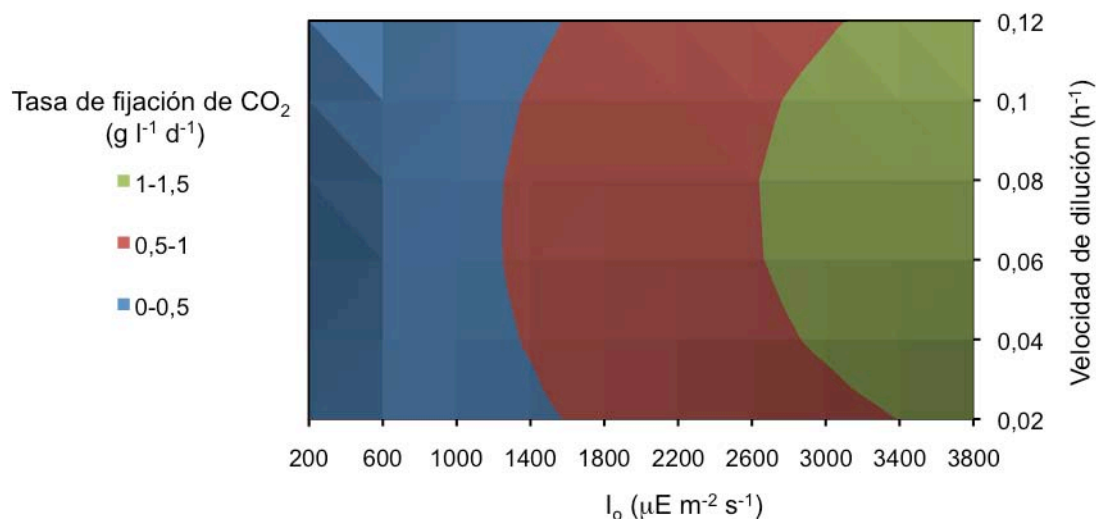


Figura 30. Influencia de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre la tasa de fijación de CO₂ en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo. Simulación realizada empleando las ecuaciones propuestas.

IV.1.4. Rendimiento al exterior de cultivos continuos de *Anabaena* en fotoquimiostato

Partiendo de la experiencia obtenida en el laboratorio con los cultivos de *Anabaena* en fotoquimiostato, sometidos a iluminación controlada, y como paso intermedio en la implantación de cultivos de volumen considerable en condiciones de intemperie, se ha procedido a verificar el comportamiento de los cultivos en fotoquimiostato en el exterior, con iluminación solar, manteniendo por otra parte las demás condiciones definidas como óptimas en apartados anteriores.

Se han ensayado dos velocidades de dilución distintas, siendo la irradiancia máxima incidente sobre el cultivo de $1240 \pm 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Como se concluye de los datos de la Tabla 11, el aumento en la velocidad de dilución de 0,056 a 0,092 d⁻¹ resulta en una ligera disminución de la productividad de biomasa del cultivo, si bien se estimula significativamente la producción de EPS.

Tabla 11. Productividad de biomasa y EPS en cultivos de *Anabaena* en fotoquimiostato mantenidos en régimen continuo y expuestos a iluminación solar natural.

Velocidad de dilución (h^{-1})	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Productividad EPS ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)
0,056	$0,66 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,02$
0,092	$0,60 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,04$

Condiciones experimentales: temperatura máxima, 30 °C , temperatura media, 27 °C; pH 9; aireación, 40 l aire $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$; irradiancia $21,5 \pm 1,9 \text{ MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$; medio de cultivo estándar.

Se han desarrollado experiencias en el exterior entre los meses de mayo y agosto, para valorar el efecto de la irradiancia incidente sobre el rendimiento de los cultivos de *Anabaena* en fotoquimiostato al exterior. La productividad de los cultivos está fuertemente influenciada por la irradiancia incidente (Figura 31).

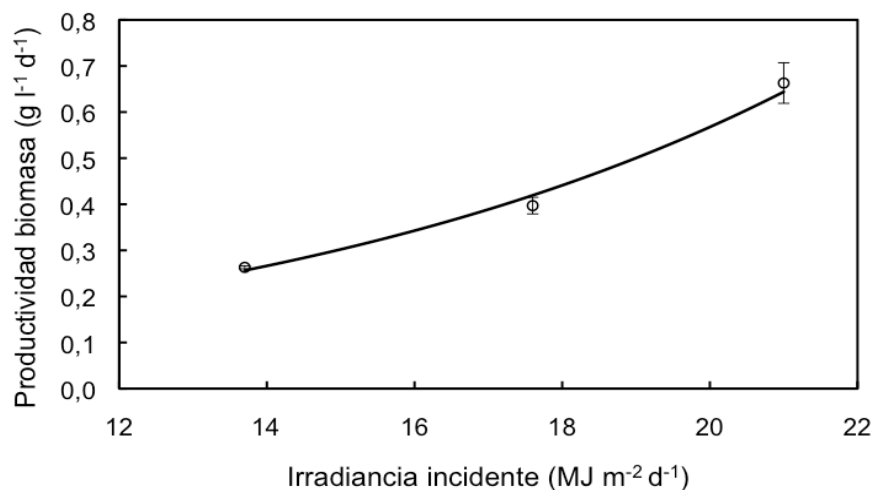


Figura 31. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de cultivos de *Anabaena* en régimen continuo al exterior. Condiciones experimentales: velocidad de dilución, $0,056 \text{ h}^{-1}$; 30 °C; pH 9; aireación, 40 l aire $\text{l}^{-1} \text{h}^{-1}$; medio de cultivo estándar.

IV.1.5. Viscosidad de los cultivos de *Anabaena* en fotoquimiostato

Adicionalmente a la biomasa, el EPS constituye un importante producto resultante de la fijación de CO_2 en cultivos de *Anabaena*. La presencia de EPS en dichos cultivos contribuye considerablemente a la viscosidad de los mismos, al menos en determinadas condiciones experimentales. La viscosidad es la resistencia de un

líquido frente a un cambio forzado irreversible en la posición de sus elementos de volumen, siendo necesario aportar continuamente energía para mantener el flujo del líquido. La velocidad de flujo que se alcanza tras la aplicación de un esfuerzo de cizalla efectivo viene determinada por la resistencia interna que opone el líquido al movimiento, esto es su viscosidad. La viscosidad es un factor importante en relación al comportamiento de los cultivos, que afecta la transferencia de materia en los mismos y que ha de tenerse en cuenta a la hora de establecer las condiciones de operación en sistemas de producción a gran escala.

Se ha analizado la viscosidad (mPa s) de muestras de cultivos en régimen continuo en fotoquimiostato (Apartados IV.1.1.1 y IV.1.1.2), manteniendo constante la velocidad de cizalla ($122,3 \text{ s}^{-1}$). La viscosidad de la suspensión celular no se afecta significativamente por la biomasa acumulada pero sí por la presencia de exopolisacárido, aumentando al hacerlo la concentración del mismo en el medio. De acuerdo con los datos que se presentan en la Figura 32, la viscosidad de la suspensión celular se mantiene a valores bajos cuando la concentración de EPS es inferior a $0,1 \text{ g l}^{-1}$, aumentando notablemente al superarse esta concentración.

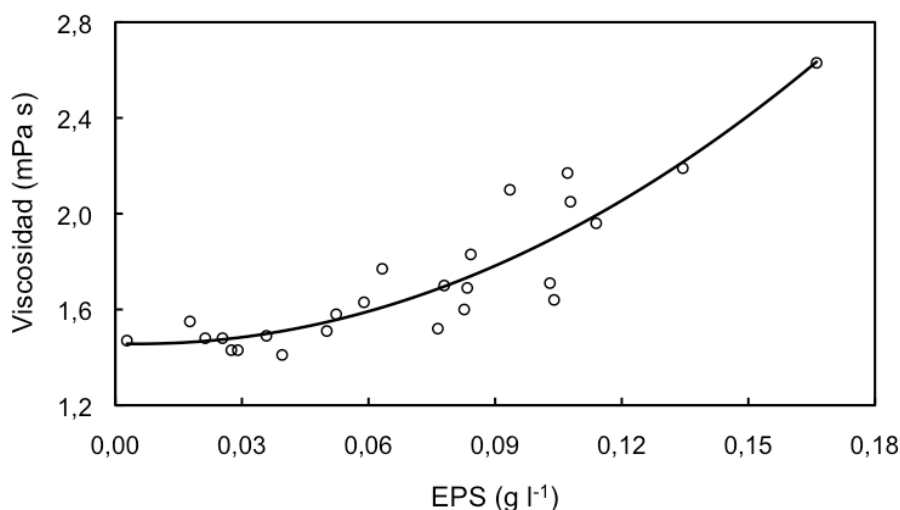


Figura 32. Influencia de la presencia de EPS en la viscosidad de cultivos de *Anabaena*.

Viscosidad determinada a una velocidad de cizalla de $122,3 \text{ s}^{-1}$ en cultivos continuos en fotoquimiostato. Condiciones experimentales como en Fig. 11.

El empleo de un viscosímetro rotacional provisto de adaptador para baja viscosidad permite establecer la relación existente entre la velocidad y el esfuerzo de cizalla para cultivos de *Anabaena* (Figura 33). Esta correlación se ajusta a una

ecuación potencial con dos parámetros característicos, n y K , donde K es el índice de consistencia del fluido (mPa s), y n es el índice de comportamiento de flujo (sin unidades). Cuando el valor de n es 1, el fluido tiene un comportamiento newtoniano, es decir la relación entre la velocidad de cizalla y el esfuerzo de cizalla es constante, indicando que la viscosidad es independiente del gradiente de velocidad. El agua, los aceites minerales, el vino o la leche, son algunos ejemplos de líquidos con comportamiento newtoniano. Cuando n es diferente a 1 se considera el fluido como no newtoniano, tipo de líquido más frecuente que el newtoniano. Los materiales cuya viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizalla se denominan pseudoplásticos, y presentan un valor de n menor que 1. Muchas sustancias de uso corriente, tales como emulsiones, suspensiones o dispersiones, pertenecen a este grupo. Si la viscosidad aparente aumenta al hacerlo la velocidad de cizalla ($n > 1$) el fluido se denomina dilatante. Suspensiones de partículas como arena y almidón son fluidos que presentan este comportamiento.

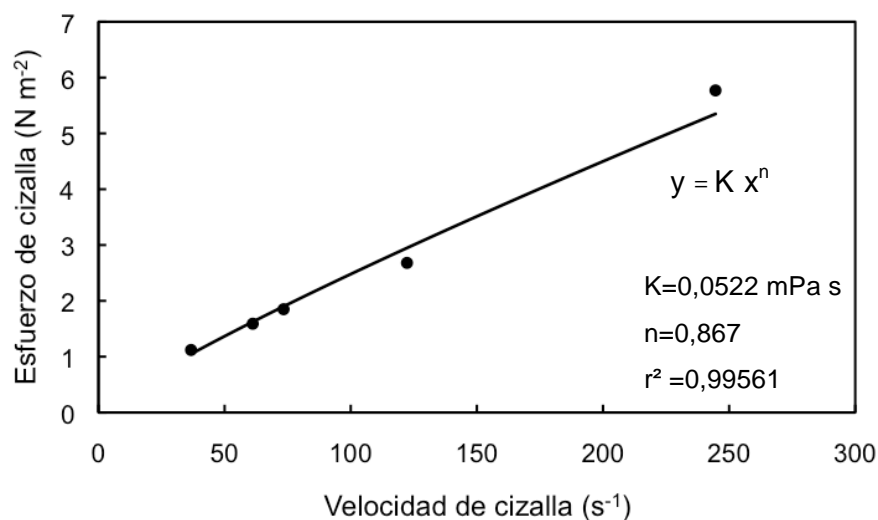


Figura 33. Relación entre velocidad de cizalla y esfuerzo de cizalla para un cultivo continuo de *Anabaena* conteniendo 0,134 g EPS l⁻¹.

A partir de los valores estimados para n y K en distintos cultivos en régimen continuo, conteniendo distintas concentraciones de EPS, puede concluirse que cuando la concentración de EPS es inferior a 0,1 g l⁻¹, el cultivo de *Anabaena* se comporta como un fluido no newtoniano dilatante, mientras que a concentraciones superiores se comporta como un fluido pseudoplástico. El incremento de la viscosidad asociado al aumento de la concentración de EPS conlleva una disminución del valor de n y un

incremento del de K , especialmente para concentraciones de EPS superiores a $0,05 \text{ g l}^{-1}$. (Figura 34).

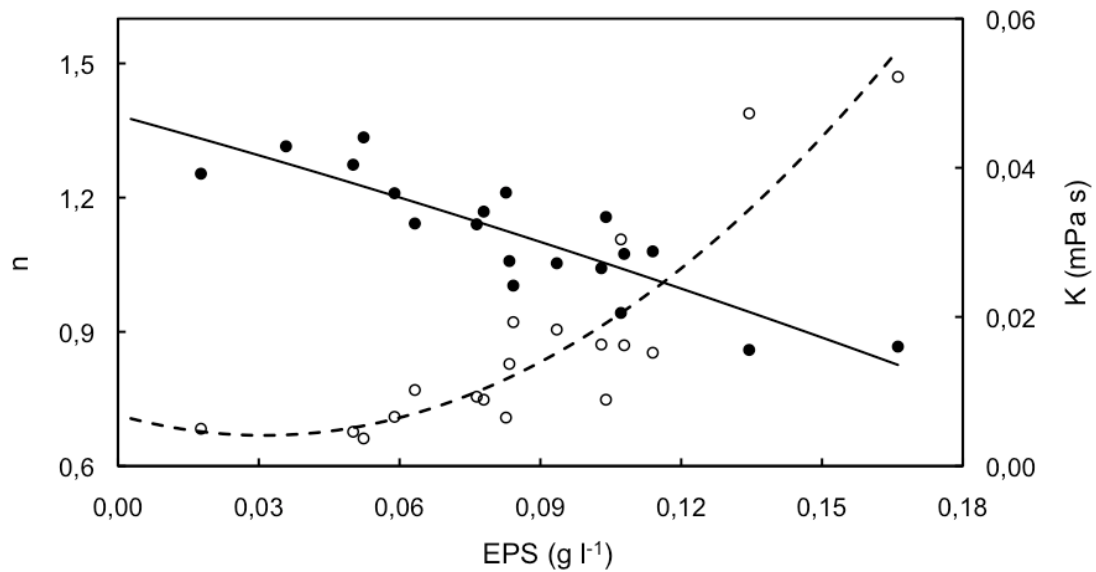


Figura 34. Efecto de la concentración de EPS en cultivos continuos en fotoquimostato sobre los valores de n y K . n (negro, línea continua); K (blanco, línea discontinua).

IV.2. CULTIVO DE *Anabaena* sp. ATCC 33047 AL EXTERIOR

Con el propósito de establecer el sistema de cultivo más idóneo para el cultivo de *Anabaena* a la intemperie, se ha comparado el comportamiento de cultivos mantenidos en régimen semicontinuo en tres tipos de reactores: estanques abiertos de 1 m^2 conteniendo 100 l de suspensión celular, reactor tubular de 55 l (RT) y reactor plano vertical de 350 l (RPV).

IV.2.1. Cultivo de *Anabaena* en estanque abierto

Se ha analizado el comportamiento de cultivos de *Anabaena* en estanques abiertos de 1 m^2 provistos de paletas rotatorias, operados en régimen semicontinuo, a pH 8,5, sin control de temperatura, a una velocidad de agitación de 16 rpm , con diluciones cada 2-3 días, y densidad celular inicial variable según las condiciones ambientales. La Figura 35 muestra la evolución de la concentración de biomasa en un cultivo representativo.

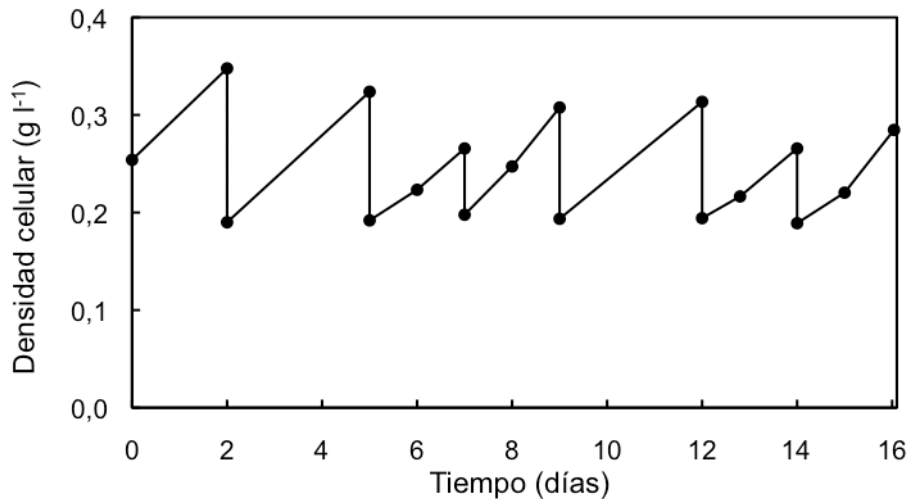


Figura 35. Evolución de la densidad celular de un cultivo de *Anabaena* en estanque abierto. Condiciones experimentales: intervalo de dilución 2-3 días; densidad celular inicial, 0,25 g l⁻¹; volumen de cultivo, 100 l; pH 8,5; temperatura ambiente media diaria, 23,1±2,8 °C; irradiancia media 21,6±1,4 MJ m⁻².

Como se ha constatado anteriormente, la densidad celular de un cultivo influye decisivamente sobre el aprovechamiento de la luz incidente por parte del mismo y, por ende, sobre su eficiencia. En el caso específico de cultivos semicontinuos, es esencial establecer el valor de densidad celular mínima al que debe diluirse un cultivo tras un ciclo de crecimiento. En la Figura 36 se muestran resultados de experiencias de cultivo en estanques que se mantienen a diferentes valores de densidad celular mínima (0,1-0,4 g l⁻¹). Con la excepción del cultivo mantenido a una densidad mínima de 0,1 g l⁻¹, cuyo progreso es claramente deficiente, la evolución de los restantes es razonablemente estable.

El efecto de la densidad celular mínima sobre el rendimiento de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanque abierto se pone de manifiesto en los resultados que se recogen en la Tabla 12. En las condiciones medioambientales en que se desarrolla la experiencia, el cultivo operado a 0,2 g l⁻¹ de densidad celular mínima es el que presenta una productividad de biomasa más elevada, así como mayor tasa de fijación de CO₂ que cultivos mantenidos a valores superiores de densidad celular mínima.

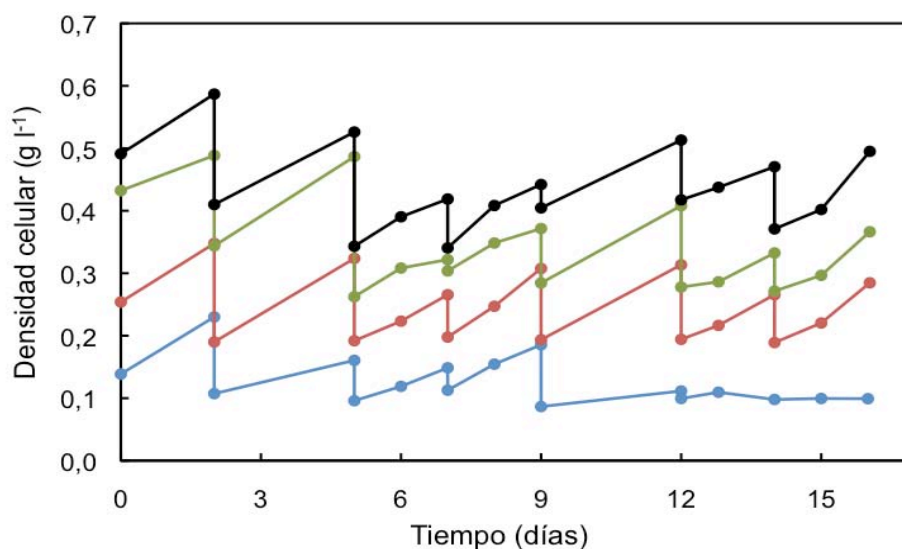


Figura 36. Efecto de la densidad celular mínima ($0,1 \text{ g l}^{-1}$ en azul; $0,2 \text{ g l}^{-1}$ en rojo; $0,3 \text{ g l}^{-1}$ en verde; $0,4 \text{ g l}^{-1}$ en negro) sobre el comportamiento de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanque abierto. Condiciones experimentales como en Fig. 35.

Tabla 12. Efecto de la densidad celular mínima sobre productividad de biomasa, productividad de EPS y tasa de fijación de CO_2 en cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanque abierto.

Densidad celular mínima (g l^{-1})	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Productividad EPS ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Tasa de fijación de CO_2 ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
0,1	0	0	0
0,2	$0,044 \pm 0,009$	$0,015 \pm 0,009$	$0,081 \pm 0,015$
0,3	$0,029 \pm 0,012$	$0,009 \pm 0,007$	$0,057 \pm 0,032$
0,4	$0,036 \pm 0,013$	$0,007 \pm 0,005$	$0,059 \pm 0,025$

Condiciones experimentales como en Fig. 35.

Experiencias análogas realizadas a irradiancia y temperatura media diaria de $18,1 \pm 0,65 \text{ MJ m}^{-2}$ y $28,5 \pm 1,8 \text{ }^\circ\text{C}$ arrojan una productividad de biomasa de $0,047 \pm 0,012 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, para cultivos mantenidos a densidades mínimas de $0,2$ y $0,3 \text{ g l}^{-1}$.

Para establecer el valor de pH más apropiado para desarrollar cultivos de *Anabaena* en estanque abierto, se ha analizado el rendimiento de cultivos mantenidos a una densidad celular mínima de $0,2 \text{ g l}^{-1}$ en un rango de pH comprendido entre $7,5$ y $9,0$ (Tabla 13). Los resultados muestran que ni la productividad de biomasa ni la tasa de fijación de CO_2 se afectan en el intervalo de pH estudiado, manteniéndose en valores de $0,050 \pm 0,016 \text{ g biomasa l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0,090 \pm 0,020 \text{ g CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Así, al exterior, en

régimen semicontinuo de cultivo, *Anabaena* muestra una amplia tolerancia a pH, como ocurre en cultivos continuos en condiciones controladas de laboratorio.

Tabla 13. Efecto del pH sobre el rendimiento de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanques abiertos.

pH	Productividad biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
7,5	0,047 ± 0,015	0,085 ± 0,015
8,0	0,052 ± 0,008	0,100 ± 0,018
8,5	0,048 ± 0,014	0,092 ± 0,016
9,0	0,049 ± 0,012	0,088 ± 0,013

Condiciones experimentales: intervalo de dilución, 2-3 días; densidad celular mínima, 0,2 g l⁻¹, temperatura media del cultivo, 25,4±3,3 °C; irradiancia media incidente, 20,6 ±3,4 MJ m⁻².

El rendimiento de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanques abiertos durante un periodo anual se muestra en la Tabla 14. La productividad máxima de *Anabaena* alcanza 0,054 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ en periodo estival (valores medios de irradiancia y temperatura, 18 MJ m⁻² y 29 °C, respectivamente). Aunque, en términos generales, la productividad del cultivo se influencia positivamente tanto por la irradiancia incidente como por la temperatura del cultivo, la incidencia de la temperatura sobre la productividad es especialmente marcada. En efecto, para un mismo valor de irradiancia incidente, de 18 MJ m⁻², se registra mayor productividad de biomasa cuando la temperatura es más elevada. Así, para un ascenso térmico de siete grados (de 21°C -primavera- a 28 °C -verano-), la productividad de biomasa aumenta un 40% (Tabla 14).

Tabla 14. Rendimiento de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanques abiertos.

Temperatura del cultivo (°C)	Irradiancia incidente (MJ m ⁻² d ⁻¹)	Productividad biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
17,8 ± 1,5*	15,3 ± 0,5*	0,010 ± 0,006*	0,015 ± 0,009*
21,2 ± 2,7	18,4 ± 3,8	0,028 ± 0,012	0,047 ± 0,013
23,7 ± 2,5	21,7 ± 1,4	0,044 ± 0,009	0,088 ± 0,015
25,4 ± 3,3	20,6 ± 3,4	0,048 ± 0,012	0,092 ± 0,016
28,5 ± 1,8	18,1 ± 0,7	0,054 ± 0,019	0,104 ± 0,022

Condiciones experimentales: intervalo de dilución, 2-3 días; densidad celular mínima, 0,2 g l⁻¹ (*0,1 g l⁻¹); pH 8,5.

Cuando los valores de irradiancia y temperatura son bajos, se hace necesario incrementar la duración del periodo entre diluciones o disminuir el valor de densidad celular mínima. Por ejemplo, un cultivo expuesto a a 15 MJ m^{-2} y $18 \text{ }^\circ\text{C}$ presenta la misma productividad de biomasa ($0,01 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) cuando se mantiene con diluciones cada 4 días a $0,2 \text{ g l}^{-1}$ de densidad celular mínima, que cuando se diluye cada 2-3 días a $0,1 \text{ g l}^{-1}$.

Aunque *Anabaena* presenta un amplio margen de tolerancia a la temperatura, la influencia de este factor sobre el rendimiento de los cultivos al exterior en estanques abiertos es realmente determinante. En las condiciones climáticas de Sevilla, el cultivo de esta cianobacteria en estanques abiertos sin control de temperatura solo es posible cuando la temperatura ambiente es superior a $15 \text{ }^\circ\text{C}$, presentando valores ínfimos o nulos de tasa de crecimiento por debajo de esta temperatura. La productividad media anual de biomasa para estos sistemas abiertos es $0,034 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ que supone una tasa de fijación de CO_2 de $0,061 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Teniendo en cuenta que la relación volumen/superficie en los estanques abiertos es de 100 l por m^2 , la producción media anual es $3,4 \text{ g biomasa m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, que corresponde a una tasa de fijación de CO_2 de $6,1 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

La composición elemental de la biomasa de *Anabaena* producida en los estanques para una irradiancia incidente de $20 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ es: $41,5 \pm 1,21\% \text{ C}$; $9,6 \pm 0,56\% \text{ N}$; $5,92 \pm 0,2\% \text{ H}$; $0,18 \pm 0,05\% \text{ S}$ y $28,5 \pm 0,31\% \text{ O}$.

IV.2.2. Cultivo de *Anabaena* en reactor tubular

Como queda patente, un factor determinante en el adecuado manejo de los cultivos es el régimen de dilución, que afecta considerablemente el rendimiento de los mismos. En el caso de cultivos en reactor tubular horizontal, con temperatura controlada y operados en régimen semicontinuo, retirando y renovando con medio fresco un 55% del volumen del reactor, se registran diferencias en rendimiento dependiendo de la frecuencia con que se realiza dicha operación. Cuando el intervalo entre diluciones es de 2-3 días, los valores de productividad de biomasa y EPS, así como la tasa de fijación de CO_2 , superan en un 25% a los obtenidos para el caso de diluciones cada 3-4 días (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto del intervalo de dilución sobre la productividad de biomasa y EPS de cultivos de *Anabaena* en reactor tubular.

Intervalo de dilución (días)	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Productividad EPS ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Tasa de fijación de CO_2 ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)
2-3	$0,42 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,11$
3-4	$0,31 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,07$

Condiciones de operación: volumen renovado en cada operación de dilución, 55% del total; pH 8,5; velocidad de circulación, $0,35 \text{ m s}^{-1}$; temperatura, $30 \text{ }^\circ\text{C}$; irradiancia incidente, $22,6 \pm 0,4 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

Para cultivos de *Anabaena* en reactor tubular operados en régimen semicontinuo con intervalos de dilución de 2-3 días, retirando en cada ciclo el 55% del cultivo, se ha seguido la evolución de su rendimiento desde otoño a verano. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de biomasa y EPS y la tasa de fijación de CO_2 de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en reactor tubular.

Irradiancia ($\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Productividad EPS ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Tasa de fijación de CO_2 ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)
$8,4 \pm 1,2$	$0,24 \pm 0,12$	0	$0,42 \pm 0,17$
$18,2 \pm 4,5$	$0,37 \pm 0,09$	$0,20 \pm 0,10$	$1,00 \pm 0,18$
$22,6 \pm 0,4$	$0,42 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,15$

Condiciones de operación: frecuencia de dilución, 2-3 días; volumen renovado en cada operación de dilución, 55% del total; temperatura, $30 \text{ }^\circ\text{C}$; pH, 8,5; velocidad de circulación, $0,35 \text{ m s}^{-1}$.

En estas condiciones, la mayor productividad de biomasa y EPS se obtiene cuando la irradiancia es máxima (verano). La producción de EPS, bastante notable a alta y media irradiancia, es inapreciable cuando la irradiancia es baja (Tabla 16). En invierno no puede mantenerse el régimen de dilución impuesto, ya que la tasa de crecimiento se reduce, como consecuencia de la baja disponibilidad lumínica, hasta hacerse menor que la tasa de dilución, por lo que el cultivo se diluye progresivamente hasta perderse. Sin embargo, incluso en invierno pueden mantenerse operativos los cultivos si se efectúan diluciones diarias, retirando cultivo y reponiendo medio fresco en el volumen adecuado para restablecer una densidad celular mínima adecuada en cada ciclo (Figura 37).

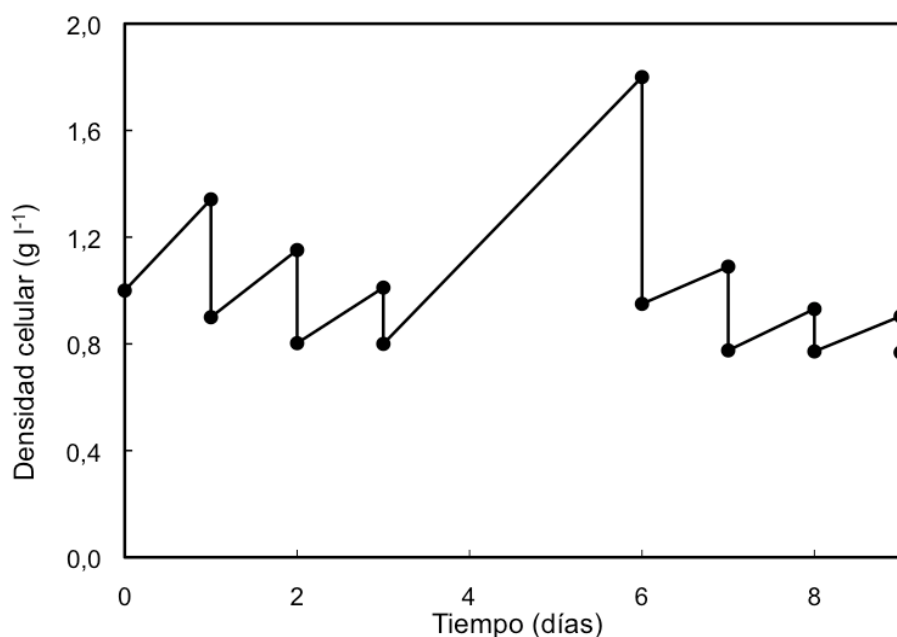


Figura 37. Evolución de un cultivo semicontinuo de *Anabaena* con dilución diaria en reactor tubular. Condiciones experimentales: dilución diaria; densidad celular mínima, 0,8 g l⁻¹; pH 8,5; velocidad de circulación, 0,35 m s⁻¹, irradiancia incidente 8,3 ± 3,1 MJ m⁻² d⁻¹; temperatura, 30°C.

El análisis del rendimiento de cultivos en condiciones de dilución diaria en comparación con otras de intervalos más largos (2-3 días) pone de manifiesto que la productividad de biomasa del cultivo diluido diariamente es un 33% superior, siendo la correspondiente tasa de fijación de CO₂ un 35% mayor (Tabla 17). No se observa acumulación de EPS en estos cultivos, en correspondencia con el bajo valor de irradiancia imperante (12 MJ m⁻² d⁻¹, otoño) cuando se realizaron estos ensayos.

Tabla 17. Efecto del intervalo de dilución sobre la productividad de biomasa y la tasa de fijación de CO₂ de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en reactor tubular mantenidos a densidad celular mínima constante.

Intervalo de dilución (días)	Productividad biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
1	0,45 ± 0,03	0,79 ± 0,05
2-3	0,30 ± 0,09	0,52 ± 0,07

Condiciones de cultivo: densidad celular mínima, 0,75 g l⁻¹; pH 8,5; velocidad de circulación 0,35 m s⁻¹; irradiancia incidente 12,0 ± 3,0 MJ m⁻² d⁻¹.

Realizando diluciones diarias para mantener la densidad celular mínima idónea en relación a la irradiancia incidente, se ha analizado la evolución de la productividad

de los cultivos en reactor tubular en distintas épocas del año (Tabla 18). Los valores más altos de productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ se registran en verano, cuando la irradiancia incidente sobre el cultivo es superior a 20 MJ m⁻² d⁻¹. En estas condiciones, la productividad es más del doble que la obtenida en periodos de baja irradiancia (Tabla 18), siendo asimismo superior a la de cultivos mantenidos con frecuencia de dilución de 2-3 días bajo irradiancia similar (Tabla 16). Es interesante observar que la tasa máxima de fijación de CO₂ (0,96 g l⁻¹ d⁻¹, Tabla 18) registrada en verano es, sin embargo, inferior a la obtenida en el mismo periodo para diluciones cada 2-3 días (1,17 g l⁻¹ d⁻¹, Tabla 18), lo que posiblemente se deba a la escasa o nula acumulación de EPS en cultivos con dilución diaria (datos no mostrados), a diferencia de la significativa acumulación registrada en ciclos de dilución más largos (Tabla 16). Así pues, la productividad de biomasa en cultivos semicontinuos en reactor tubular puede mantenerse a valores superiores a 0,20 g l⁻¹ d⁻¹ a lo largo del año, fijando adecuadamente, en función de la irradiancia incidente, el valor de la densidad celular mínima de los cultivos.

Tabla 18. Productividad de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en reactor tubular mantenidos en régimen de dilución diaria y a distinto valor de densidad celular mínima.

Irradiancia (MJ m ⁻² d ⁻¹)	Densidad mínima (g l ⁻¹)	Productividad biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
5,4 ± 3,8	0,60	0,26 ± 0,08	0,45 ± 0,07
7,0 ± 3,5	0,75	0,20 ± 0,06	0,35 ± 0,10
12,1 ± 2,3	0,75	0,45 ± 0,03	0,79 ± 0,05
21,1 ± 1,8	1,00	0,55 ± 0,08	0,96 ± 0,10

Condiciones experimentales: dilución diaria; temperatura, 30°; pH 8,5; velocidad de circulación, 0,35 m s⁻¹.

La productividad media anual estimada de cultivos semicontinuos para el diseño de reactor tubular utilizado es de 0,43 g biomasa l⁻¹ d⁻¹, que supone una tasa de fijación de CO₂ de 0,76 g l⁻¹ d⁻¹. Considerando que la relación volumen/superficie del RT es de 4,6 l m⁻², la productividad media expresada por unidad de superficie es 2 g m⁻² d⁻¹, con una tasa de fijación de CO₂ de 3,5 g m⁻² d⁻¹.

La composición elemental de biomasa de *Anabaena* procedente de cultivos en el reactor tubular (dilución cada 2-3 días; irradiancia incidente 20 MJ m⁻² d⁻¹) es: 47,7 ± 0,53% C; 12,5 ± 0,48% N; 6,9 ± 0,08% H; 0,32 ± 0,06% S y 26,4 ± 0,25% O. Los

niveles de carbohidratos, proteínas y lípidos fueron del orden de 17, 57 y 13% del peso seco.

IV.2.3. Cultivo de *Anabaena* en reactor plano vertical

Para optimizar el modo de operación del RPV se realizan diluciones periódicas siguiendo dos criterios diferentes. En la primera aproximación se diluyen los cultivos un volumen fijo, posteriormente se evalúa la productividad de los cultivos en RPV diluidos a un valor de densidad celular fija.

Tanto el volumen de dilución como su frecuencia son determinantes de la productividad de los sistemas diluidos un volumen fijo. Para conocer la relación entre estos parámetros y optimizar la operación del reactor, se han realizado distintas aproximaciones modificando tanto la frecuencia de dilución como el volumen de la misma para diversas irradiancias. En una primera aproximación, se establece como condición básica de dilución la retirada de cultivo y su renovación por medio fresco en un volumen de la mitad del total contenido en el reactor. Para determinar la frecuencia de dilución óptima, se analiza el efecto del intervalo entre diluciones (2, 3 ó 4 días) sobre la productividad. Los resultados se muestran en la Tabla 19. La productividad en biomasa de los cultivos que se diluyen cada 2 días es un 44% mayor que la de los cultivos para los que el intervalo de dilución es de 4 días y un 25% superior a los cultivos diluidos cada 3 días. La acumulación de EPS aumenta al hacerlo el intervalo de tiempo entre diluciones. También el máximo de la tasa de fijación de CO₂ se corresponde con intervalos de dilución de 2 días. Cuando se diluye cada 3 o 4 días, la tasa de fijación de CO₂ se mantiene elevada a pesar de la disminución en la producción de biomasa, como consecuencia del aumento en la acumulación de EPS.

Tabla 19. Efecto del intervalo de dilución sobre la productividad de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en RPV.

Intervalo de dilución (días)	Productividad biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Productividad EPS (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa de fijación de CO ₂ (g l ⁻¹ d ⁻¹)
2	0,130 ± 0,006	0,013 ± 0,003	0,194 ± 0,018
3	0,098 ± 0,015	0,038 ± 0,004	0,183 ± 0,022
4	0,073 ± 0,007	0,046 ± 0,012	0,161 ± 0,019

Condiciones experimentales: volumen renovado, 50% del total; irradiancia incidente, 22,5 ± 1,7 MJ m⁻² d⁻¹; temperatura, 30 °C; pH, 8,5; agitación, 8,6 l aire l⁻¹ min⁻¹.

Se ha ensayado también un régimen de dilución diario. Para esta condición y valor de la irradiancia incidente en el periodo en que se desarrollan los ensayos ($20,3 \pm 1,5 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), una renovación del 50% del volumen total del cultivo resulta excesiva, perdiéndose los cultivo por dilución. Se desarrollan posteriormente experiencias para un volumen de renovación del 30% del total. En esta última condición y con elevada irradiancia ($19,6 \pm 1,2 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), la dilución diaria resulta en una productividad de biomasa de $0,165 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y una tasa de fijación de CO_2 de $0,245 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, superiores a los obtenidos a irradiancia similar para intervalos de dilución más amplios (Tabla 19). Cuando las diluciones son diarias, no se produce acumulación de EPS.

La productividad de los cultivos en RPV presenta una estrecha dependencia de la irradiancia incidente. En los datos que se recogen en la Tabla 20 se aprecia que en condiciones de baja irradiancia la productividad de biomasa disminuye considerablemente. Así, cuando la disponibilidad de luz es baja, el cultivo crece más despacio, por lo que se debe reducir el volumen a renovar en las operaciones de dilución, al objeto de asegurar la viabilidad del cultivo.

Tabla 20. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de biomasa de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en RPV.

Irradiancia ($\text{MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
$6,7 \pm 1,8$	$0,088 \pm 0,016$
$19,6 \pm 1,2$	$0,165 \pm 0,013$

Condiciones experimentales: dilución diaria, volumen renovado 30% del total; pH 8,5; temperatura, 30 °C; agitación, $8,6 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Posteriormente se procede al estudio de la productividad de los cultivos en RPV diluidos periódicamente a un valor de densidad celular mínima. Este parece el método más adecuado para asegurar la viabilidad de los cultivos de *Anabaena*. Se estudia el efecto tanto de la frecuencia de dilución como del valor de densidad celular mínima para diferentes irradiancias.

El valor óptimo de densidad celular mínima cambia en función de la irradiancia incidente, deduciéndose a partir de la curva de crecimiento en cultivo estanco, a partir de la cual se valoran la duración de la fase exponencial y la tasa específica de

crecimiento (μ) en dicho periodo. Esta tasa se ve afectada significativamente por las condiciones ambientales, en especial la irradiancia. Para cada condición experimental particular y frecuencia de renovación de medio debe establecerse un valor de densidad celular mínima, próximo al que se encuentra al final de la fase exponencial de crecimiento que permita obtener la mejor productividad. Para el RPV se han determinado valores para μ de $0,13 \text{ d}^{-1}$ en febrero ($6,9 \pm 2,2 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) $0,37 \text{ d}^{-1}$ en mayo ($20,9 \pm 0,7 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y $0,071 \text{ d}^{-1}$ en octubre ($9,59 \pm 0,9 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) alcanzándose unas concentraciones de biomasa de $0,51$; $0,63$ y $0,44 \text{ g l}^{-1}$ respectivamente al final de la fase exponencial.

La influencia de la irradiancia incidente y de la densidad celular mínima sobre la productividad de los cultivos semicontinuos en RPV se presenta en la Tabla 21. Para valores análogos de densidad celular mínima (aprox. $0,2 \text{ g l}^{-1}$), la mayor productividad de biomasa se obtiene cuando la irradiancia es de $19,6 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ superando en un 40% a la productividad registrada a $7,6 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Cuando la densidad celular mínima establecida es superior a la idónea para el correspondiente valor de irradiancia (p.ej. $0,4 \text{ g l}^{-1}$ para una irradiancia incidente de $11,6 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), la productividad de los cultivos se reduce, decayendo igualmente la eficiencia fotosintética de los mismos.

Tabla 21. Efecto de la irradiancia incidente y la densidad celular mínima sobre la productividad de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en RPV.

Irradiancia ($\text{MJ m}^{-2}\text{d}^{-1}$)	Densidad mínima (g l^{-1})	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	R (g MJ^{-1})	Eficiencia fotosintética (%)
$6,7 \pm 1,8$	0,30	$0,074 \pm 0,024$	1,33	2,99
$7,6 \pm 2,9$	0,20	$0,065 \pm 0,023$	1,03	2,32
$11,6 \pm 3,6$	0,40	$0,042 \pm 0,008$	0,44	0,98
$19,6 \pm 1,2$	0,25	$0,105 \pm 0,009$	0,65	1,45

Condiciones experimentales: intervalo de dilución, 2-3 días; temperatura, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; pH 8,5; agitación, $8,6 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Con objeto de aumentar la productividad de los cultivos se reduce el intervalo de dilución a un día (Figura 38). En estas condiciones se estudia el efecto de la densidad celular mínima para diferentes irradiancias.

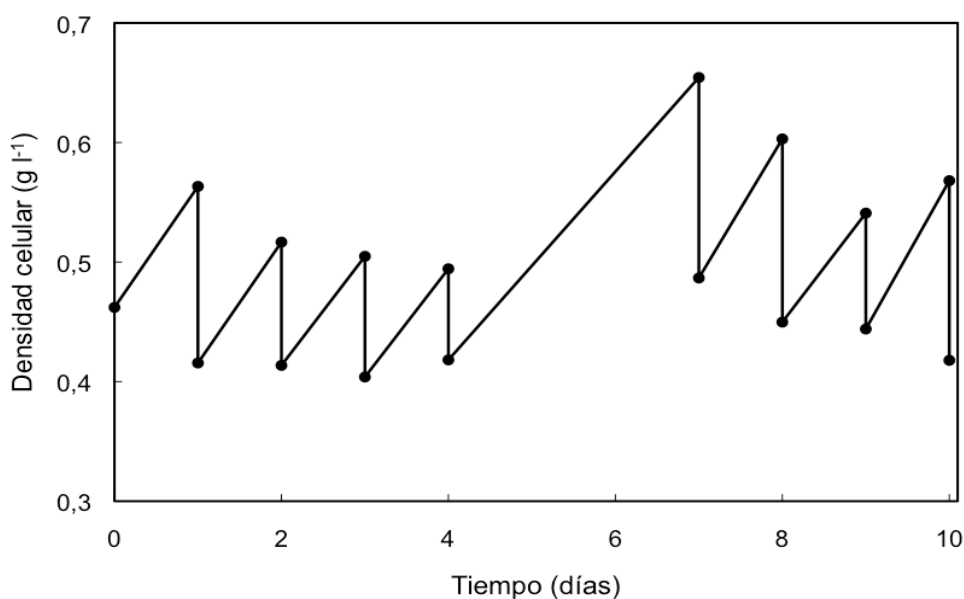


Figura 38. Evolución de la densidad celular en un cultivo semicontinuo de *Anabaena* en reactor vertical plano. Productividad en biomasa $0,170 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y tasa de fijación de CO_2 , $0,246 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Condiciones experimentales: densidad celular mínima, $0,4 \text{ g l}^{-1}$; pH 8,5; temperatura, $30 \text{ }^\circ\text{C}$; agitación, $8,6 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; irradiancia media, $21,2 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

En un régimen de dilución diaria, para un valor de densidad celular mínima en torno a $0,4 \text{ g l}^{-1}$, la productividad de los cultivos aumenta al hacerlo la irradiancia incidente (Tabla 22). El valor máximo de productividad ($0,17 \text{ g biomasa l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se registra en el periodo estival ($21,2 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), siendo más del doble que el correspondiente a una irradiancia de $5,7 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (invierno). La respuesta de la tasa de fijación de CO_2 a la irradiancia es análoga a la de la productividad de biomasa (Tabla 22).

Tabla 22. Efecto de la irradiancia incidente sobre la productividad de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en RPV mantenidos con un régimen de dilución diaria.

Irradiancia ($\text{MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$)	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Tasa fijación de CO_2 ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	R (g MJ^{-1})	Eficiencia fotosintética (%)
$5,7 \pm 1,5$	$0,070 \pm 0,013$	$0,084 \pm 0,018$	1,48	3,32
$9,9 \pm 3,4$	$0,087 \pm 0,014$	$0,124 \pm 0,037$	1,06	2,38
$14,3 \pm 2,1$	$0,141 \pm 0,039$	$0,175 \pm 0,048$	1,19	2,67
$18,7 \pm 1,3$	$0,168 \pm 0,021$	$0,196 \pm 0,037$	1,08	2,42
$21,2 \pm 1,5$	$0,170 \pm 0,009$	$0,246 \pm 0,048$	0,97	2,18

Condiciones experimentales: densidad celular mínima $0,4 \text{ g l}^{-1}$; pH 8,5; agitación, $8,6 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; temperatura, $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

La eficiencia fotosintética de los cultivos en RVP supera el 3% en condiciones de baja irradiancia ($5,7 \text{ MJ m}^{-2}$), manteniéndose constante, alrededor del 2,5% para valores superiores de irradiancia. En correspondencia, mientras que a baja irradiancia se produce alrededor de 1,5 g de biomasa por MJ de irradiancia recibida, el valor de R se encuentra en torno a 1 g MJ^{-1} para valores e irradiancia incidente entre 10 y $21 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Tabla 22). La comparación del rendimiento de los cultivos mantenidos con dilución diaria (Tabla 22) frente a aquellos desarrollados con intervalo de dilución de 2-3 días (Tabla 21), pone claramente de manifiesto la mayor eficiencia y productividad para el régimen de dilución diaria. Específicamente, para valores de irradiancia incidente próximos a $10 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y una densidad celular mínima de $0,4 \text{ g l}^{-1}$ la productividad es prácticamente el doble cuando se diluye diariamente (Tablas 21 y 22).

El efecto de la densidad celular mínima sobre la productividad se presenta en la Tabla 23. Como ocurre en las experiencias anteriores, la mayor eficiencia fotosintética se obtiene a baja irradiancia, independientemente de la densidad celular mínima a la que se diluye el cultivo, superando el 3% cuando la irradiancia incidente es inferior a 8 MJ m^{-2} .

Tabla 23. Efecto de la irradiancia incidente y la densidad celular mínima sobre la productividad de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en RPV mantenidos con un régimen de dilución diaria.

Irradiancia (MJ m^{-2})	Densidad celular mínima (g l^{-1})	Productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Tasa fijación de CO_2 ($\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	R (g MJ^{-1})	Eficiencia fotosintética (%)
$5,9 \pm 2,3$	0,20-0,25	$0,077 \pm 0,032$	$0,124 \pm 0,045$	1,58	3,55
$7,8 \pm 3,5$	0,30-0,35	$0,109 \pm 0,031$	$0,160 \pm 0,040$	1,69	3,79
$13,6 \pm 3,2$	0,15-0,20	$0,128 \pm 0,046$	$0,172 \pm 0,061$	1,14	2,56
$20,2 \pm 3,5$	0,30-0,35	$0,091 \pm 0,036$	$0,141 \pm 0,047$	0,54	1,21

Condiciones experimentales: pH 8,5; agitación, $8,6 \text{ l l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; temperatura, $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Analizando conjuntamente las Tablas 22 y 23 resulta patente que la productividad de los cultivos es el resultado de la interacción entre densidad celular mínima, frecuencia de dilución e irradiancia disponible. Así, la productividad se mantiene prácticamente igual a $5,7 \text{ MJ m}^{-2}$ para los valores de densidad celular mínima de 0,2 y $0,4 \text{ g l}^{-1}$. Se obtiene un rendimiento mayor del cultivo cuando la

irradiancia incidente es $7,8 \text{ MJ m}^{-2}$ para $0,3 \text{ g l}^{-1}$ que cuando el cultivo está a $9,9 \text{ MJ m}^{-2}$ y la densidad celular mínima es $0,4 \text{ g l}^{-1}$, como refleja su eficiencia fotosintética. (3,78 y 2,7% respectivamente). Los cultivos sometidos a irradiancias superiores a 14 MJ m^{-2} presentan una mayor productividad cuando la densidad celular mínima es $0,4 \text{ g l}^{-1}$.

Considerando que los cultivos pueden mantenerse a lo largo del año en condiciones de producción, ajustando adecuadamente las variables del cultivo a la irradiancia, la productividad media a lo largo del periodo anual para cultivos semicontinuos en RPV sería $0,11 \text{ g biomasa l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0,17 \text{ g CO}_2 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dado que la relación volumen/superficie para este reactor es 140 l m^{-2} , se deriva una productividad por unidad de área de $15,3 \text{ g biomasa m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $23,9 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

El análisis elemental de la biomasa procedentes de cultivos semicontinuos en RPV (ciclo de dilución 2-3 días, 20 MJ m^{-2}) arroja los siguientes valores: $44,9 \pm 0,93\%$ de C; $11,7 \pm 0,47\%$ de N; $6,53 \pm 0,012\%$ de H; $0,24 \pm 0,05\%$ de S; $26,9 \pm 0,07\%$ de O. En cuanto a la composición molecular de la biomasa, el 18,9% son carbohidratos correspondiendo el 48,9% a proteínas y el 10,2% a lípidos.

IV.3. ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICA Y NITROGENASA DE *Anabaena* DURANTE EL CICLO DIARIO

Para un mejor conocimiento de la fisiología de los cultivos, es importante verificar la evolución de la capacidad fotosintética de las células, de la que en último término depende la productividad del cultivo, a lo largo del ciclo diario. Por otra parte, el seguimiento de la actividad nitrogenasa suministra información esencial acerca de la capacidad de adquisición de nitrógeno por parte de las células, en un medio sin fuente combinada de este elemento.

IV.3.1. Actividades fotosintética y nitrogenasa en cultivos continuos en fotoquimiostato

Se ha analizado la evolución de las actividades fotosintética y nitrogenasa a lo largo de un ciclo diario en cultivos continuos de *Anabaena* operados en condiciones óptimas, con irradiancia incidente máxima de $2800 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Los cultivos procedentes de oscuridad presentan aproximadamente la mitad de la tasa fotosintética máxima registrada. La tasa fotosintética aumenta al hacerle la luz incidente hasta estabilizarse y mantenerse alrededor de $95 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ durante las horas de máxima irradiancia. Posteriormente se aprecia un descenso paulatino de la actividad fotosintética, al hacerle la irradiancia incidente, hasta alcanzarse los valores propios de los cultivos en oscuridad al final del periodo de iluminación (Figura 39).

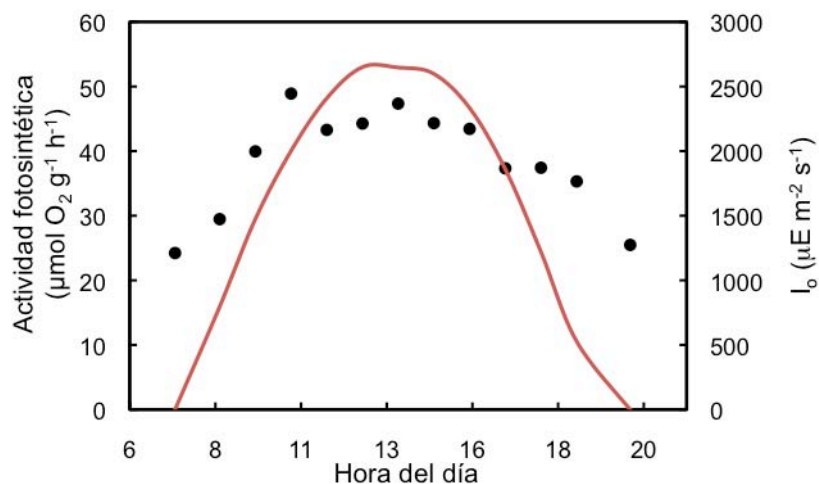


Figura 39. Evolución de la actividad fotosintética en cultivos continuos de *Anabaena* en fotoquimiostato a lo largo de un ciclo de iluminación. Actividad fotosintética (puntos) e irradiancia incidente (línea continua). Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,056 \text{ h}^{-1}$; $35 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 9; $40 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$; medio de cultivo estándar; ciclo circadiano de 12 h de luz.

La actividad nitrogenasa, que es mínima al final del periodo de oscuridad, aumenta al iniciarse la fase de iluminación, elevándose hasta estabilizarse en torno a $90\text{-}100 \mu\text{mol etileno g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ cuando la irradiancia incidente alcanza o supera los $2300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 40). Cuando la irradiancia decae, la actividad nitrogenasa disminuye progresivamente, aunque con menor pendiente que la de la irradiancia incidente. En oscuridad, el cultivo mantiene una actividad basal de unos $10 \mu\text{mol etileno g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

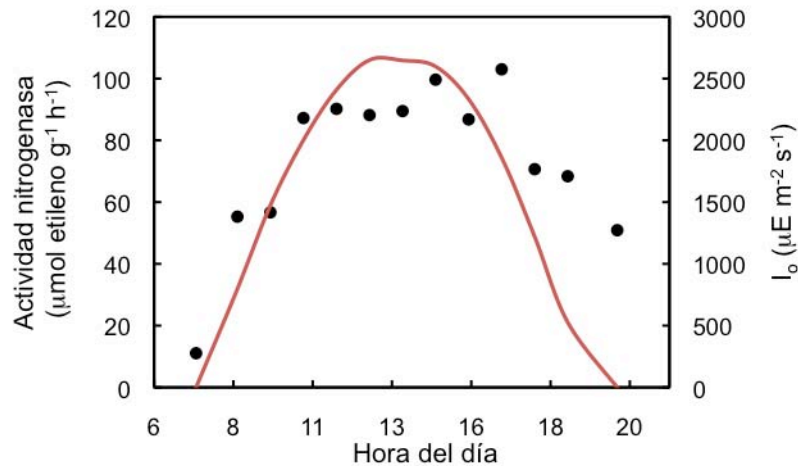


Figura 40. Evolución de la actividad nitrogenasa de un cultivo de *Anabaena* en régimen continuo en fotoquimiostato a lo largo de un ciclo diario. Actividad nitrogenasa (puntos) e irradiancia incidente (línea). Condiciones experimentales como en Fig. 39.

IV.3.2. Actividades fotosintética y nitrogenasa en cultivos en RPV

La evolución diaria de la actividad fotosintética de *Anabaena* en un cultivo a la intemperie en reactor plano vertical se muestra en la Figura 41. Puede observarse un comportamiento respecto a la luz similar al apreciado en los cultivos continuos en el laboratorio, aumentando la actividad fotosintética a medida que lo hace la irradiancia incidente, alcanzando tasas de $110 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ entre las 10 y las 14 horas, para disminuir progresivamente hasta el valor inicial de $76 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

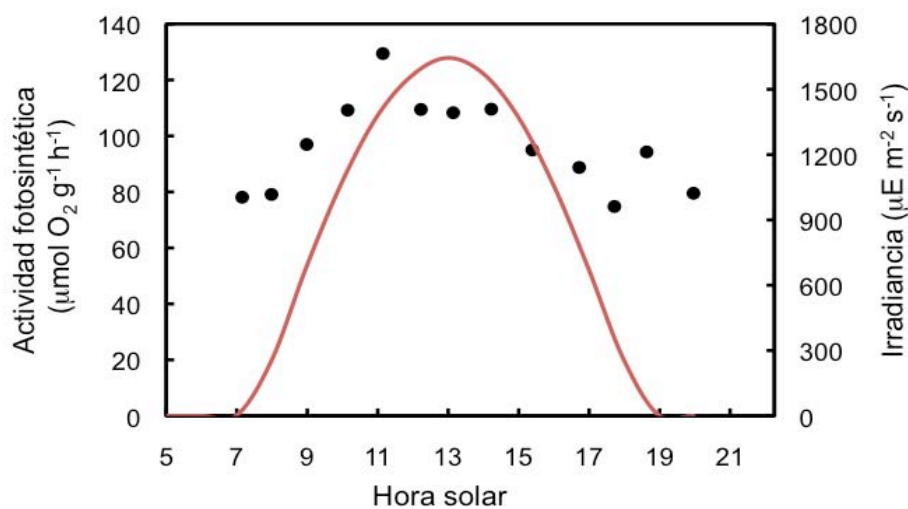


Figura 41. Evolución de la actividad fotosintética en un cultivo de *Anabaena* en reactor plano vertical. Actividad fotosintética (puntos) e irradiancia incidente (línea continua). Condiciones experimentales: pH 8,5, temperatura 30 °C, agitación $8,6 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Se ha efectuado, asimismo, un seguimiento de la actividad nitrogenasa a lo largo de un ciclo diario en cultivos a la intemperie en reactor plano vertical. A partir del nivel mínimo, que se registra durante la noche, se constata un notable incremento del nivel de actividad nitrogenasa en respuesta al aumento de la irradiancia incidente (Figura 42), alcanzándose valores máximos entre las 9 y 12 horas. A partir de ese momento, la actividad nitrogenasa disminuye al hacerlo la irradiancia, hasta recuperarse el valor de $46 \mu\text{mol etileno g}^{-1} \text{biomasa h}^{-1}$ en condiciones de oscuridad.

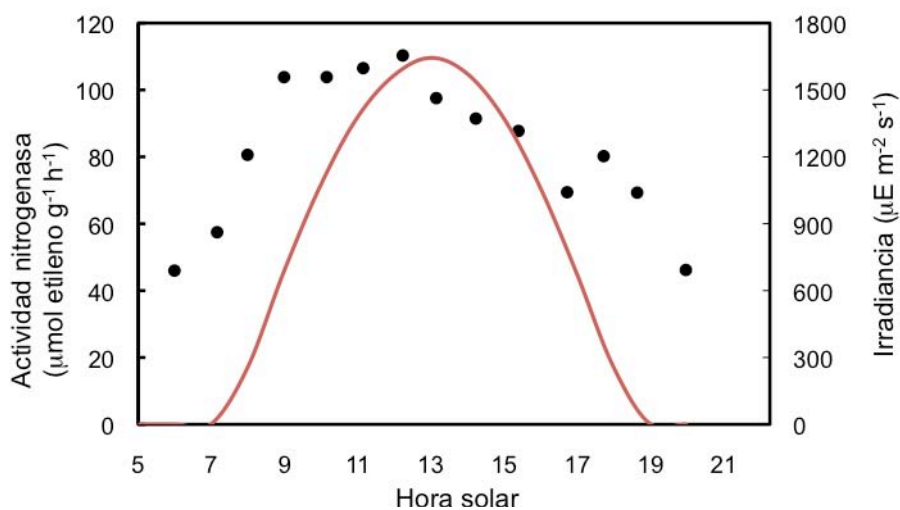


Figura 42. Evolución de la actividad nitrogenasa en un cultivo de *Anabaena* en reactor plano vertical. Actividad nitrogenasa (puntos) e irradiancia incidente (línea continua). Condiciones experimentales como en Fig. 41.

IV.4. SEDIMENTACIÓN DE LA BIOMASA DE *Anabaena*

La capacidad de *Anabaena* para autoflocular facilita la separación de su biomasa del medio de cultivo por sedimentación gravitacional. El comportamiento específico de la biomasa de *Anabaena* en cuanto a su autofloculación depende de la concentración de biomasa en el cultivo, así como del sistema de cultivo empleado. De forma general, la sedimentación es completa a los 30 minutos (Figura 43).



Figura 43. Sedimentación de biomasa de *Anabaena* procedente de RPV. De izquierda a derecha los tiempos de sedimentación son: 0, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 minutos. Concentración de biomasa $0,5 \text{ g l}^{-1}$.

La velocidad de sedimentación de la biomasa de *Anabaena* está influenciada por su concentración en el cultivo, siendo los cultivos más concentrados los que sedimentan a mayor velocidad. En el caso particular de cultivos procedentes de reactor plano vertical, cuando la densidad celular es $0,4 \text{ g l}^{-1}$, tras diez minutos de decantación, sedimenta un 80% de la biomasa, mientras que en el mismo intervalo de tiempo sólo sedimenta un 30% del total cuando la densidad es de $0,1 \text{ g l}^{-1}$ (Figura 44). El cultivo procedente de estanque abierto tiene un comportamiento análogo al del RPV para unos valores de densidad celular similares. En el caso de cultivos recogidos del reactor tubular, la sedimentación, tras 60 minutos, es de un 63% para una densidad de $1,4 \text{ g l}^{-1}$, de un 36% cuando el cultivo contiene $0,7 \text{ g l}^{-1}$ de biomasa, y de un 20% cuando la densidad del cultivo es de $0,33 \text{ g l}^{-1}$.

Para una misma concentración de biomasa ($0,4 \text{ g l}^{-1}$), los cultivos procedentes de reactor plano vertical son los que sedimentan más rápidamente, siendo los procedentes de reactor tubular los que lo hacen más despacio. Así, tras 60 minutos, sedimenta un 85% de la biomasa de los cultivos procedentes de RPV un 87% de la de estanque abierto, y sólo un 60% en el caso de los cultivos de reactor tubular.

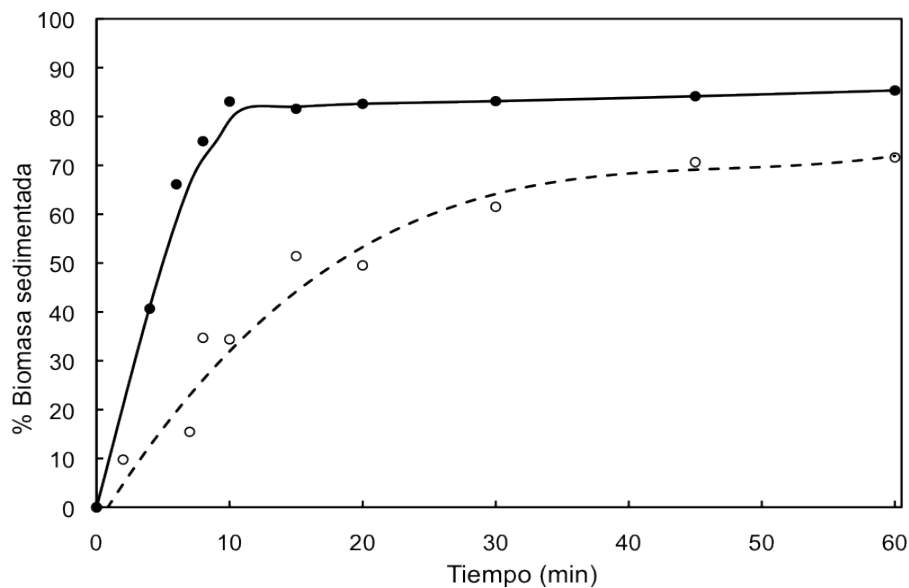


Figura 44. Efecto de la densidad celular del cultivo en reactor plano vertical sobre la sedimentación de su biomasa. Círculos negros: densidad celular, 0,4 g l⁻¹ (ajuste, línea continua); círculos blancos: densidad celular, 0,1 g l⁻¹ (ajuste, línea discontinua),

IV.5. SEPARACIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO GENERADO POR *Anabaena*

Como ha quedado patente en apartados anteriores, en determinadas condiciones de crecimiento, *Anabaena* excreta un EPS con potenciales usos prácticos, que puede conferir valor añadido a sus cultivos. La elección de un proceso adecuado de recuperación del EPS es crítica, tanto bajo el punto de vista de su coste como de su funcionalidad. El primer paso es la separación del EPS de la biomasa celular, proceso complejo considerando la elevada viscosidad del cultivo y la asociación del EPS a la pared celular de la cianobacteria (Morin, 1998). Se han ensayado distintos tratamientos para facilitar dicha separación: calentamiento, agitación, y la combinación de ambos.

IV.5.1. Tratamiento térmico

Fijando un tiempo de tratamiento de 15 minutos y variando la temperatura entre 55 y 100 °C, se recupera un 82% de los EPS del cultivo en el sobrenadante para el tratamiento a 70 °C y temperaturas superiores. Esto es un 40% más de lo que se recupera sin calentar. Establecida esta temperatura de 70 °C se ha modificado el tiempo de tratamiento: 15, 30, 60 y 120 minutos. Desde los 15 minutos, la

recuperación del EPS es del 87%, frente al 43% de un control sin tratar y no se mejora con tratamientos más prolongados.

IV.5.2. Agitación

El porcentaje de recuperación de EPS en el sobrenadante aumenta con la duración del tratamiento, hasta alcanzarse el 81% tras 20 minutos de agitación. Este valor se puede incrementar hasta el 95% si se duplica la intensidad de la agitación, y se reduce el tratamiento a 10 minutos (Figura 45).

La combinación de choque térmico y agitación, no supone mejora alguna en la recuperación del EPS. Otros tratamientos ensayados como la sonicación o la adición de NaOH (concentración final 0,16 M), provocan la lisis celular de *Anabaena*, siendo inviables para este propósito.

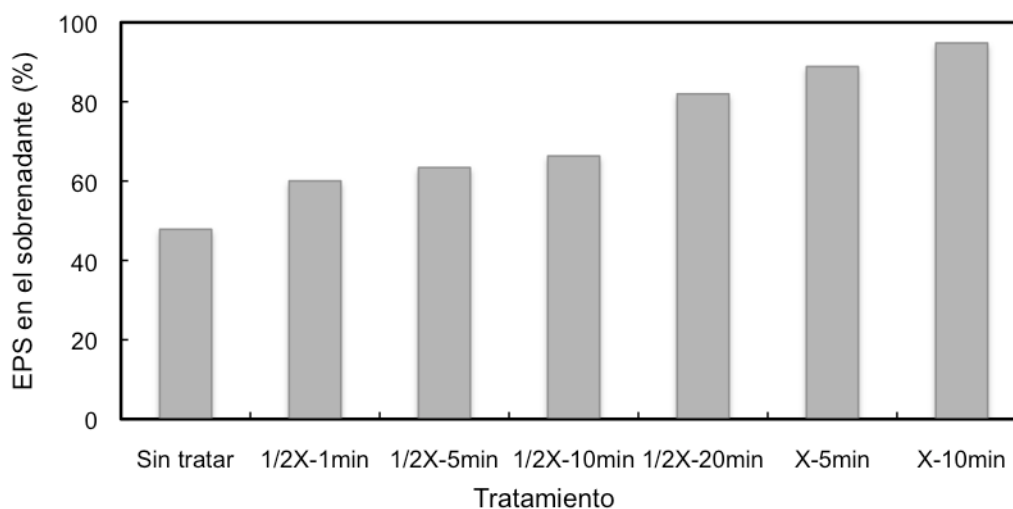


Figura 45. Efecto de la intensidad y duración de la agitación sobre la recuperación del EPS generado por *Anabaena*.

IV.6. REMOCIÓN DE Cd²⁺ POR *Anabaena* EN UN SISTEMA INMOVILIZADO

Se considera en este apartado la inmovilización de filamentos de *Anabaena* en un soporte sólido idóneo y el empleo de dicho sistema inmovilizado para la remoción de cadmio presente en solución, como un uso adicional para esta biomasa.

IV.6.1. Inmovilización de *Anabaena*

IV.6.1.1. Selección y preparación del soporte

A la hora de seleccionar un soporte para la inmovilización de *Anabaena* que reúna las condiciones de ser inerte, no tóxico, poroso y con alta capacidad de retención de biomasa se ha optado por esponjas de poliuretano.

Si bien algunos precursores de polímeros sintéticos pueden ser tóxicos para las microalgas, el poliuretano parece comportarse como un material inocuo e inerte en lo relativo a efectos sobre el crecimiento celular (Rao y Hall, 1984; Urrutia y col., 1995). Con el fin de evitar que algún precursor u otra sustancia tóxica esté presente en la esponja de poliuretano como resultado de su fabricación y pueda afectar a *Anabaena*, previamente a su contacto con las células, los fragmentos de esponja se lavan con abundante agua destilada caliente, manteniéndose una vigorosa agitación durante el proceso de lavado. Posteriormente, se secan en estufa a 80 °C, tras lo cual se colocan en una campana de desecación hasta alcanzar temperatura ambiente.

Los fragmentos de esponja deben ser esterilizados antes de su uso. La elevada temperatura de esterilización en autoclave podría facilitar la liberación de sustancias indeseadas no eliminadas durante el lavado inicial, por lo que se han considerado diferentes protocolos para la preparación de los sistemas inmovilizados, tratando separadamente el medio y el soporte, o conjuntamente.

Por otro lado, es necesario establecer el orden de adición de los elementos del sistema inmovilizados (soporte, medio, células) por si se modifica su viabilidad. Al no observarse diferencias de viabilidad del cultivo entre los distintos procedimientos ensayados, se ha optado por el procedimiento más simple a efectos operativos: añadir el inóculo a la mezcla de medio de cultivo y esponjas, previamente esterilizadas conjuntamente en autoclave.

Se han considerado también distintas opciones para favorecer el contacto entre las esponjas y la biomasa de *Anabaena*: agitación mecánica, en matraces Erlenmeyer dispuestos en agitador orbital, y agitación mediante burbujeo de aire a 20 l aire l⁻¹ h⁻¹ con CO₂ al 1% en frascos de Roux (Figura 46). Esta segunda opción permite la incorporación de *Anabaena* al soporte de forma más eficiente.

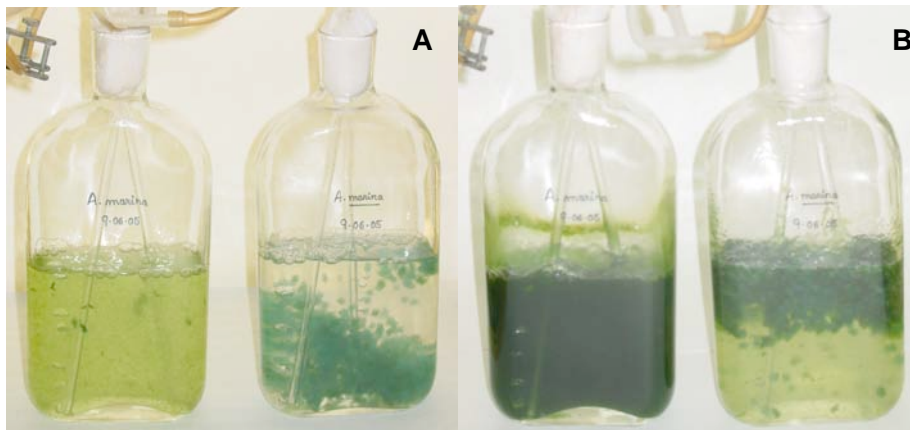


Figura 46. Cultivos de *Anabaena* en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de soporte, tras uno (A) y cuatro (B) días de cultivo.

La retención de los filamentos de *Anabaena* en el soporte de esponja de poliuretano es un proceso rápido, que tiene lugar, para las condiciones fijadas, en 45-60 minutos tras la adición del inóculo, quedando el medio de cultivo libre de células y la biomasa retenida por el soporte.

La naturaleza filamentosa de *Anabaena* facilita su inmovilización pasiva en el soporte de poliuretano. Los filamentos quedan retenidos en los poros de las esponjas, creciendo en su interior, como se aprecia en la Figura 47.

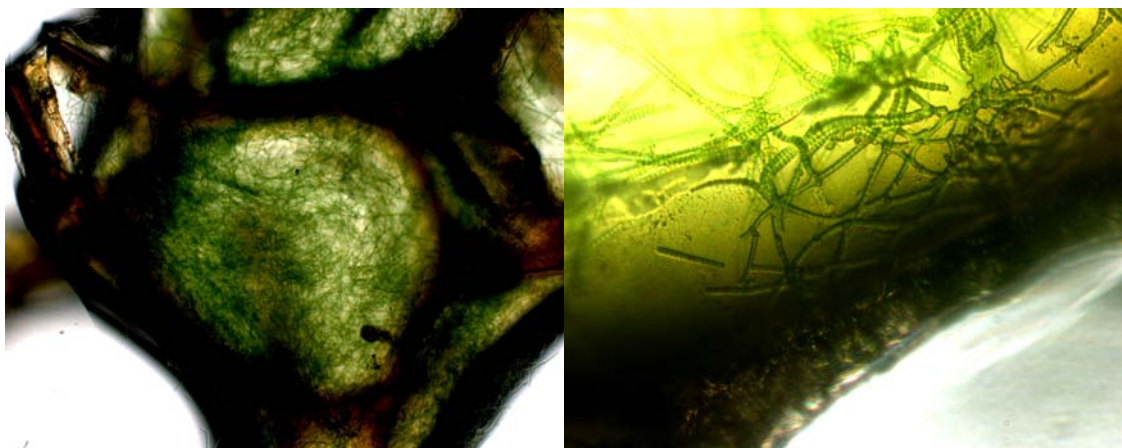


Figura 47. Imágenes al microscopio óptico de filamentos de *Anabaena* inmovilizados en esponja de poliuretano. La imagen de la izquierda es 4x y la de la derecha es 20x.

Una vez establecido un procedimiento adecuado para la inmovilización de *Anabaena* en esponja de poliuretano, se ha procedido a la elección de la trama, así como de la forma y tamaño más adecuado para el soporte.

Para seleccionar la trama de esponja se ha prestado especial atención a la retención de la biomasa por el soporte. Se han probado diferentes tipos de trama, de más a menos tupida: TM 23133, TM 23190, TM 23450 (1060-1600; 1600-2200 y 3400-5600 μm de diámetro de poro, respectivamente), encontrándose que el intermedio, TM 23190 (1600-2200 μm), es el más adecuado para la retención de *Anabaena*. La trama más tupida puede presentar problemas de difusión de nutrientes y limitación de luz. En el soporte con trama menos tupida se dan problemas de estabilidad del sistema inmovilizado, liberándose fácilmente la biomasa retenida.

Tanto la geometría como el tamaño de los fragmentos de soporte puede influenciar la capacidad de inmovilización. Al objeto de comparar adecuadamente la capacidad de carga de fragmentos de esponja de poliuretano con diferente formato ha de verificarse la fórmula más adecuada para expresar dicha capacidad de inmovilización, bien en base a unidad de peso o a unidad de superficie.

En una primera aproximación, se ha operado con fragmentos de distinto formato (discos y cubos), empleando un mismo peso total de soporte (1 g materia seca) que se incubaba en un volumen idéntico de medio de cultivo conteniendo, asimismo, una misma cantidad de inóculo inicial. Tras seis días de incubación, se recogen los fragmentos de esponja, de los que se extrae para su valoración la biomasa retenida. En todos los casos, el valor correspondiente a la cantidad de biomasa inmovilizada por unidad de peso del soporte es el mismo ($117 \pm 7,5$ mg biomasa g^{-1} soporte), independientemente de la forma y el tamaño de los fragmentos.

Para calcular la capacidad de carga por unidad de superficie de esponja de poliuretano se han realizado ensayos del tipo anteriormente mencionado, empleando en cada caso un número de fragmentos de un formato específico fijando una superficie total por ensayo de 60 cm^2 . Cuando se emplean fragmentos de forma cúbica y distinto tamaño de lado (4,5 mm y 10 mm), se comprueba que la capacidad de carga por unidad de superficie es mayor en los cubos grandes (mayor tamaño de lado y mayor razón volumen/superficie) que en los pequeños (Tabla 24).

Tabla 24. Efecto del tamaño de los fragmentos cúbicos de esponja de poliuretano sobre su capacidad de carga en la inmovilización de *Anabaena*.

Tamaño de lado (mm)	Biomasa inmovilizada	
	(mg)	(mg cm ⁻²)
4,5	17,1	0,29
10	49,8	0,83

Condiciones experimentales: tiempo de incubación, 6 días; irradiancia incidente, 160 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 20 l aire l⁻¹ h⁻¹; temperatura, 30 °C; superficie externa total de soporte, 60 cm². La biomasa se calculó a partir de la valoración de clorofila.

En cuanto a la influencia de la geometría del soporte sobre su capacidad de carga, se ha comparado la eficiencia relativa de cubos y discos en ensayos en los que la superficie externa total del soporte, independientemente de su formato, es de 60 cm² (Tabla 25). Se ha verificado así que el disco, que presenta un valor de la relación volumen/superficie superior al del cubo, es un formato más adecuado para la retención de los filamentos de *Anabaena*, poseyendo mayor capacidad de carga.

Tabla 25. Efecto de la geometría de los fragmentos de esponja de poliuretano sobre su capacidad de carga en la inmovilización de *Anabaena*.

Formato	Biomasa inmovilizada	
	(mg)	(mg cm ⁻²)
Cubo	49,8	0,83
Disco	63,3	1,05

Condiciones experimentales como en la Tabla 24.

Una vez seleccionado el mejor formato de soporte, se han llevado a cabo diferentes ensayos con el objetivo de optimizar la inmovilización de *Anabaena*, habiéndose valorado en concreto la influencia de tres importantes parámetros: biomasa inicial necesaria para una carga eficiente del soporte, tiempo de carga y superficie total de soporte.

IV.6.1.2. Efecto de la densidad celular inicial sobre la inmovilización de *Anabaena*

Empleando para la inmovilización discos de esponja de poliuretano que suministren una superficie total de soporte de 125 cm², se ensayan distintas concentraciones de biomasa de *Anabaena* como inóculo inicial para la inmovilización (0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 g l⁻¹). A tiempo final (4 días) se valora la cantidad de biomasa retenida en los soportes y la biomasa libre en el medio.

La biomasa total inmovilizada es similar en todos los casos, independientemente de la densidad celular inicial (Figura 48) y supone 0,59 ± 0,04 mg biomasa cm⁻². La biomasa libre en el medio está directamente relacionada con la concentración de inóculo inicial.

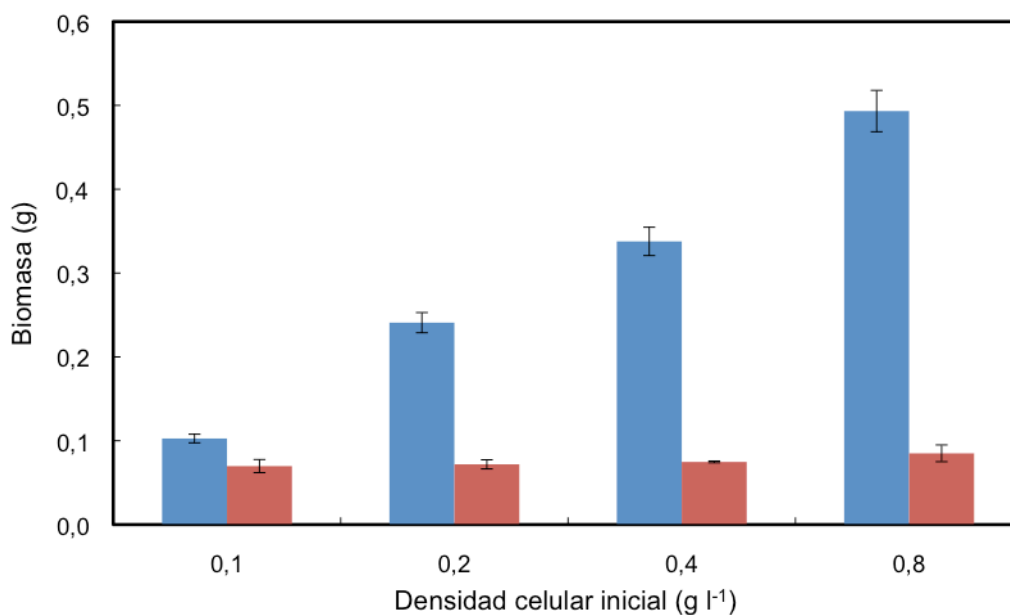


Figura 48. Efecto de la densidad celular inicial sobre la inmovilización de *Anabaena*. Biomasa total (azul) y biomasa inmovilizada (rojo). Condiciones experimentales: superficie de inmovilización 125 cm², volumen de cultivo 300 ml, tiempo de incubación 4 días, 160 μE m⁻² s⁻¹, 30 °C, 20 l aire l⁻¹ h⁻¹.

IV.6.1.3. Efecto de la superficie total de soporte sobre la inmovilización de *Anabaena*

Para este estudio los discos se añaden a una suspensión de *Anabaena* conteniendo $0,2 \text{ g l}^{-1}$ de biomasa, determinándose la biomasa retenida en el soporte tras 4 días de incubación. En estas condiciones, un 90-96% de la biomasa total queda retenida en el soporte. La mayor densidad de biomasa por unidad de superficie se obtiene para la menor superficie total de inmovilización ensayada (Figura 49), si bien el valor del total de biomasa inmovilizada es el más bajo. En el caso de la mayor superficie total de soporte ensayada (370 cm^2) se registra la mayor retención total de biomasa ($0,2 \text{ g}$), junto a la menor densidad de biomasa por unidad de superficie.

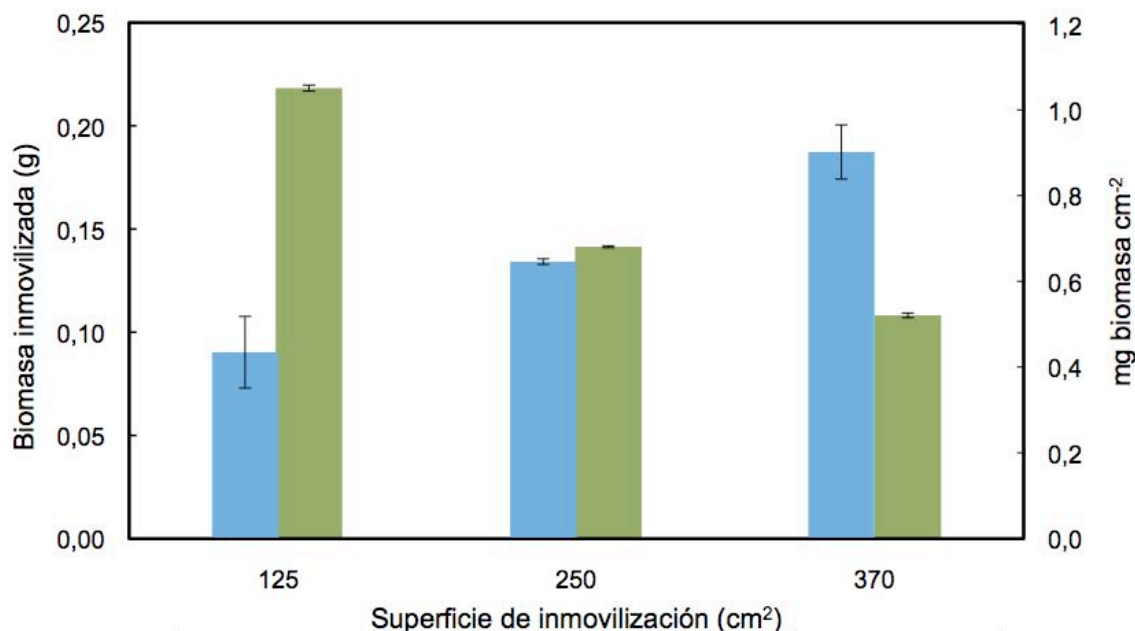


Figura 49. Efecto de la superficie total de soporte sobre la inmovilización de biomasa total (azul) y por unidad de superficie (verde). Condiciones experimentales: densidad celular inicial $0,2 \text{ g l}^{-1}$, volumen 300 ml , tiempo de ensayo 4 días, $160 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ l aire l}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

El tiempo de contacto entre la biomasa y el soporte, influencia también el grado de retención. Comparando las figuras 49 y 50 se observa que la capacidad de carga de los soportes expresada por unidad de superficie es un 20% superior cuando se duplica el tiempo de contacto entre *Anabaena* y el soporte con una superficie total de 125 y 250 cm^2 , llegando a alcanzar $1,1 \text{ mg biomasa cm}^{-2}$ en aquellos que contienen

125 cm² de poliuretano. En el caso de los sistemas con 370 cm² la cantidad de biomasa expresada por cm² no se afecta significativamente con la duplicación del tiempo de ensayo. A pesar del incremento de la carga del soporte este sólo retiene el 25-40% de la biomasa total presente en el cultivo.

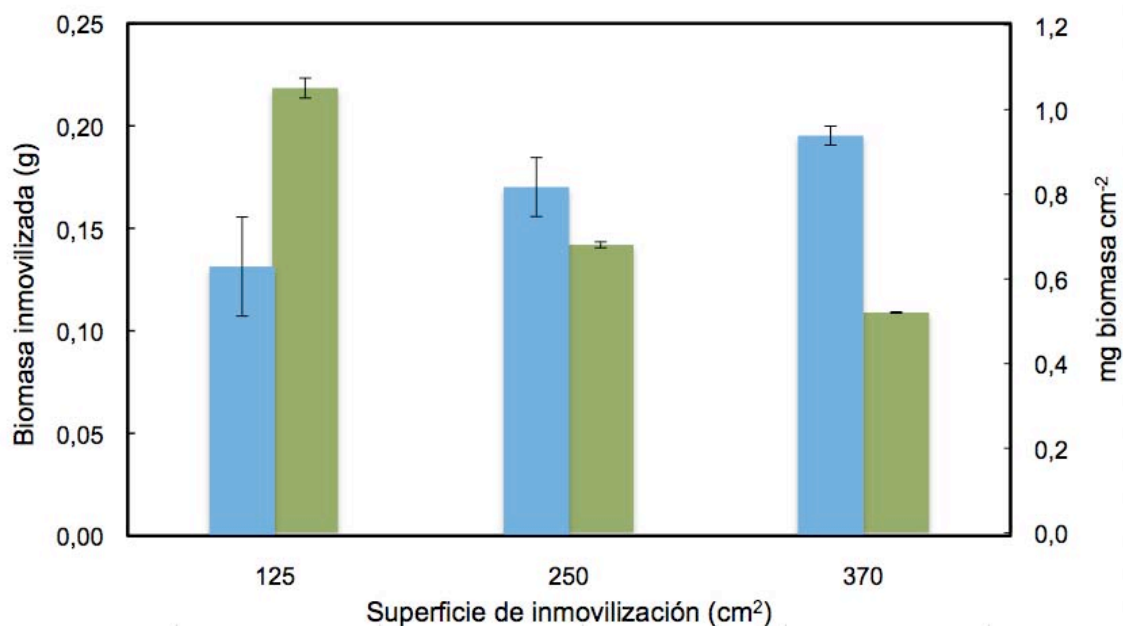


Figura 50. Efecto de la superficie total de soporte sobre la inmovilización de biomasa total (azul) y por unidad de superficie (verde). Condiciones experimentales: densidad celular inicial 0,2 g l⁻¹, volumen 300 ml, tiempo de ensayo 8 días, 160 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 30 °C, 20 l aire l⁻¹ h⁻¹.

Aunque la capacidad de retención de biomasa expresada por unidad de superficie es mayor en los sistemas con 125 cm² de superficie total que en los de 250 cm², se selecciona esta última por cuestiones metodológicas. De manera que en la preparación de un sistema inmovilizado de *Anabaena* en soporte de esponja de poliuretano para los ensayos de retención de cadmio la incubación se prolonga durante 8 días, empleándose discos de esponja de poliuretano con una superficie máxima de 250 cm² en una suspensión de biomasa en medio de cultivo, con una densidad inicial de 0,2 g l⁻¹, consiguiéndose así una densidad de carga de, al menos, 0,6 mg biomasa cm⁻².

IV.6.2. Remoción de Cd²⁺ por *Anabaena* inmovilizada en esponja de poliuretano

La cantidad de Cd²⁺ disponible en una disolución depende de la concurrencia de otras sales, agentes quelantes y del pH ya que en determinadas condiciones pueden provocar su precipitación, retirándolo de la disolución y limitando su disponibilidad para los sistemas biológicos (Fernandez-Piñas, 1991). El medio de cultivo de *Anabaena* contiene algunos compuestos como EDTA o PO₄³⁻ que pueden reducir la disponibilidad del Cd²⁺ añadido. Para estudiar esta posible interacción se ha ensayado el efecto de la adición de distintos volúmenes de medio a una disolución de Cl₂Cd en agua a una concentración final de 100 ppm. Los resultados (Figura 51) indican que la presencia de medio de cultivo repercute significativamente sobre la disponibilidad de cadmio, que se reduce hasta en un 90% en respuesta a la adición de un volumen de medio de 60 ml o superior. Con 5-10 ml de medio de cultivo añadido, el cadmio remanente es aproximadamente un 75%. Atendiendo a esta información se evita la presencia de medio de cultivo en los ensayos de interacción con cadmio y se realizan en soluciones acuosas de Cd²⁺.

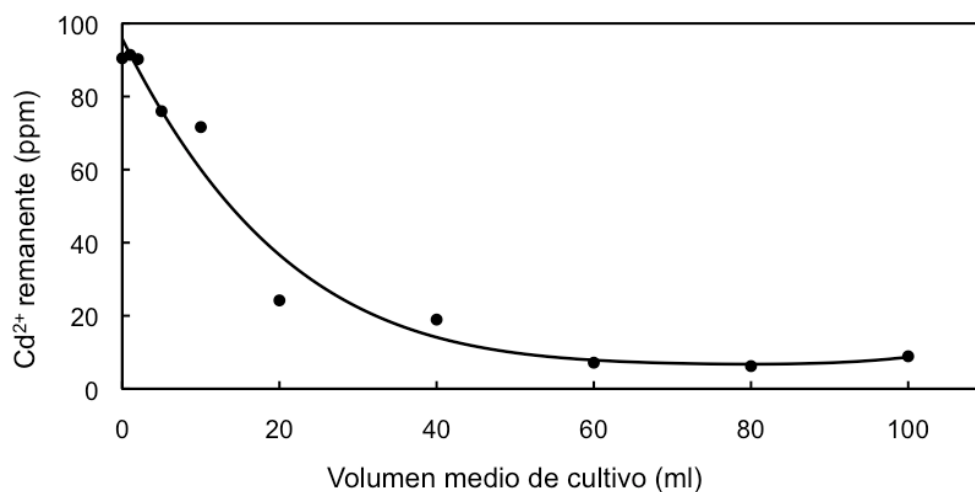


Figura 51. Efecto del volumen de medio sobre el porcentaje de cadmio remanente.

Volumen de ensayo (solución de cadmio y medio de cultivo) 200 ml, concentración inicial de cadmio 100 ppm, agitación 100 ppm, tiempo de ensayo 300 minutos, temperatura ambiente.

Con el objetivo de analizar el potencial de *Anabaena* inmovilizada en discos de esponja de poliuretano para retener el cadmio presente en soluciones acuosas es necesario descontar la posible adsorción inespecífica por parte del soporte. Para ello

se añaden discos sin biomasa embebidos en agua o medio de cultivo a una solución de cadmio de 100 ppm, analizándose la cinética de retirada del catión de la disolución y comparándose con el caso del sistema inmobilizado de *Anabaena* (Figura 52).

Se aprecia que el medio embebido en los discos de poliuretano retira una pequeña fracción del cadmio presente en la solución, no así los soportes embebidos en agua, inertes frente al cadmio. Sin embargo, el sistema inmobilizado de *Anabaena* es capaz de retirar prácticamente el total del Cd^{2+} presente en la disolución tras 50 minutos (Figura 52). Puesto que este efecto no se debe a procesos de adsorción inespecífica por parte del soporte, se puede concluir que la biomasa de *Anabaena* retenida en el sistema inmobilizado es capaz de retirar Cd^{2+} de una disolución.

Al analizar la evolución de la retirada del cadmio por la biomasa de *Anabaena* inmobilizada en esponja de poliuretano se aprecia una fase inicial rápida (Figura 52), con retirada de más de la mitad del cadmio de la solución en los primeros 20 minutos, seguida de otra considerablemente más lenta, hasta estabilizarse a los 50 minutos.

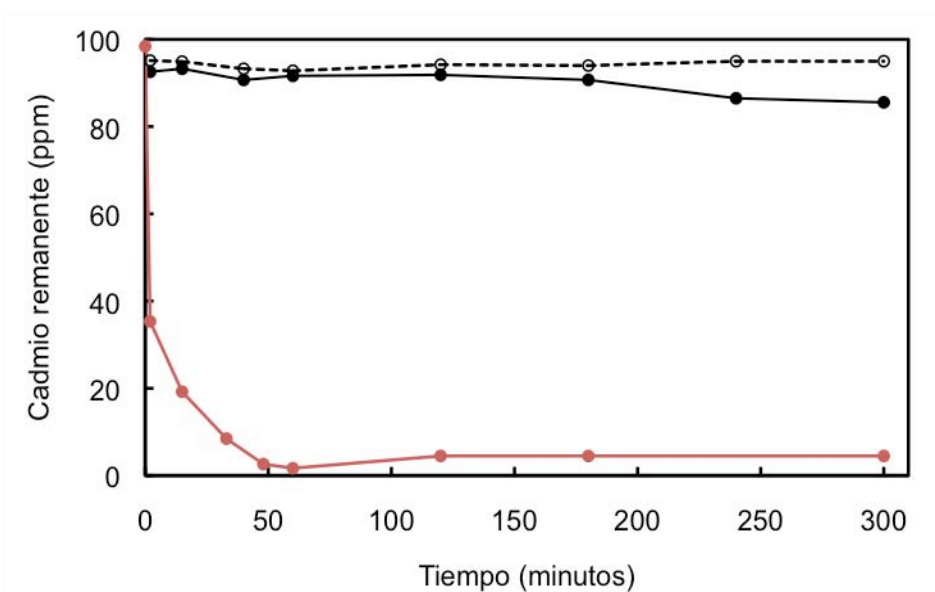


Figura 52. Cinética de retirada de Cd^{2+} de una disolución conteniendo 100 ppm. Soporte embebido en agua (blanco), en medio de cultivo (negro) y sistema inmobilizado conteniendo 0,44 g de biomasa (rojo). Condiciones experimentales: superficie de soporte 125 cm^2 , volumen de ensayo 200 ml, 100 rpm de agitación, temperatura ambiente.

Para determinar la relación entre la biomasa inmovilizada y su capacidad para retirar Cd^{2+} se exponen diferentes cantidades de biomasa inmovilizada en 125 cm^2 a una misma concentración inicial de cadmio (C_0), 100 ppm, analizándose el cadmio presente en la solución acuosa (ppm) en el equilibrio (C_e). Se considera la concentración de cadmio en el equilibrio como el valor de la concentración de cadmio remanente en el medio al final del proceso de retirada. Los resultados se muestran en la Figura 53. La retirada de cadmio está directamente relacionada con la concentración de biomasa, de manera que con $0,44 \text{ g biomasa l}^{-1}$ se llega a retirar el 90% del cadmio inicial al final del proceso.

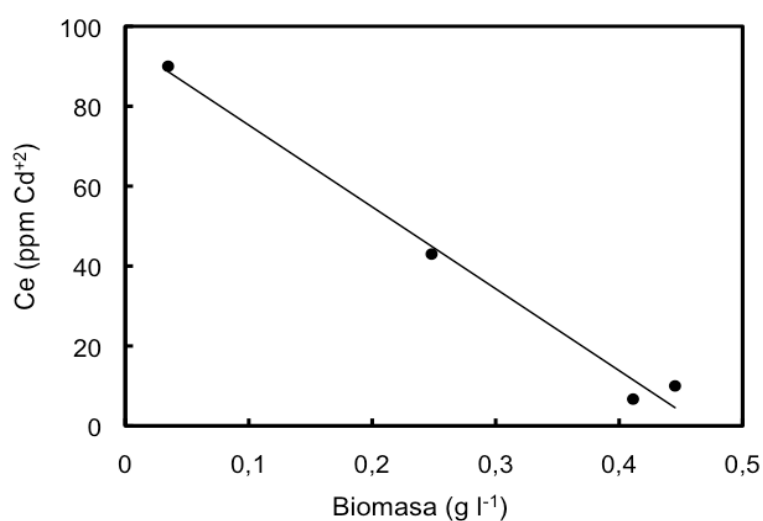


Figura 53. Retirada de cadmio en función de la concentración de biomasa inmovilizada.

Condiciones experimentales: superficie de soporte 125 cm^2 ; concentración inicial de cadmio, 100 ppm; volumen, 200 ml; tiempo final, 300 minutos; temperatura ambiente, velocidad de agitación, 100 rpm.

Para determinar el potencial del sistema inmovilizado de *Anabaena* para retirar Cd^{2+} se ha ensayado su efectividad frente a diversas concentraciones de cadmio (Figura 54). Se aprecia que la biomasa inmovilizada de *Anabaena* retiene aproximadamente 100 ppm de Cd^{2+} independientemente de la concentración inicial del mismo. Para concentraciones inferiores es capaz de retirar un 90% del cadmio presente en la disolución.

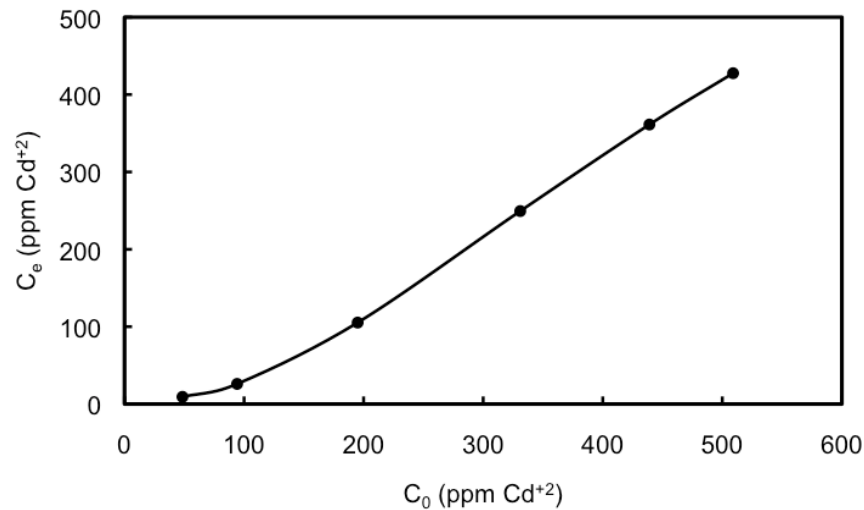


Figura 54. Retirada de cadmio por *Anabaena* inmovilizada en poliuretano. Efecto de la concentración inicial del metal sobre su concentración en condiciones de equilibrio.

Condiciones experimentales: concentración de biomasa de $0,5 \text{ g l}^{-1}$, superficie de soporte 125 cm^2 , volumen de ensayo 200 ml , tiempo final, 300 minutos , velocidad de agitación 100 rpm , temperatura ambiente.

Como se ha mostrado en la Figura 53, la concentración de cadmio en el equilibrio depende de la concentración de biomasa empleada (C_b ; g l^{-1}). El parámetro q_e , que se corresponde con la cantidad de cadmio adsorbido por gramo de adsorbente en el equilibrio ($\text{mg Cd}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ biomasa}$), se calcula según la Ecuación 21 (Akhtar y col., 2004).

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{C_b} \quad \text{[Ecuación 21]}$$

Cuando se representa el valor de q_e frente a la concentración de cadmio en el equilibrio (Figura 55), se observa que existe una relación hiperbólica entre ambos parámetros, que se corresponde con la expresión matemática de la ecuación de la isoterma de Langmuir (Ecuación 22). Una isoterma de adsorción está caracterizada por varias constantes, que reflejan las propiedades de la superficie y la afinidad por el sorbente, siendo $q_{\text{máx}}$ la capacidad máxima de retención de cadmio por unidad de biomasa ($\text{mg Cd}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ biomasa}$), y b (l mg^{-1}) la constante de Langmuir, relativa a la energía de adsorción/deadsorción.

$$q_e = \frac{q_{\text{máx}} b C_e}{1 + b C_e} \quad \text{[Ecuación 22]}$$

La isoterma o ecuación de Langmuir se ha empleado tradicionalmente para evaluar la capacidad máxima de retención de metales, y se basa en las siguientes consideraciones: los iones metálicos se unen químicamente a un determinado número de sitios de unión, cada sitio de unión sólo puede retener un único ión, todos los sitios de unión son químicamente equivalentes y no hay interacción entre los iones adsorbidos y los sitios adyacentes (Inthorn y col., 1996). De acuerdo con la isoterma de Langmuir (Figura 55), la capacidad máxima de retención de cadmio por el sistema inmovilizado de *Anabaena* supera los 150 mg Cd⁺² g⁻¹ biomasa.

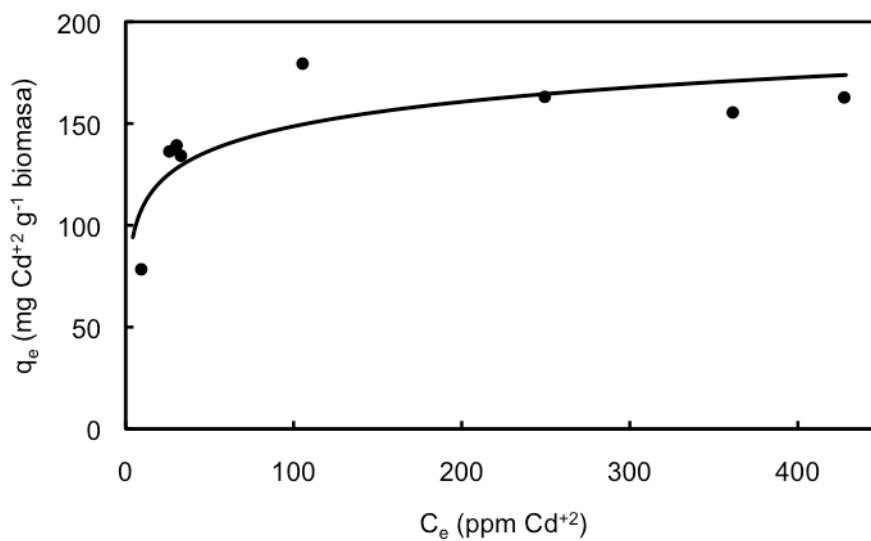


Figura 55. Isoterma de Langmuir para la unión de cadmio a la biomasa de *Anabaena* inmovilizada.

Para calcular el valor de la $q_{m\acute{a}x}$ con mayor precisión se representa C_e frente a C_e/q_e , lo que se corresponde con la expresión lineal de la cinética de unión de Langmuir y obedece a la Ecuación 23. Su representación a partir de los valores experimentales se corresponde con la gráfica de la Figura 56.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{q_{m\acute{a}x} b}$$

[Ecuación 23]

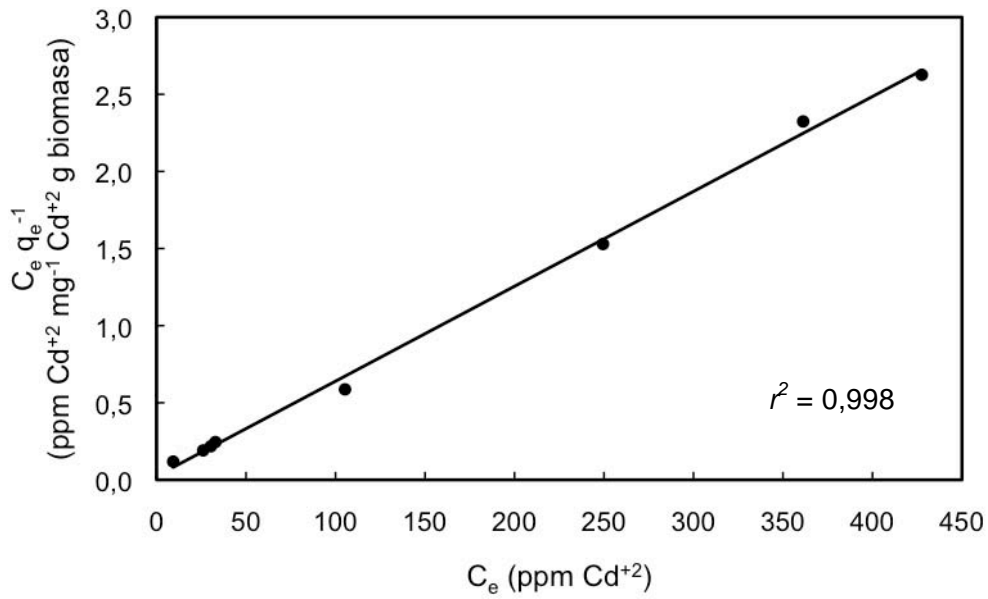


Figura 56. Representación gráfica de la isoterma de Langmuir lineal y ajuste.

Los valores obtenidos se ajustan a una cinética de unión monocapa, para la que pueden determinarse los valores de $q_{m\acute{a}x}$ y b , resultando $q_{m\acute{a}x} = 161,8 \text{ mg } Cd^{+2} \text{ g}^{-1}$ biomasa; y $b = 0,41 \text{ l } mg^{-1}$.

V. DISCUSIÓN

V.1. GENERACIÓN DE BIOMASA Y FIJACIÓN DE CO₂ POR *Anabaena*

En anteriores trabajos con *Anabaena* sp. ATCC 33047 (Moreno y col., 2003) se establecieron condiciones óptimas para el cultivo en régimen estanco de esta cianobacteria. Sin embargo, bajo dicho régimen de operación las condiciones varían a lo largo del cultivo, ya que se consumen nutrientes hasta su agotamiento, a la vez que la irradiancia promedio se reduce, acumulándose en el medio productos metabólicos. Por ello, de entre los efectos observados al modificar una variable, resulta difícil discriminar cuales se deben de hecho a la variable considerada y cuales se derivan de la propia evolución del cultivo.

V.1.1. Cultivos en fotoquimiostatos

El sistema de cultivo en régimen continuo implica el mantenimiento de estados de equilibrio, determinados por la velocidad de dilución impuesta. Cuando la velocidad específica de crecimiento (μ) iguala a la velocidad de dilución (D) se genera un estado estacionario al que corresponde un determinado valor de densidad celular, compensándose la generación de células por crecimiento con la dilución producida por el aporte de medio fresco (Pirt, 1975). Por esto, el régimen continuo permite analizar los efectos resultantes de la modificación de una variable individual, manteniéndose inalteradas las demás condiciones de cultivo. Además, este modo de operación se encuentra más próximo al que se emplea en cultivos a la intemperie, a gran escala. Por todo ello, se ha optado por la aproximación de la operación en continuo para establecer las condiciones de cultivo óptimas de *Anabaena* que permitan maximizar la productividad de materia orgánica y por tanto, la tasa de fijación de CO₂.

Aunque la mayoría de las consideraciones que se hacen en este apartado se focalizan sobre la productividad de biomasa, ha de tenerse en cuenta, sin embargo, que dicho parámetro y la tasa de fijación de CO₂ tienen un comportamiento paralelo en relación a las diferentes variables estudiadas.

La velocidad de dilución es un parámetro crítico, ya que determina el volumen cosechado y la concentración de biomasa en el mismo. Su valor óptimo en los fotoquimiostatos tipo columnas de burbujeo empleados, y para las condiciones prefijadas de otros parámetros determinantes, se ha establecido en 0,056 h⁻¹, al que

corresponde valores de productividad de biomasa de $0,24 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y de tasa de fijación de CO_2 de $0,5 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

La velocidad de dilución repercute directamente en la densidad celular del cultivo y por tanto influye en la irradiancia promedio que recibe cada una de las células. La evolución de la concentración de biomasa frente a la velocidad de dilución indica que los cultivos continuos de *Anabaena* están fotolimitados a $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Estos datos concuerdan con los resultados presentados por González López y col. (2009) en los que se aprecia la fotolimitación del cultivo a $900 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y con los de Moreno y col. (1995) para cultivos estancos. El incremento de la irradiancia incidente manteniendo la velocidad de dilución fija ($0,056 \text{ h}^{-1}$) conduce a un aumento lineal de la densidad celular en estado estacionario hasta $0,9 \text{ g l}^{-1}$ para $2800 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, sin que ni siquiera para este elevado valor de irradiancia incidente se alcance la saturación. El incremento lineal de la densidad celular con la irradiancia incidente se traduce en una constancia del valor de la I_{av} para los distintos valores de irradiancia incidente ensayados, de manera que la disponibilidad lumínica por célula se mantiene constante. La capacidad de *Anabaena* para crecer a elevada irradiancia es una ventaja fundamental para su empleo al exterior, ya que permite su crecimiento en un amplio espectro de irradiancia.

La tolerancia a la temperatura que mostraban los cultivos en estanco de *Anabaena* (Moreno y col., 1995) llevaron a proponer su idoneidad para la explotación a la intemperie, condiciones en las que el control de temperatura puede ser un importante factor de costo. Tal tolerancia también se manifiesta en cultivos en continuo, en los que se registra crecimiento desde 30 a $45 \text{ }^\circ\text{C}$, si bien se aprecia en estos últimos bajo nivel de pigmentos, como han descrito De Oliveira y col. (1999) para *Spirulina platensis* a esta misma temperatura. El valor óptimo de temperatura ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) difiere ligeramente del determinado en régimen estanco y semicontinuo que identifican $40 \text{ }^\circ\text{C}$ como la temperatura óptima para la productividad de biomasa (Moreno y col., 1998 y 2003). Un desplazamiento similar de la temperatura óptima de crecimiento en función del régimen de cultivo se ha descrito también para *Spirulina* (Ogbonda y col., 2007).

La tolerancia a un intervalo amplio de valores de pH es una condición relevante para aquellos organismos que se empleen en procesos de retirada del CO_2 contenido en gases de escape (Kumar y col., 2011), ya que la variación de la concentración de CO_2 en la corriente del gas que se utilice para cultivar microalgas introduciría

diferencias sustanciales en el pH del cultivo (Chiu y col., 2008). Además, la posibilidad del empleo de agua de mar carbonatada como base del medio de cultivo también está ligada con la tolerancia de *Anabaena* al pH (Acién y col., 2009). La transferencia del CO₂ de gases de combustión (fase gaseosa) al medio carbonatado (fase acuosa) se incrementa con el pH, alcanzando valores de 80 % de captación a pH 10 y próximos al 60 % a pH 9 (González López, 2010). En este sentido, la tolerancia del organismo al pH limitará el grado de carbonatación que puede alcanzar la fase acuosa. Se ha verificado en este trabajo que *Anabaena* es capaz de crecer bien en régimen continuo a valores de pH comprendidos entre 7,5 y 10, registrándose máximos de productividad de biomasa y tasa de fijación de CO₂ a pH 8,5-9, los cuales se reducen entre el 32 y el 40 % para los valores más extremos ensayados. Este amplio margen de tolerancia al pH es una característica generalizada entre las cianobacterias (Giráldez Ruiz y col., 1997), que favorece el empleo de *Anabaena* en una variedad de condiciones ambientales.

La agitación determina la velocidad de desplazamiento de las células en el interior del reactor desde la superficie, con mayor iluminación, hasta el interior, que puede estar en completa oscuridad por efecto del sombreado entre células (Molina Grima y col., 1999). La accesibilidad de las células a la luz depende del desplazamiento en el interior del reactor y se considera un factor crítico para la productividad (Hu y Richmond, 1996). Generalmente, un incremento de la agitación, que se traduce en una mayor frecuencia de exposición de células a la luz, da lugar a un aumento de la productividad, si bien este efecto se hace más patente en cultivos muy concentrados (Hu y col., 1996). Sin embargo, en las condiciones en que se han desarrollado nuestras experiencias no se ha observado efecto de la agitación de la suspensión celular sobre la productividad del cultivo continuo de *Anabaena*, en coincidencia con los datos de Moreno y col. (1998) para cultivo estanco. La aparente ausencia de efecto de la elevada turbulencia, el coste energético de la misma y su posible efecto negativo para la integridad de los filamentos de *Anabaena*, son criterios que se han considerado especialmente para seleccionar 40 l aire l⁻¹ h⁻¹ como condición óptima de turbulencia para los cultivos.

Tradicionalmente, los medios que se utilizan para el cultivo de microalgas y cianobacterias se han establecido de modo empírico, basándose fundamentalmente en las soluciones fertilizantes utilizadas para plantas. Sin embargo, la composición del medio es un factor crítico para la viabilidad y eficiencia de los cultivos, afectando el potencial de crecimiento de un organismo. Aunque la definición del medio óptimo para

el cultivo de la estirpe de *Anabaena* empleada ha conllevado un riguroso trabajo experimental (Moreno y col., 1987), se ha considerado de interés en este trabajo evaluar el efecto de la concentración de algunos componentes del medio (bicarbonato, fosfato y cloruro) sobre la productividad de *Anabaena*, con vistas a la posible utilización de aguas de distinta procedencia para el cultivo masivo de esta cianobacteria. Los resultados obtenidos han confirmado la esencialidad del fosfato como nutriente, la relativa falta de efecto del cloruro sódico sobre el crecimiento, así como la moderada tolerancia de *Anabaena* a la presencia de bicarbonato en el medio.

El comportamiento de los cultivos de *Anabaena* respecto de la concentración de fosfato indica que este compuesto es un nutriente esencial para esta cianobacteria (Goldman, 1979), como asimismo lo es para otros organismos. En ausencia de fosfato, los cultivos son inviables, debido a su papel fundamental en el metabolismo y energética celular. La productividad de biomasa en cultivos continuos de *Anabaena* incrementa al hacerlo la concentración de fosfato, hasta alcanzar la saturación, a partir de 1 mM, concentración en el medio estándar.

Una de las ventajas fundamentales del empleo de microalgas marinas en sistemas de biorremediación del CO₂ es la posibilidad de emplear agua de mar para su cultivo. La tolerancia a la sal de *Anabaena* permite su cultivo en este tipo de agua, análogamente al caso de *Spirulina maxima* y *Nannochloropsis* que se han cultivado con éxito para este propósito en agua del mar suplementada (Materassi y col., 1984; Rodolfi y col., 2009). Los estudios previos en cultivo estanco indicaban una alta tolerancia a NaCl, habiéndose registrado un comportamiento semejante en el caso de los cultivos en continuo. A pesar de que *Anabaena* sp. ATCC 33047 está descrita como una estirpe marina (Stacey y col., 1977), la tasa de fijación de CO₂ no se afecta por la ausencia de cloruro sódico en el medio, sin que se modifique el comportamiento de los cultivos por la presencia de este compuesto a concentraciones inferiores o iguales a 174 mM. Se confirma así la posibilidad de emplear agua de distinta procedencia, dulce o con un margen amplio de concentraciones de sal para el cultivo de esta cianobacteria.

El empleo de agua de mar carbonatada como base del medio de cultivo es una opción para mitigar la acumulación atmosférica de CO₂ mediante sistemas de microalgas. Se ha descrito una capacidad de absorción de 0,87 g carbono l⁻¹ empleando como fase acuosa una solución de bicarbonato (0,2 M) a pH 10 (González López, 2010). *Anabaena* no se afecta significativamente en lo referente a crecimiento

o tasa de fijación de CO₂ por la presencia de NaHCO₃ a concentración inferior o igual a 143 mM, siendo por el contrario inviable su cultivo a concentraciones iguales o superiores a 186 mM. Es decir, *Anabaena* puede crecer adecuadamente en presencia de hasta 1,7 g l⁻¹ de carbono inorgánico, pudiéndose emplear para su cultivo soluciones acuosas de bicarbonato suplementadas con CO₂ mediante inyección de gases de escape, que no superen la mencionada concentración de carbono.

En las condiciones de operación establecidas como óptimas en este trabajo para cultivos de *Anabaena* operados en régimen continuo, en condiciones controladas de laboratorio, se ha verificado una tasa máxima de fijación de CO₂ de 1 g de CO₂ l⁻¹ d⁻¹. Este valor es notablemente superior a los 0,26 y 0,41 g l⁻¹ d⁻¹ establecidos para *Scenedesmus obliquus* y *Spirulina* sp. (De Morais y Costa, 2007), respectivamente, encontrándose próximo al descrito para *Chlorella vulgaris* (0,96 g l⁻¹ d⁻¹; Cheng y col., 2006) y *Chlorella* sp. (1,15 g l⁻¹ d⁻¹; Chiu y col., 2008) si bien, en la mayoría de los casos, los datos se extrapolan a partir de cultivos en estanco.

Siendo la irradiancia un importante factor ambiental que influencia el crecimiento y la productividad de los cultivos de microalgas, el establecimiento de modelos de comportamiento frente a este parámetro puede ser una herramienta clave para el escalado de los sistemas de producción y la optimización de las condiciones de cultivo a la intemperie (Sánchez y col., 2008).

El modelo de crecimiento de *Anabaena* frente a la irradiancia se ha generado a partir de las experiencias desarrolladas a distintas velocidades de dilución para un valor de I_0 de 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La velocidad de crecimiento responde de forma hiperbólica a la irradiancia promedio. Ajustando los datos experimentales por regresión no lineal se obtienen los parámetros característicos: $\mu_{m\acute{a}x} = 0,164 \text{ h}^{-1}$, $I_k = 143 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos resultados indican que *Anabaena* es una cianobacteria con elevada tasa de crecimiento, si bien se requiere un elevado aporte lumínico para alcanzarla. Los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e I_k difieren notablemente de los descritos por González López y col. (2009) para la caracterización de *Anabaena*. Según estos autores, para velocidades de dilución de 0,08 h⁻¹ no es posible el crecimiento de *Anabaena* aunque, en nuestro caso, en las mismas condiciones el cultivo alcanza una productividad 10 % inferior a la óptima. Además, nuestros ensayos indican que *Anabaena* puede tolerar velocidades de dilución de al menos 0,124 h⁻¹. El valor que hemos determinado para I_k es similar al publicado para otras microalgas (Acién Fernández y col., 2001; Fernández Sevilla y col., 1998; Reboloso Fuentes y col., 1999; Sánchez y col., 2008). Por otra parte, el

valor del coeficiente de extinción de la biomasa de *Anabaena* es alto ($0,19 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) comparado con los descritos por Sánchez y col. (2008) y García Malea y col. (2006) para *Scenedesmus almeriensis* ($0,08 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) y *Haematococcus pluvialis* ($0,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) respectivamente, lo que indica que la atenuación de la irradiancia dentro del cultivo es fuerte.

Los modelos obtenidos permiten simular el comportamiento de cultivos continuos de *Anabaena* y con ello estimar las condiciones óptimas de operación que maximicen la tasa de fijación de CO_2 . Las simulaciones realizadas señalan que la velocidad de dilución tiene un efecto más significativo sobre la productividad de biomasa a medida que aumenta la irradiancia incidente, situándose la velocidad de dilución óptima entre $0,06$ y $0,1 \text{ h}^{-1}$, cualquiera que sea la irradiancia incidente (Figura 57). Como ya se ha indicado, el modelo se ha construido sobre los datos experimentales obtenidos a $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, condición para la que no se observa efecto alguno de fotoinhibición. Se ha verificado que los resultados de productividad registrados a $2800 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ también se ajustan al modelo y que, por tanto, no hay fotoinhibición para los valores de irradiancia estudiados. El modelo predice que la productividad de biomasa puede alcanzar los $0,4 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para una irradiancia incidente de $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una velocidad de dilución de $0,056 \text{ h}^{-1}$. El valor de productividad de biomasa determinado experimentalmente en estas condiciones es $0,42 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Según la simulación se pueden alcanzar valores de productividad de biomasa de hasta $1 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, en cultivos sometidos a una velocidad de dilución de $0,08 \text{ h}^{-1}$ y una irradiancia incidente de $3800 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Como ya se ha mencionado, la biomasa es el componente principal de la materia orgánica producida por *Anabaena* y por ello el perfil de la simulación del comportamiento de la tasa de fijación de CO_2 frente a irradiancia y velocidad de dilución es muy similar al de la productividad de biomasa. La velocidad de dilución óptima se encuentra entre $0,06$ y $0,1 \text{ h}^{-1}$, pudiendo alcanzar la tasa de fijación de CO_2 valores de hasta $1,5 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. De la misma forma, los valores obtenidos experimentalmente para la tasa de fijación de CO_2 , para las distintas irradiancias ensayadas, se ajustan a la simulación (Figura 58).

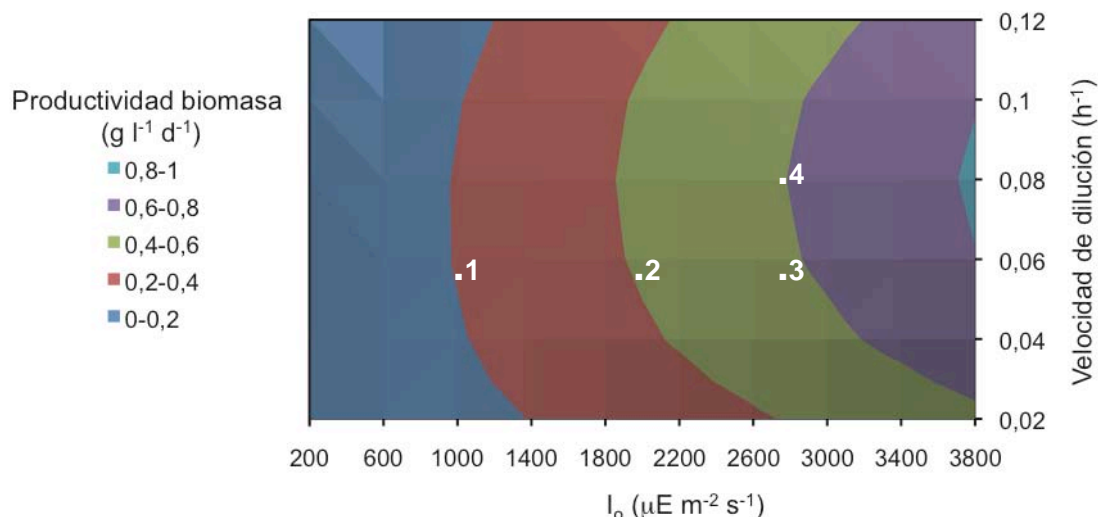


Figura 57. Simulación del efecto de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre la productividad de biomasa en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo y datos experimentales. Valores de la simulación obtenidos a partir de la Ecuación 9. Los números corresponden a datos experimentales. 1: 0,24 g l⁻¹ d⁻¹ (1000 μE m⁻² s⁻¹, 0,056 h⁻¹); 2: 0,42 g l⁻¹ d⁻¹ (2000 μE m⁻² s⁻¹, 0,056 h⁻¹); 3: 0,56 g l⁻¹ d⁻¹ (2800 μE m⁻² s⁻¹, 0,056 h⁻¹); 4: 0,56 g l⁻¹ d⁻¹ (2800 μE m⁻² s⁻¹, 0,079 h⁻¹).

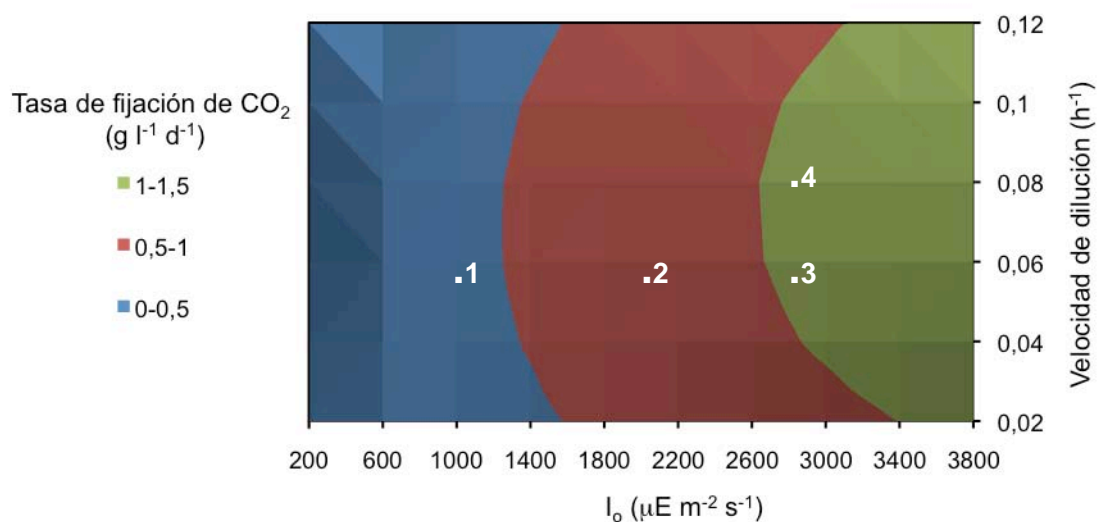


Figura 58. Simulación del efecto de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre la tasa de fijación de CO₂ en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo y datos experimentales. Valores de la simulación obtenidos a partir de la Ecuación 9. Los números corresponden a datos experimentales. 1: 0,45 g l⁻¹ d⁻¹ (1000 μE m⁻² s⁻¹, 0,056 h⁻¹); 2: 0,88 g l⁻¹ d⁻¹ (2000 μE m⁻² s⁻¹, 0,056 h⁻¹); 3: 0,99 g l⁻¹ d⁻¹ (2800 μE m⁻² s⁻¹, 0,056 h⁻¹); 4: 1,02 g l⁻¹ d⁻¹ (2800 μE m⁻² s⁻¹, 0,079 h⁻¹).

V.1.2.Cultivos a la intemperie

El sistema de cultivo o fotobiorreactor en el que se va a desarrollar el microorganismo fotosintético es un aspecto clave en el proceso de eliminación de CO₂. Desde 1950 se han desarrollado y utilizado diversos tipos de fotobiorreactores para el cultivo de microorganismos fotosintéticos, desde estanques abiertos a sistemas cerrados tanto tubulares como planos, así como diseños especiales y mixtos entre estos tipos de reactores. Si el objetivo básico del cultivo es la retirada de gases de combustión, el coste del reactor debe ser bajo, si bien para obtener un alto rendimiento en biomasa son necesarios reactores altamente productivos, en general de elevado costo de fabricación y operación. Una posibilidad intermedia es la representada por los reactores planos fabricados en materiales plásticos flexibles y desechables, de bajo coste (Rodolfi, 2009). En la presente investigación se ha analizado el potencial de distintos sistemas de cultivo (estanques abiertos, reactor tubular cerrado y plano vertical) para la eliminación de CO₂ acoplada a la generación de biomasa por cultivos de *Anabaena*.

Estanque abierto

Los dos principales factores que condicionan el cultivo a la intemperie son irradiancia y temperatura. En una zona de elevada irradiancia, como la elegida para este estudio, la disponibilidad de luz es suficiente para mantener los cultivos en crecimiento en cualquier época del año, siendo la temperatura el principal condicionante de la productividad. Los sistemas abiertos, carentes de control de temperatura, sólo son viables para el cultivo de *Anabaena* aproximadamente 8 meses al año, cuando la temperatura mínima lo permite ya que por debajo de 20 °C se compromete el crecimiento de esta cianobacteria. Resultados similares se han descrito para *Dunaliella salina* (García González y col., 2003) y *Muriellopsis* sp. (Blanco y col., 2007), en el mismo emplazamiento.

Para maximizar la eficiencia del empleo de la luz por cultivos de microalgas han de ajustarse convenientemente tanto la densidad celular mínima como la frecuencia de dilución (Goldman, 1979). En nuestros trabajos al exterior se ha operado con valores de densidad celular mínima iguales o superiores a 0,2 g l⁻¹ (Tabla 13 y 14), tratando de evitar fenómenos de fotoinhibición, que pueden ocurrir incluso a valores bajos de

irradiancia incidente cuando la temperatura del cultivo es inferior a la óptima (Vonshak y Novoplansky, 2008).

La productividad máxima de los cultivos de *Anabaena* en estanque abierto sin control de temperatura se registra en verano ($5,4 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), siendo la productividad media en el periodo de estudio (marzo-octubre) de $3,4 \text{ g biomasa m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (tasa de fijación de CO_2 $6,1 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Estos valores son inferiores a los descritos por Moreno y col. (2003) en esta misma localización y para esta cianobacteria pero con control de la temperatura mínima. La productividad es, asimismo, superior a los $1,65 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de *Dunaliella salina* (García González y col., 2003) e inferior a los $13 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ descritos para cultivos de *Muriellopsis* sp. (Blanco y col., 2007) en estanque abierto y en la misma localización. Esta productividad es inferior a las descritas para cultivos de *Spirulina* por Lu y col. (2010) en estanques con temperatura controlada en Mongolia (entre $5,3$ y $9,1 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y Richmond y col., (1990) sin control de temperatura en Israel (entre 2 y $18 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Estos resultados destacan la importancia de la localización de la explotación y del control de temperatura para obtener un mayor rendimiento de los cultivos al exterior, posibilitando su operación a lo largo de todo el año.

Reactor tubular

Una de las principales ventajas de los sistemas cerrados frente a los de tipo abierto es posibilitar un mejor control de las variables de cultivo, incluyendo la temperatura, lo que permite su operación durante todo el año, independientemente de las condiciones climáticas.

Según han discutido Hu y Richmond (1996), la luz es el principal factor limitante en la producción de microalgas al exterior, siempre y cuando no haya limitación de nutrientes y la temperatura se encuentre dentro de un intervalo óptimo. El empleo eficiente de la irradiancia por un cultivo de microorganismos fotosintéticos depende en gran medida del paso de luz del reactor, aunque otros factores como la agitación, la densidad celular y las propiedades ópticas de las células deben ser considerados. El paso de luz del reactor tubular empleado en estas experiencias es de 3 cm , idóneo para asegurar un cultivo concentrado y una elevada productividad por unidad de volumen, aunque la productividad por unidad de superficie se vea comprometida (Acién Fernández y col., 2001).

Para establecer el protocolo más adecuado de operación en semicontinuo para este reactor se han evaluado dos métodos de dilución: renovación de un volumen fijo de cultivo (55 %) cada 2-3 días (Tabla 16) o renovación del volumen necesario para mantener una determinada densidad celular (Tabla 18). Se ha seleccionado este último procedimiento como idóneo ya que mantiene la viabilidad del cultivo más tiempo y permite obtener mayores rendimientos independientemente de la irradiancia incidente. Las diluciones diarias a una densidad celular mínima resultan en un empleo más eficiente de la irradiancia generando productividades mayores a las de los cultivos diluïdos cada 2-3 días (Tabla 17).

La densidad celular determina el uso eficiente de la irradiancia (Hu y Richmond, 1996). Por tanto, para la correcta operación de un cultivo en régimen semicontinuo, es esencial establecer la densidad celular mínima, a mantener mediante la renovación de parte del cultivo con medio fresco, evitando procesos de fotoinhibición o de limitación por sombreado celular. La densidad celular mínima debe ser mayor en los periodos estivales, cuando la irradiancia incidente supera los 20 MJ m⁻² (Tabla 18). Para esta irradiancia, la densidad celular mínima óptima es 1 g l⁻¹, rindiendo productividades de 0,55 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ (2,5 g m⁻² d⁻¹), equivalente a la fijación de 0,96 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹ (4,4 g m⁻² d⁻¹). Estas productividades son similares a las descritas por García Malea y col. (2006) para *Haematococcus pluvialis* operada en estanco (0,55 g biomasa l⁻¹ d⁻¹), por Chini Zittelli y col. (1999) para cultivos semicontinuos de *Nanochloropsis* sp. (0,6 g biomasa l⁻¹ d⁻¹) y por García González y col., (2005a) para cultivos semicontinuos de *Dunaliella salina* (2,2 g biomasa m⁻² d⁻¹), aunque inferiores a los 1,9 y 1,6 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ obtenidos en cultivos continuos de *Phaeodactylum tricornutum* (Molina Grima y col., 2001) y *Muriellopsis* sp. (Del Campo y col., 2001) respectivamente.

Reactor plano vertical

Al igual que en los cultivos en reactor tubular, la existencia de control de temperatura en el reactor plano vertical hace de la irradiancia el principal factor ambiental condicionante de la productividad del cultivo. Como ya se ha discutido, la irradiancia que finalmente reciben las células puede modularse al modificar la densidad celular. Si la operación en régimen semicontinuo se efectúa renovando periódicamente un volumen fijo del cultivo, la productividad de éste aumenta al disminuirse el intervalo temporal entre diluciones consecutivas, siendo la dilución diaria la frecuencia más adecuada para el cultivo de *Anabaena* también en este diseño de

reactor (Tablas 19 y 20). Las diluciones diarias también resultan en un incremento de la productividad cuando se diluyen los cultivos a una densidad celular fija (Tablas 21 y 22). Estos resultados son similares a los descritos por otros autores (Pedrosa Bezerra y col., 2011).

Cuando la irradiancia disponible es baja el mayor rendimiento de los cultivos semicontinuos de *Anabaena* se alcanza a una densidad celular mínima inferior a 0,4 g l⁻¹. Para este valor de densidad celular mínima la productividad de biomasa se satura a 18 MJ m⁻² d⁻¹ (Tabla 22). Es posible, que para valores superiores de irradiancia un aumento de la densidad celular resulte en una mejora de la productividad, aunque esta situación no ha sido verificada.

Un aspecto favorable de este diseño de reactor es la posibilidad de control de temperatura, que permite el cultivo de *Anabaena* a la intemperie durante todo el año. Además es un sistema muy estable donde se ha mantenido un mismo cultivo durante más de 3 meses de experimentación sin reducción de viabilidad. La productividad media determinada para cultivos de *Anabaena* en reactor plano vertical es de 15 g biomasa m⁻² d⁻¹, siendo la tasa media de fijación de CO₂ 24 g m⁻² d⁻¹. Estos valores son similares a los de *Nanochloropsis* sp. en reactores de 10 cm (Cheng-Wu y col., 2001), aunque inferiores a los descritos por Zhang y col. (2001) para *Synechocystis aquatilis* SI-2 de 30 g biomasa m⁻² d⁻¹ y 50 g CO₂ m⁻² d⁻¹, utilizando un reactor con un paso de luz de 1,5 cm.

Comparación de los sistemas de cultivo al exterior

La elección de un sistema de cultivo para una aplicación concreta debe tomar en consideración, entre otros factores, los derivados del propio diseño del reactor. Algunas ventajas e inconvenientes de los reactores empleados en este trabajo se recogen en la Tabla 26.

En la Tabla 27 se presenta la productividad de biomasa publicada para distintos organismos y sistemas de cultivo. El análisis comparativo de estos datos debe ser convenientemente relativizado, ya que el diseño del reactor, el modo de operación y el emplazamiento geográfico afectan de forma importante a la productividad (Slegers y col., 2011). Además diferencias en el paso de luz para un mismo sistema pueden modificar sustancialmente la productividad (Richmond y

Cheng-Wu, 2001). Sin embargo, esta información es relevante ya que es indicativa de los valores de productividad que pueden obtenerse en los diversos sistemas de cultivos a la intemperie.

Tabla 26. Comparación entre sistemas de cultivo utilizados.

Característica	Estanque	Reactor tubular	Reactor Plano
Eficiencia de uso de la luz	Aceptable	Excelente	Excelente
Control de temperatura	No	Sí	Sí
Transferencia de gas	Pobre	Alta	Alta
Estrés hidrodinámico	Bajo	Alto/bajo*	Alto/bajo*
Control de la especie	Difícil	Sencillo	Sencillo
Esterilidad	Ninguna	Alta	Posible
Aumento de escala	Fácil	Difícil	Fácil

Adaptado de Borowitzka (1999) y Wang y col. (2008). *Depende del sistema empleado para el movimiento del cultivo.

Tabla 27. Productividad de distintos organismos en diversos sistemas de cultivo.

Sistema de cultivo	P. Biomasa (g l ⁻¹ d ⁻¹)	Organismo	Referencia
Estanque	0,18	<i>C. vulgaris</i>	Gouveia y Oliveira, 2009
Estanque	0,21	<i>S. maxima</i>	Gouveia y Oliveira, 2009
Reactor abierto capa fina	3,20	<i>Chlorella</i>	Doucha y col., 2005
Reactor abierto capa fina	3,40	<i>Chlorella</i>	Doucha y Lívansky, 2006
Helicoidal	0,40	<i>Spirulina</i>	Travieso y col., 2001
Airlift tubular	1,20	<i>P. tricornutum</i>	Acién Fernández y col., 2001
Airlift tubular	1,90	<i>P. tricornutum</i>	Molina Grima y col., 2001
Airlift tubular	2,47	<i>P. tricornutum</i>	Sobczuk y col., 2000
Reactor tubular	0,14	<i>S. obliquus</i>	Hulatt y Thomas, 2011
Reactor tubular	1,26	<i>S. platensis</i> M2	Tredici y Zittelli, 1998
Tubular inclinado	1,47	<i>C. sorokiniana</i>	Ugwu y col., 2002
Reactor plano	0,24	<i>Nanochloropsis</i> sp.	Richmond y Cheng-Wu, 2001
Reactor plano	0,21	<i>Nanochloropsis</i> sp.	Cheng-Wu y col., 2001
Reactor plano	0,36	<i>Nanochloropsis</i>	Rodolfi y col., 2009
Reactor plano	0,48	<i>Nanochloropsis</i> sp.	Zou y Richmond, 1999
Reactor plano	0,64	<i>Synechocystis aquatilis</i>	Zhang y col., 2001
Reactor plano	1,09	<i>S. platensis</i> M2	Tredici y Zittelli, 1998

Los valores de productividad se pueden expresar por unidad de volumen de cultivo, por superficie fotosintéticamente activa o por superficie total ocupada por el sistema (Tredici y Zittelli, 1998). Las dos primeras se emplean para estudiar la eficiencia de los sistemas de cultivo en cuanto a la conversión de energía lumínica en la contenida por la biomasa algal, mientras que la tercera se emplea cuando se quiere hacer referencia a la superficie de terreno ocupada por la instalación, generalmente bajo el punto de vista de explotación industrial (Richmond, 2004).

Cuando se comparan en la Tabla 28 los valores de productividad de biomasa de cultivos de *Anabaena* en distintos tipos de reactor para un mismo periodo (estival: irradiancia incidente, $21,2 \pm 1,5 \text{ MJ m}^{-2}$) se observa que el reactor tubular es el de mayor productividad volumétrica (3 y 9 veces superior a la obtenida en RPV y estanque, respectivamente). Si la productividad se refiere al área total ocupada por cada reactor, la del RPV es 9 y 4 veces superior a la de RT y estanque, respectivamente. La eficiencia fotosintética más alta corresponde a los cultivos en RPV (más del 2% de la irradiancia total incidente). Hay que considerar que el RT empleado en este trabajo tiene una relación volumen/superficie ocupada muy baja ($4,6 \text{ l m}^{-2}$), que explica la baja productividad por unidad de área.

Tabla 28. Productividad de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanque, reactor tubular y RPV.

Sistema de cultivo	Productividad biomasa		R (g MJ^{-1})	Eficiencia fotosintética (%)
	$\text{g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$	$\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$		
Estanque	$0,05 \pm 0,01$	$5,3 \pm 1,2$	0,26	0,58
Reactor tubular	$0,55 \pm 0,08$	$2,5 \pm 0,4$	0,12	0,22
Reactor plano	$0,17 \pm 0,02$	$20,5 \pm 2,5$	0,97	2,17

Estanque: intervalo de dilución 2-3 días, densidad celular mínima, $0,2 \text{ g l}^{-1}$. RT: dilución diaria, densidad celular mínima, 1 g l^{-1} . RPV: dilución diaria, densidad celular mínima, $0,45 \text{ g l}^{-1}$. Irradiancia incidente: $21,2 \pm 1,5 \text{ MJ m}^{-2}$.

El valor máximo de productividad de biomasa alcanzado para el RPV es $20 \text{ g biomasa m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, con una media anual de $15,3 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y el calor de combustión de esta biomasa es 23 kJ g^{-1} . A partir de estos datos se estima que la energía media acumulada por la biomasa a lo largo del año es $352 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

El comportamiento de los distintos diseños de reactor es similar cuando la variable estudiada es la tasa de fijación de CO₂ (Tabla 29). Nuestros resultados indican que los cultivos en RPV, pueden llegar a incorporar 30 g CO₂ m⁻² d⁻¹, con un rendimiento medio anual de 24 g m⁻² d⁻¹.

Tabla 29. Tasa de fijación de CO₂ de cultivos semicontinuos de *Anabaena* en estanque, reactor tubular y RPV.

Sistema de cultivo	Tasa de fijación de CO ₂	
	g l ⁻¹ d ⁻¹	g m ⁻² d ⁻¹
Estanque	0,10 ± 0,02	10,4 ± 1,2
Reactor tubular	0,96 ± 0,10	4,4 ± 0,5
Reactor plano	0,25 ± 0,05	29,7 ± 5,8

Condiciones experimentales como en la Tabla 28.

El rendimiento de cada uno de los reactores podría mejorarse introduciendo modificaciones en su geometría o, en el caso de los estanques, aportando elementos de control térmico. Siendo el reactor tubular el que mayor productividad volumétrica presenta, se puede mejorar el rendimiento por unidad de superficie si se disponen los lazos en dos capas, o se colocan los tubos en posición vertical reduciéndose así la superficie ocupada por el reactor y aumentándose la eficiencia fotosintética de los cultivos (Acién Fernández y col., 2001). El rendimiento del RPV podría mejorarse modificando el paso de luz, la inclinación, o el sistema de agitación, de manera que se dificulte el eventual depósito de células en las paredes internas del reactor (Richmond y Cheng-Wu, 2001).

De acuerdo con los resultados que aquí se presentan, el reactor más adecuado para el cultivo de *Anabaena* a la intemperie es el RPV, especialmente bajo el punto de vista de su productividad por unidad de área, parámetro esencial en relación al diseño de una planta de producción.

Además de propiciar elevada productividad volumétrica y capacidad de fijación de CO₂, el RPV presenta ventajas adicionales, como un bajo consumo energético en la termostatación del cultivo, por la eficiente transferencia de calor, gran capacidad de mezclado, moderado coste de construcción y simplicidad de manejo, así como susceptibilidad de escalado. Tomando estas consideraciones en su conjunto, el RPV

puede suponer una opción de interés como sistema de cultivo para su aplicación a la retirada del CO₂ presente en gases de chimenea acoplada a la producción de materia orgánica.

V.1.3. Autofloculación de la biomasa de *Anabaena*

Anabaena es capaz de sedimentar prácticamente la totalidad de su biomasa tras un reposo de 30 minutos. Para microalgas que no autofloculan o lo hacen muy lentamente, se ha descrito el uso de sales u otros agentes floculantes para reducir los tiempos de sedimentación (Chen y col., 2011; Uduman y col., 2010). Si bien, el empleo de floculantes condiciona el uso posterior que puede hacerse de la biomasa. En el caso particular de *Anabaena*, la utilización de sales de aluminio no mejora su capacidad de flocular (González López y col., 2009). Esta capacidad de autofloculación es una ventaja asociada al empleo de *Anabaena* con distintos propósitos ya que propicia su recolección por sedimentación gravitacional, como alternativa a procedimientos de mayor consumo energético y costo (Nurdogan y Oswald, 1996), facilitando así mismo la reutilización del medio de cultivo (Pushparaj y col., 1993).

V.2. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO POR *Anabaena*

La producción de EPS por cianobacterias se encuentra influenciada por diversos factores, tanto ambientales como nutricionales. En este sentido se han desarrollado numerosos intentos para esclarecer cómo la deficiencia de algún nutriente esencial, como la fuente de nitrógeno o el fosfato, puede desencadenar la acumulación de EPS (Nicolaus y col., 1999; Otero y Vincenzini, 2003). Muchas cianobacterias fijadoras de nitrógeno modifican su capacidad de producir EPS en respuesta a la naturaleza de la fuente de nitrógeno, como es el caso de *Anabaena* (Moreno y col. 2000). De hecho, el desarrollo de heterocistos en condiciones diazotróficas de cultivo de *Anabaena* sp. PCC 7120 está vinculado a la activación de NtcA que es un promotor de diversos genes, algunos de los cuales están implicados en la producción de EPS (Flores y Herrero, 2010). Es de interés conocer las condiciones de cultivo que promueven o estimulan la síntesis de EPS por parte de *Anabaena*, puesto que su presencia puede representar un valor añadido para la biomasa obtenida, así como un aumento en la tasa de fijación de CO₂ como resultado

de su síntesis. En general, las condiciones de cultivo aquí establecidas como óptimas son las que potencian la acumulación de biomasa, no correspondiéndose con aquellas que posibilitan la máxima acumulación de EPS. Esto podría explicar que la productividad de EPS obtenida sea, en general, inferior a la descrita para este mismo organismo por González López y col. (2009). Las diferencias de productividad registradas respecto de los valores aportados por Moreno y col. (1998 y 2003) puede explicarse también por la divergencia entre los métodos empleados para la determinación del EPS (D'Abzac y col., 2010).

En cultivo continuo en fotoquimiostato, en condiciones altamente controladas, la mayor concentración de EPS se obtiene a baja velocidad de dilución. A medida que ésta se incrementa, aumenta el valor de la relación biomasa/EPS, indicando la prevalencia de la producción de biomasa frente a la de EPS a alta velocidad de dilución. En nuestras condiciones, la velocidad de dilución determinada como óptima es de $0,056 \text{ h}^{-1}$, tanto para la productividad de biomasa como de EPS, asegurándose la máxima producción de materia orgánica para esta velocidad de dilución. Sin embargo, en la aproximación de González López y col. (2009), la velocidad de dilución óptima para la producción de biomasa se encuentra desplazada del correspondiente óptimo para la generación de EPS.

La mayoría de los estudios sobre producción de EPS por cianobacterias se han efectuado a la temperatura óptima de crecimiento del organismo, disponiéndose de poca información sobre el efecto de este parámetro en la acumulación de EPS. En *Nostoc* sp. PCC 7936 la producción no se afecta con la temperatura (Otero y Vincenzini, 2004), en *Spirulina* sp. se reduce cuando se superan los $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Nicolaus y col., 1999), mientras que en *Nostoc flagelliforme* la producción de EPS es mayor a temperatura es distinta de la óptima para su crecimiento (Yu y col., 2010). En el caso de *Anabaena* se aprecia un incremento de la producción de EPS con la temperatura a $40\text{-}45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, si bien no se observan diferencias entre los cultivos a 30 y $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, coincidiendo con las observaciones realizadas en cultivo estanco por Moreno y col. (1998). Un incremento de la acumulación de EPS también se ha observado en verano, en cultivos a la intemperie sin control de temperatura (datos no mostrados).

El incremento de la producción de EPS por efecto de la agitación descrito para varias cianobacterias (Nicolaus y col., 1999; Su y col., 2007) se ha relacionado con la liberación de la envuelta polisacáridica de la membrana celular, lo que estimularía la síntesis de EPS, así como con la penetración de la luz en cultivos densos facilitada por

la mayor turbulencia del mismo (Pereira y col., 2009). La ausencia de efecto de la agitación sobre la producción de EPS por *Anabaena* a las velocidades de agitación ensayadas (20-80 l l⁻¹ h⁻¹) se corresponde con los datos de cultivo estanco descritos por Moreno y col. (1998), en los que se registraba constancia en la producción de EPS hasta 150 l aire l⁻¹ h⁻¹ e incremento de la misma a partir de 250 l l⁻¹ h⁻¹. Puede que turbulencias más enérgicas que las aquí ensayadas faciliten la liberación de la envuelta polisacáridica de *Anabaena*, pero con ello podría asimismo comprometerse la integridad de los filamentos y la consecuente viabilidad de los cultivos.

En algunas cianobacterias, la deficiencia en fosfato estimula la producción de EPS (De Philippis y col., 1993; Huang y col., 2007; Nicolaus y col., 1999; Roux, 1996;), si bien hay casos como los de *Cyanospira capsulata* y *Nostoc flagelliforme* en que la ausencia de fosfato no tiene efecto significativo (De Philippis y col., 1991; Yu y col., 2010) y otros que generan menos EPS, como son los de *Anabaena* sp. y *Phormidium* sp. (Nicolaus y col., 1999). En condiciones de cultivo estanco, la ausencia de fosfato en el medio de cultivo provoca una acumulación de EPS hasta 10 veces superior (2,4 g l⁻¹) a la correspondiente al medio estándar. Sin embargo, en cultivos mantenidos en régimen semicontinuo o continuo, la no adición de fosfato al medio no estimula la producción de EPS, lo que parece indicar que en estas condiciones las células emplean prioritariamente el carbono fijado en su crecimiento, en lugar de la síntesis de EPS. Por otra parte, generalmente el exceso de fosfato no repercute significativamente sobre la acumulación de EPS (Pereira y col., 2009) como ocurre con *Anabaena*.

La concentración de cloruro sódico en el medio de aporte, a valores comprendidos entre 0 y 174 mM, no presenta efecto significativo sobre la producción de EPS por *Anabaena* en cultivo continuo. Moreno y col. (1998), trabajando en régimen estanco, observaron que la ausencia de NaCl favorecía la producción de EPS, cuya tasa, por otra parte, se mantenía constante entre 85 y 170 mM. Este comportamiento es similar al descrito para *Cyanospira capsulata*, y *Cyanothece* sp.113 que no modifican la síntesis de EPS a concentraciones de entre 90-350 mM y 0-2 M NaCl respectivamente (De Philippis y col., 1991; 1993). Por el contrario, para algunas cianobacterias se ha comunicado un incremento de la producción de EPS bajo estrés salino, a 0,5 M NaCl (Chen y col., 2003).

La producción de EPS por *Anabaena* en cultivo continuo aumenta al hacerlo la irradiancia de 100 a 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para disminuir a valores superiores de irradiancia. Este comportamiento es similar al observado para cultivos en estanco, en los que se

producía una saturación de la acumulación de EPS a partir de $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Moreno y col., 1999). Se ha descrito para *Nostoc insulare* que la producción de EPS se potencia irradiancia superior a $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fischer y col., 1997). La longitud de onda de la radiación también influye en la producción de EPS; así, en *Nostoc commune* la radiación UV potencia la producción de glicanos extracelulares (Ehling-Schulz y col., 1997).

El modelo de acumulación de EPS propuesto para los datos experimentales difiere del presentado por González López y col. (2009) en el que se asumía que la acumulación de EPS es dependiente del metabolismo primario. En este trabajo se indica que la tasa específica de acumulación de EPS tiene además un componente secundario, estando ambos componentes influenciados negativamente por la irradiancia.

La generación de un modelo de acumulación de EPS nos permite predecir el comportamiento del cultivo mediante una simulación (Figura 59) que nos indica que la productividad de EPS es muy constante ($0,05\text{-}0,1 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para ciertos valores de velocidad de dilución, independientemente de la irradiancia incidente. Por otra parte indica que para incrementar la productividad de EPS es necesario trabajar a baja velocidad de dilución y elevada irradiancia, pudiendo alcanzar valores de $0,15 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

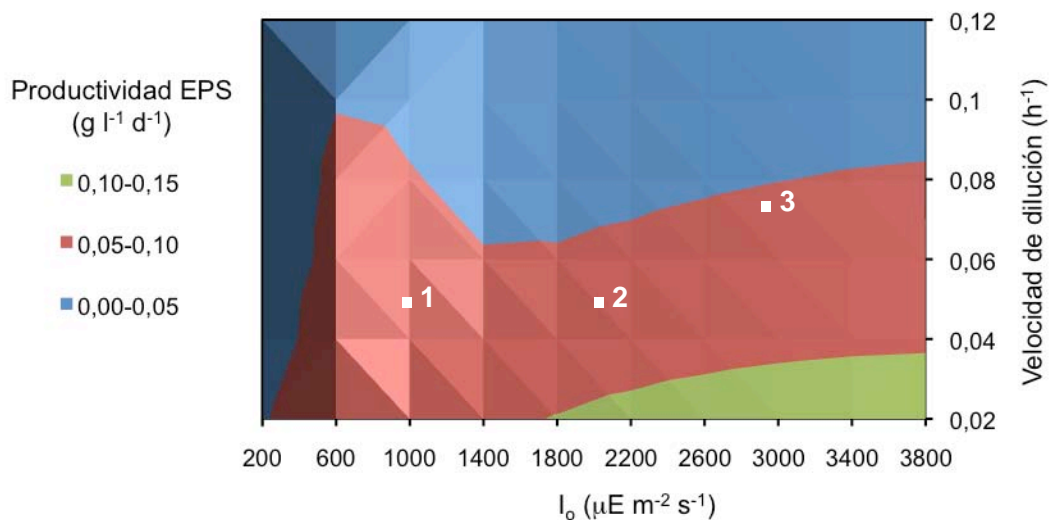


Figura 59. Simulación del efecto de la irradiancia y la velocidad de dilución sobre productividad de EPS en cultivos de *Anabaena* en régimen continuo y datos experimentales. Datos de la simulación obtenidos a partir de la Ecuación 16. Los números corresponden a datos experimentales. 1: $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $0,056 \text{ h}^{-1}$); 2: $0,035 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($2800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $0,056 \text{ h}^{-1}$); 3: $0,06 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($2800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $0,079 \text{ h}^{-1}$).

Los datos experimentales se ajustan a las predicciones derivadas de la simulación de la productividad de EPS frente a irradiancia y velocidad de dilución si bien el ajuste es menos preciso que el de la productividad de biomasa y la tasa de fijación de CO₂.

La productividad de EPS determinada oscila entre 15 mg l⁻¹ d⁻¹ en estanque abierto y 250 mg l⁻¹ d⁻¹ en reactor tubular, y valores intermedios de 50 mg l⁻¹ d⁻¹ en RPV y fotoquimiostato. Estos valores son similares a los publicados y referidos en la Tabla 30, si bien hay que considerar las diferencias entre los sistemas de cultivo empleados, las condiciones de operación, los métodos para la determinación del EPS y el hecho de que, en la mayoría de los casos, los cálculos de productividad son extrapolaciones a partir de cultivos en estanco.

Tabla 30. Productividad de EPS de diferentes organismos.

Organismo	Productividad EPS (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Volumen y duración del cultivo	Referencia
<i>Aphanocapsa halophytica</i>	32	4 l, 20 d	Sudo y col., 1995
<i>Cyanospira capsulata</i>	116	6 l, 28 d	De Philippis y col., 1991
<i>Cyanospira capsulata</i>	144	3 l, 21 d	De Philippis y col., 1998
<i>Cyanothece</i> sp. CA 3	19	0,5 l, 8 d	De Philippis y col., 1998
<i>Cyanothece</i> sp. IR2 20	80	0,5 l, 8 d	De Philippis y col., 1998
<i>Nostoc insulare</i>	47	8 l, 52 d	Fischer y col., 1997
<i>Nostoc insulare</i>	15	10 l, 50 d	Volk y col., 2007
<i>Nostoc flagelliforme</i>	14	20 l, 16 d	Yu y col., 2010
<i>Nostoc</i> PCC 6720	28	0,4 l, 15 d	De Philippis y col., 2001
<i>Nostoc</i> PCC 7413	47	0,4 l, 15 d	De Philippis y col., 2001
<i>Nostoc</i> PCC 7413	150	0,25 l, 13 d	Otero y Vincenzini, 2003
<i>Porphyridium cruentum</i>	69	15 l*	Sun y col., 2010
<i>Porphyridium</i> sp.	34	96 l*	Singh y col., 2000
<i>Synechocystis</i> sp. BASO444	71	0,3 l, 7 d	Ozturk y col., 2010

Datos de productividad estimados a partir de cultivos estancos. *Cultivo semicontinuo

En los cultivos a la intemperie, la productividad de EPS depende del sistema empleado. Así, es prácticamente inapreciable en sistemas abiertos y máxima en reactor tubular, superando incluso los valores obtenidos a alta irradiancia en fotoquimiostato. Estos resultados son similares a los obtenidos por Moreno y col. (2003). La frecuencia de dilución de los cultivos semicontinuos afecta a esta

productividad, la cual es menor cuando las diluciones son diarias y mayor al incrementarse el intervalo de renovación, para cualquiera de los sistemas ensayados, siendo este efecto especialmente remarcable en el caso del RPV.

El comportamiento reológico de los cultivos de *Anabaena* es una faceta relevante, ya que la viscosidad de los mismos puede afectar directamente a la calidad del producto y a la ingeniería del proceso de producción. Un exceso de viscosidad puede dificultar la transferencia de masa, el mezclado y la recogida del cultivo (Wu y Shi, 2008). El EPS liberado al medio por *Anabaena* incrementa la viscosidad del cultivo. Este efecto se ha descrito también para otros microorganismos, como la microalga *Botryococcus braunii* (Fernandes y col., 1991) y la cianobacteria *Cyanospira capsulata* (De Philippis y col., 1991).

Se pueden definir dos tipos de fluidos: newtonianos y no-newtonianos, estos últimos se pueden diferenciar en pseudoplásticos y dilatantes. Una gran cantidad de fluidos, casi todos de interés industrial, presentan desviaciones de la ley de Newton. La presencia de EPS en el medio de cultivo modifica la reología del mismo, que pasa de tener un comportamiento dilatante a pseudoplástico cuando la concentración de EPS supera $0,1 \text{ g l}^{-1}$. Moreno y col. (2000) verificaron un comportamiento pseudoplástico para disoluciones acuosas de EPS de *Anabaena* a concentraciones de $0,2-0,6 \text{ g l}^{-1}$. La mayoría de los EPS excretados al medio tienen un comportamiento pseudoplástico, como los liberados por *Cyanospira capsulata* (Vincenzini y col., 1993) y varias estirpes de *Nostoc* (De Philippis y col., 2000).

Se han descrito diversas aproximaciones metodológicas a la separación y recuperación de EPS de cultivos de microorganismos, siendo la centrifugación el método más sencillo y eficaz cuando la interacción entre polisacárido y pared celular es débil. Cuando las uniones son más estrechas se requieren condiciones más severas, tales como tratamiento alcalino, calentamiento, calentamiento en presencia de sales o de fenol, tratamiento térmico en autoclave, ultrasonidos o agitación. Después de tales tratamientos se hace necesaria la centrifugación o precipitación de la muestra para la recuperación del EPS (Smith y Pace, 1982). El EPS de *Anabaena* permanece ligeramente unido a la superficie celular, por lo que puede recuperarse hasta un 40 % del mismo mediante la centrifugación del cultivo. Tanto el tratamiento térmico como la agitación severa incrementan notablemente la recuperación del EPS, siendo la agitación algo más eficiente. Es importante mantener intacta la biomasa para impedir la liberación al medio de componentes celulares que contaminarían el

producto de interés, en este caso el EPS, dificultando su uso posterior (alimentación, cosmética).

V.3. INMOVILIZACIÓN DE *Anabaena* EN SOPORTE DE POLIURETANO

Dada su elevada área superficial y alta afinidad por metales pesados, las microalgas pueden ser utilizadas para la eliminación de éstos de aguas residuales (Bashan y Bashan, 2010). Sin embargo, la biomasa de algas está formada por pequeñas partículas de baja densidad, poca estabilidad mecánica y escasa rigidez, presentando los sistemas de células libres serias limitaciones operacionales para el tratamiento de efluentes industriales, siendo la más importante de todas ellas la dificultad para separar las células tras su uso (Tsezos, 1986). Uno de los métodos sugeridos para soslayar este inconveniente es la retención de microalgas como preparaciones inmovilizadas, con unas características adecuadas de tamaño, rigidez y porosidad (Volesky y Holan, 1995). Diferentes microalgas se han inmovilizado en una gran variedad de soportes, muchos de ellos geles naturales (alginato, carrageno, agar) o sintéticos (acrilamida, resinas), que pueden dificultar la difusión del metal a través de la matriz e impedir la interacción del mismo con la superficie celular (Saeed e Iqbal, 2006). Estas dificultades se pueden solventar utilizando como técnica de inmovilización la retención física en soportes inertes, naturales (fibra vegetal) o sintéticos (poliuretano). Todos estos soportes deben cumplir ciertos requisitos para poder ser empleados en el tratamiento de aguas, tales como ser insolubles, estables mecánicamente y no biodegradables (Leenen y col., 1996).

Estudios comparativos de inmovilización de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* en poliuretano y en geles de alginato y carrageno han destacado la estabilidad de los sistemas con poliuretano para el tratamiento de aguas residuales (Travieso y col., 1996), si bien, no se han observado diferencias significativas entre ellos con respecto al tratamiento de aguas contaminadas por metales (Travieso y col., 1999). El poliuretano, además de una mayor resistencia a ciertos efluentes, presenta otras ventajas frente a los geles como su bajo coste, su resistencia a agentes microbianos, su posible reutilización y la flexibilidad a la hora de adaptar su tamaño a escala industrial (Travieso y col., 1999). El poliuretano ha resultado ser un soporte polivalente, habiéndose empleado en la inmovilización de *Gloeocapsa olpicola* y *Synechocystis* sp. PCC 6803 para la producción de hidrógeno (Antal y Lindblad, 2005), de *Anabaena* sp. ATCC 33047 para la producción de exopolisacáridos (García

González y col., 2005b), de *Chlorella vulgaris* y diversas especies del género *Scenedesmus* para la adsorción de nitrato, fosfato y varios metales pesados (Travieso y col., 1996 y 1999). Atendiendo a estos criterios, se ha seleccionado para este trabajo el poliuretano como soporte para la inmovilización de *Anabaena* y su uso posterior para la retirada de cadmio.

El soporte de poliuretano seleccionado para esta investigación está recomendado para la filtración mecánica y biológica de aguas. El tamaño de poro es un factor determinante de la capacidad para inmovilizar de cualquier soporte ya que afecta a la difusión de nutrientes y al paso de luz, especialmente crítico al trabajar con organismos fotosintéticos. Se ha seleccionado el poliuretano de 1600-2200 μm de diámetro de poro como el más idóneo para la inmovilización de *Anabaena*.

En este trabajo se ha establecido un protocolo para incorporar de forma eficiente la biomasa de *Anabaena* en los fragmentos de poliuretano mediante el burbujeo con aire de la suspensión que contiene el soporte y las células. Al ser un proceso pasivo, la retención de *Anabaena* depende entre otros factores de las propiedades de su la superficie celular. En algunos casos se ha descrito que la presencia de sustancias polisacáridicas liberadas por microalgas puede favorecer la adhesión de las mismas a la superficie del soporte (Urrutia y col., 1995). Por ello, el EPS, generado durante el crecimiento diazotrófico de *Anabaena* puede facilitar la inmovilización.

Independientemente de la geometría y el tamaño de los fragmentos de poliuretano, la capacidad de inmovilización aumenta con la relación volumen/superficie. Atendiendo a este criterio se seleccionan los discos de 1,5 cm de diámetro y 1 cm de altura como formato de soporte idóneo para la inmovilización de *Anabaena*.

Otros parámetros optimizados para la inmovilización de *Anabaena* son la densidad celular inicial de los inóculos, el tiempo necesario para que la biomasa quede retenida en el soporte, y la superficie total de soporte disponible. La concentración de biomasa retenida por unidad de superficie es constante ($0,6 \text{ mg biomasa cm}^{-2}$) independientemente de la concentración inicial de biomasa para un mismo tiempo y una determinada superficie de soporte (Figura 48). Por ello, y aunque en el proceso global de inmovilización se emplee más tiempo, se ha decidido utilizar inicialmente inóculos poco densos para que se entrapen en el soporte y crezcan lentamente en su

interior para garantizar que estamos trabajando con una biomasa en crecimiento activo. La alternativa sería utilizar cultivos muy densos para propiciar la inmovilización en menos tiempo pero en esas circunstancias las células podrían estar envejecidas y alteradas sus propiedades. Los sistemas inoculados con baja densidad celular podrían estar negativamente afectados por la luz como ha descrito Fischer y col. (1997) para sistemas inmovilizados poco concentrados de *Chroococcus minutus* y *Nostoc insulare*. Este efecto no ha sido observado para el caso de *Anabaena*.

En resumen, para un volumen de cultivo de 300 ml y una densidad celular inicial de $0,2 \text{ g l}^{-1}$, se han establecido como condiciones óptimas de inmovilización 250 cm^2 de esponja de poliuretano de $1600\text{-}2200 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro en forma de disco, necesitándose 8 días para obtener la retención de $0,6 \text{ mg biomasa cm}^{-2}$.

V.4. RETENCIÓN DE CADMIO POR BIOMASA INMOVILIZADA DE *Anabaena*

La liberación de metales pesados al medio supone un gran riesgo medioambiental, debido a que son recalcitrantes a su transformación y eliminación, acumulándose en la cadena trófica (Gadd y White, 1993; Nriagu y Pacyna, 1988). El cadmio es uno de los metales pesados más tóxicos para el medio ambiente, en general y para el hombre en particular, generando alteraciones renales, insuficiencia respiratoria, lesiones óseas, hipertensión y cáncer (Benguella y Benaissa, 2002). Los efluentes de la minería y la metalurgia del cadmio, la manufactura de baterías, las industrias de cerámicas y pigmentos liberan cadmio que se dispersa en el medio como parte de las aguas residuales industriales. Estos efluentes pueden ser tratados mediante métodos físico-químicos como precipitación, evaporación, adsorción e intercambio iónico, que suponen una gran inversión económica, elevado coste de operación, y que incluso pueden generar residuos secundarios también de difícil eliminación (Aksu, 2001; Wilde y Benemann, 1993).

El empleo de biomasa de microalgas para la retención de metales pesados presenta un inmenso potencial (Gadd y White, 1993) debido a las propiedades superficiales de estos organismos, con presencia de polisacáridos, peptidoglicanos y proteínas, que aportan numerosos grupos funcionales, que constituyen sitios de unión para metales (Chojnacka y col., 2005). La inmovilización de esta biomasa algal aporta mayores ventajas en su aplicación ya que se simplifica el diseño experimental y permite su reutilización, especialmente importante al trabajar a escala industrial

(Moreno Garrido, 2008). *Anabaena* inmovilizada posee propiedades que la hacen atractiva para su utilización en la biorremediación de metales pesados, dada la estabilidad de su retención por el soporte de poliuretano, así como por la presencia de ácidos urónicos en el EPS responsables de la naturaleza aniónica de su superficie celular (Moreno y col., 2000). Así, hemos constatado que los sistemas inmovilizados de *Anabaena* en poliuretano son estables en las condiciones de agitación empleadas en las experiencias de remoción de cadmio, donde sólo se libera un 10 % del total de la biomasa originalmente inmovilizada. Además, el soporte no interviene en el proceso de remoción de cadmio, a diferencia de otros soportes empleados para la inmovilización como el alginato que tiene una capacidad máxima para retener cadmio de hasta 122 mg Cd⁺² g⁻¹ alginato (Iqbal y Edyvean, 2004).

La elevada velocidad de remoción de cadmio por *Anabaena*, así como su saturación a partir de la primera hora aproximadamente, sugiere que no se trata de un proceso metabólico de absorción, sino de un fenómeno pasivo de adsorción (Chojnacka y col., 2005). Muchas de las cinéticas estudiadas, como la de *Spirulina platensis* inmovilizada en alginato (Rangsayatorn y col., 2004), presentan un perfil similar, con una disminución rápida del metal presente en el medio en los primeros 10-20 minutos, seguida de una fase más lenta, a lo largo de la primera hora de tratamiento (De Philippis y col., 2001; Rangsayatorn y col., 2004). El hecho de que tanto en luz como en oscuridad la capacidad de retención de cadmio por el sistema inmovilizado de *Anabaena* sea la misma (resultados no mostrados), apoya la idea de un proceso pasivo (Pandey y col., 2002).

Los datos bibliográficos no son concluyentes respecto al efecto que la inmovilización de la biomasa puede tener sobre su capacidad de adsorción de metales pesados debido a que el efecto de la inmovilización puede variar con el tipo de soporte empleado (Akhtar y col., 2004; Rangsayatorn y col., 2004). Se ha descrito que una elevada concentración de biomasa podría reducir la eficiencia de captación de metales, ya que el mayor contacto entre células reduciría la superficie disponible para la unión del metal (Ahuja y col. 1999). Sin embargo, este efecto no se ha observado para *Anabena* en las condiciones ensayadas, observándose que la cantidad de cadmio retirada es directamente proporcional a la biomasa inmovilizada empleada (Figura 53). Un incremento en la concentración de cadmio en los ensayos no se corresponde con modificaciones en la cantidad de metal retenida por la biomasa (Figura 54), indicando que los sitios de unión presentes en la superficie de *Anabena* se encuentran saturados.

Las cinéticas de adsorción de metales pesados se ajustan, en general, a dos modelos que describen diferentes tipos de interacción biomasa-metal pesado (De Philippis y col., 2003). La retención de Cd^{+2} por el sistema inmovilizado de *Anabaena* en esponja de poliuretano se ajusta al modelo de Langmuir (Figuras 55 y 56), que describe un fenómeno reversible de adsorción monocapa en una superficie que contiene un número limitado de sitios de unión idénticos. Además el modelo asume que las partículas unidas a la superficie no interaccionan entre ellas, de manera que la cantidad de cadmio adsorbido no influye sobre la tasa de unión de cadmio (Cruz y col., 2004). La mayoría de los casos estudiados de retención de metales por biomasa de diferente naturaleza se ajustan a las isotermas de Langmuir (Tabla 31), que definen el parámetro $q_{m\acute{a}x}$, indicativo de la capacidad máxima de adsorción de un metal pesado por unidad de biomasa. El valor de $q_{m\acute{a}x}$ nos permite evaluar la idoneidad del sistema inmovilizado de *Anabaena* en esponja de poluretano frente a otros sistemas libres e inmovilizados, con biomasa de diferente procedencia. El valor de $q_{m\acute{a}x}$ determinado para el sistema de *Anabena* es de 162 mg g^{-1} , superior a la mayoría de los descritos para el caso del cadmio (Tabla 31). El valor determinado para la constante de Langmuir (b), indicativa de la afinidad de la biomasa por el sustrato, es de $0,41 \text{ l mg}^{-1}$ (Tabla 31).

Tabla 31. Valores de $q_{m\acute{a}x}$ y b para cadmio en diferentes organismos.

Organismo	$q_{m\acute{a}x}$ (mg g ⁻¹)	b (l mg ⁻¹)	Referencia
<i>Hydrilla verticillata</i>	15,0	2,92	Bunluesin y col., 2007
<i>Oscillatoria</i> sp.	32,2	0,05	Katircioglu y col., 2008
<i>Chlorella vulgaris</i>	33,7	0,50	Klimmek y col., 2001
<i>Gracillaria</i> sp.	33,7	0,19	Sheng y col., 2004
<i>Ectocarpus silicosus</i>	41,0	-	Winter y col., 1994
<i>Lyngbya taylorii</i>	41,6	0,12	Klimmek y col., 2001
<i>Phormidium</i> sp.	48,1	0,81	Iqbal y Saeed, 2011
<i>Dunaliella salina</i>	52,0	-	Folgar y col., 2009
<i>Synechococcus</i> sp.	57,4	-	Saeed e Iqbal, 2006
<i>Ulva</i> sp.	65,9	0,01	Sheng y col., 2004
<i>Spirulina platensis</i>	70,9	0,07	Rangsayatorn y col., 2004
<i>Spirulina platensis</i>	98,0	-	Rangsayatorn y col., 2002
<i>Padina</i> sp.	84,3	0,05	Sheng y col., 2004
<i>Ascophyllum nodosum</i>	84,3	-	Chong y Volesky, 1995
<i>Sargassum</i> sp.	85,4	0,10	Sheng y col., 2004
<i>Fucus vesiculosus</i>	108,2	0,11	Mata y col., 2008
<i>Chlorella vulgaris</i>	111,1	0,02	Aksu, 2001

La biomasa inmovilizada de *Anabaena* en esponja de poliuretano se podría utilizar industrialmente, ya que la capacidad de carga de la biomasa excede los 150 mg de metal g⁻¹ (Atkinson y col. 1998).

La capacidad de la biomasa empleada para captar diferentes iones metálicos es fundamental para tratar efluentes cargados con diversos metales, si bien la presencia simultánea de varios iones puede afectar a la afinidad de la biomasa por un determinado ión (Chong y Volesky, 1995). Ya que el proceso de retención de Cd⁺² por *Anabaena* tiene naturaleza pasiva, este sistema podría eventualmente utilizarse para adsorber otros cationes, ya sea con la misma afinidad (como ha descrito Blanco y col. (1999) para la biomasa de *Phormidium laminosum*) o con diferente afinidad (como es el caso de la biomasa de *Ascophyllum nodosum* (Chong y Volesky, 1995), *Fucus vesiculosus* (Mata y col., 2008), *Padina* sp., *Sargassum* sp., *Ulva* sp., *Gracillaria* sp. (Sheng y col., 2004) y *Nostoc* PCC7936, *Cyanospira capsulata* y diversas estirpes del género *Cyanothece* (Micheletti y col., 2008)) frente a diversos metales pesados divalentes.

La fosforilación de los EPS se ha empleado como una metodología para aumentar la capacidad de adsorción de metales por parte de la biomasa de cianobacterias, como en el caso de *Lyngbya taylorii*, consiguiéndose aumentar la $q_{m\acute{a}x}$ de 41,6 hasta 283,3 mg Cd⁺² g⁻¹ tras su fosforilación (Klimmek y col., 2001). Otros pretratamientos de la biomasa pueden aumentar la eficiencia de bioadsorción de metales pesados al liberar sitios de unión ocupados por sales divalentes presentes en el medio de cultivo (De Philippis y col., 2001). Además, el empleo de HCl, HNO₃ y agentes quelantes como el EDTA tras un proceso de bioadsorción facilita la liberación de los metales pesados, posibilitando la reutilización de la biomasa inmovilizada (Ahuja y col., 1999; Pradhan y Rai, 2000; Saeed e Iqbal, 2006).

La cinética de adsorción de cadmio por parte de la biomasa de *Anabaena* inmovilizada en esponja de poliuretano, así como su elevado valor de $q_{m\acute{a}x}$, son características muy relevantes del sistema que lo hacen una opción de gran interés para su empleo en la biorremediación de efluentes que contengan cadmio.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Las condiciones fijadas como óptimas para los parámetros determinantes de la productividad de cultivos de *Anabaena* sp. ATCC 33047 en régimen continuo en fotoquimiostato, en un medio igualmente optimizado, son: velocidad de dilución, 0,056 h⁻¹; 35 °C de temperatura; pH, 9; agitación mediante burbujeo de aire, 40 l aire l⁻¹ h⁻¹; irradiancia, 2800 μE m⁻² s⁻¹ de luz blanca. En estas condiciones, se obtienen productividades de 0,6 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ y 0,2 g exopolisacárido (EPS) l⁻¹ d⁻¹, siendo la tasa de fijación de CO₂ 1 g l⁻¹ d⁻¹.
2. Los principales factores que condicionan la eficiencia de los cultivos continuos, en fotoquimiostato, de *Anabaena* sp. ATCC 33047 son temperatura e irradiancia. Los modelos de comportamiento generados frente a estos parámetros indican que la productividad de biomasa y la tasa de fijación de CO₂ podrían llegar a 1 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ y 1,5 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹, si la irradiancia incidente y la velocidad de dilución del cultivo alcanzasen los 3800 μE m⁻² s⁻¹ y 0,08 h⁻¹, respectivamente.
3. *Anabaena* sp. ATCC 33047 puede cultivarse a la intemperie tanto en reactores atemperados como carentes de control de temperatura, con un marcado efecto de la irradiancia incidente sobre su productividad. Para optimizar el aprovechamiento de esta irradiancia, los cultivos deben operarse con diluciones diarias hasta un determinado valor de densidad celular mínima que varía para cada diseño de reactor y cada época del año.
4. La temperatura es el principal factor limitante de la productividad en estanques abiertos de forma que el mantenimiento de los cultivos no es sostenible cuando la temperatura ambiente baja de 15 °C. Los valores medios de productividad obtenidos son 0,034 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ que corresponde a una tasa de fijación de CO₂ de 0,061 g l⁻¹ d⁻¹.
5. Los reactores con control de temperatura (plano vertical y tubular) permiten obtener mejores rendimientos que los estanques abiertos, carente del mismo. La mayor productividad por unidad de volumen (hasta 0,55 g biomasa l⁻¹ d⁻¹, con tasa de fijación de CO₂ de 1 g l⁻¹ d⁻¹) se registra en el reactor tubular operado a una densidad celular mínima de 1 g l⁻¹ a elevada irradiancia.
6. El reactor plano vertical es un sistema idóneo para el cultivo a la intemperie de *Anabaena* sp. ATCC 33047 por su elevada productividad por unidad de superficie, moderado coste y posibilidad de escalado. En condiciones óptimas de operación

alcanza productividades de 0,17 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ y tasas de fijación de CO₂ de 0,25 g l⁻¹ d⁻¹, con valores medios anuales de 0,11 g biomasa l⁻¹ d⁻¹ y 0,17 g CO₂ l⁻¹ d⁻¹. Expresado por área ocupada por el reactor, supone 15 g biomasa m⁻² d⁻¹ y 24 g CO₂ m⁻² d⁻¹, superiores a los demás sistemas de cultivo estudiados.

7. La autofloculación de *Anabaena* sp. ATCC 33047, permite separar biomasa y medio de cultivo por sedimentación en 30 minutos sin adición de agentes floclulantes. Esta capacidad es de gran interés biotecnológico al reducir el costo de la recogida de la biomasa, facilitar la reutilización de medio y permitir la aplicación de esta materia orgánica en diversos procesos industriales.

8. El exopolisacárido generado por *Anabaena* sp. ATCC 33047, aun siendo un componente minoritario de la materia orgánica producida, tiene un efecto sustancial en el comportamiento reológico del cultivo. Su producción, favorecida por alta temperatura y baja frecuencia de dilución, representa un valor añadido a la biomasa, tanto por su contribución a la eliminación de CO₂ como por sus posibles aplicaciones industriales. La agitación mecánica permite su separación de la biomasa en un 95 %.

9. La inmovilización de *Anabaena* sp. ATCC 33047, utilizando espuma de poliuretano como soporte, es un proceso efectivo, sencillo y de bajo coste, que permite retener hasta 0,6 mg biomasa cm⁻², en las condiciones establecidas como óptimas para favorecer la inmovilización.

10. La retención de cadmio por la biomasa inmovilizada de *Anabaena* sp. ATCC 33047 es un proceso pasivo, que se fundamenta en la velocidad de adsorción y en la elevada capacidad de carga de la biomasa y que se ajusta a un modelo de adsorción monocapa, indicando que la superficie de *Anabaena* contiene un número limitado de sitios de unión idénticos y que las partículas unidas a la superficie no interaccionan entre si. Del modelo se deriva una capacidad máxima de retención de 162 mg Cd⁺² g⁻¹ biomasa, superior a los valores descritos para otros tipos de biomasa representando una alternativa al tratamiento físico-químico de vertidos contaminados con cadmio.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Hameed, M.S. y Hammouda Ebrahim, O. (2007). Biotechnological potential uses of immobilized algae. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9 (1): 183-192.
- Abed, R.M.M.; Dobretsov, S.; Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1-12.
- Acién Fernández, F.G.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A.; Fernández Sevilla, J.M.; Molina Grima, E. (1997). A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 55: 701-714.
- Acién Fernández, F.G.; Sánchez, J.A.; Fernández, J.M.; Molina, E. (1998). Modelling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58: 605-616.
- Acién Fernández, F.G.; Fernández-Sevilla, J.M.; Sánchez-Pérez, J.A.; Molina Grima, E.; Chisti, Y. (2001). Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, 56: 2721-2732.
- Acién Fernández, F.G.; Hall, D.O.; Cañizares Guerrero, E.; Krishna Rao, K.; Molina Grima, E. (2003). Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology*, 103: 137-152
- Acién Fernández, F.G.; Fernández Sevilla, J.M.; Sánchez Pérez, J.A. (2007). Photosynthetic microorganisms and valuable products. En *Encyclopedia of life support systems*. EOLSS Publ Co.
- Acién Fernández, F.G.; Molina Grima, E.; Fernández Sevilla, J.M.; González López, C.V.; Llamas Moya, B.; Ballesteros Aparicio, J.C. (2009). Liquid-phase gas collection. Patente WO2009112624.
- Aderhold, D.; Williams, C.J.; Edyvean, R.G.J. (1996). The removal of heavy-metal ions by seaweed and their derivatives. *Bioresource Technology*, 58: 1-6.
- Ahuja, P.; Gupta, R.; Saxena, R.K. (1999). Sorption and desorption of cobalt by *Oscillatoria angustissima*. *Current Microbiology*, 39: 49-52.
- Akhtar, N.; Iqbal, J.; Iqbal, M. (2004). Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. *Journal of Hazardous Materials*, 108: 85-94.
- Aksu, Z. (2001). Equilibrium and kinetic modeling of cadmium (II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature. *Separation and Purification Technology*, 21: 285-294.
- Alig, R.J. (2010). Economic modeling of effects of climate change on the forest sector and mitigation options: A compendium of briefing papers. United States Department of Agriculture. General technical report: PNW-GTR-833.
- Allen, J. F. y Martin, W. (2007). Evolutionary biology: out of thin air. *Nature*, 445 (7128): 610-612.

- Antal, T.K. y Lindblad, P. (2005) Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 114-120.
- Arnon, D.I.; McSwain, B.D.; Tsujimoto, H.Y.; Wada, K. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 357: 231-245.
- Arora, M.; Kaushik, A.; Rani, N.; Kaushik, C.P. (2010). Effect of cyanobacterial exopolysaccharides on salt stress alleviation and seed germination. *Journal of Environmental Biology*, 5: 701-704.
- Ascencio, F.; Gama, N.L.; De Philippis, R.; Ho, R. (2004). Effectiveness of *Cyanothece* spp. and *Cyanospira capsulata* exocellular polysaccharides as antiadhesive agents for blocking attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. *Folia Microbiologica*, 41 (1): 64-70.
- Atkinson, B.; Bux, W.F.; Kusan, H.C. (1998). Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water South Africa*, 24: 129-135.
- Avnimelech, Y.; Troeger, B. W.; Reed, L. W. (1982). Mutual flocculation of algae and clay evidence and implications. *Science*, 216: 63-65.
- Bar-Or, Y. y Shilo, M. (1987). Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. Strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC 6720. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (9): 2226-2230.
- Bashan, L.E. de y Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101: 1611-1627.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition, p. 312-351. En *Handbook of microalgal culture*. Ed. Richmond, A. Blackwell, Oxford.
- Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25: 207-210.
- Bekker, A.; Holland, H. D.; Wang, P.-L.; Rumble, D.; Stein, H. J.; Hannah, J. L.; Coetzee, L. L.; Beuke, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 427(6970): 117-120.
- Belay, A.; Ota, Y.; Miyakawa, K.; Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 235-241.
- Belay, A.; Kato, T.; Ota, Y. (1996). *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology*, 8: 303-311.
- Beer, L.L.; Boyd, E.S.; Peters, J.W.; Posewitz, M.C. (2009) Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 264-271.
- Bender, J.; Rodríguez-Eaton, S.; Ekanemesang, U.M.; Phillips, P. (1994). Characterization of metal-binding bioflocculants produced by the cyanobacterial

- component of mixed microbial mats. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 2311-2315.
- Benemann, J.R. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology* 4: 233-245.
- Benemann, J.R. (1993). Utilization of carbon dioxide from fossil fuel-burning power plants with biological systems. *Energy Conversion and Management*, 34: 9-11.
- Benemann, J.R. (1997). CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Conversion and Management*, 38: 475-479.
- Benguella, B. y Benaissa, H. (2002). Cadmium removal from aqueous solutions by chitin: kinetic and equilibrium studies. *Water Research*, 36: 2463-2474.
- Berry, J.P.; Gantar, M.; Perez, M.H.; Berry, G.; Noriega, F.G. (2008). Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*, 6: 117-146.
- Blanco, A.; Sanz., B.; Llama, M.J.; Serra, J.L. (1999). Biosorption of heavy metals to immobilised *Phormidium laminosum* biomass. *Journal of Biotechnology*, 69: 227-240.
- Blanco, A.M.; Moreno, J.; Del Campo, J.A.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. (2007). Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 1259-1266.
- Böhme, H. (1998). Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends in Plant Science*, 3: 346-351.
- Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70: 313-321.
- Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (1988). Micro-algal biotechnology. Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Borowitzka, L.J. y Borowitzka, M.A. (1989). Industrial production: methods and economics, 294-316. En *Algal and cianobacterial biotechnology*. Ed. Cresswell, R.C.; Rees, T.A.V. y Shah, N. Longman Scientific and Technical, New York.
- Bunluesin, S.; Kruatrachue, M.; Pokethitiyook, P.; Upatham, S.; Lanza, G.R. (2007). Batch and continuous packed column studies of cadmium biosorption by *Hydrilla verticillata* biomass. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103: 509-513.
- Burlew, J.S. (1953). *Algal culture from laboratory to pilot plant*. Ed. Burlew, J.S. Carnegie Institution of Washington, Washington DC.
- Cáceres, T.P.; Megharaj, M.; Naidu, R. (2008). Biodegradation of the pesticide fenamiphos by ten different species of green algae and cyanobacteria. *Current Microbiology*, 57: 643-646.
- Cassidy, M.B.; Lee, H.; Trevors, J.T. (1996). Environmental applications of immobilized cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 16: 79-101.

- Chaumont, D. (1993). Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5: 593-604.
- Chen, C.Y.; Yeh, K.L.; Aisyah, R.; Lee, D.J.; Chang, J.S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102: 71-81.
- Chen, L.Z.; Li, D.H.; Liu, Y.D. (2003). Salt tolerance of *Microcoleus vaginatus* Gom., a cyanobacterium isolated from desert algal crust, was enhanced by exogenous carbohydrates. *Journal of Arid Environments*, 55: 645-656.
- Chen, L.Z.; Wang, G.H.; Hong, S.; Liu, A.; Li, C.; Liu, Y.D. (2008). UV-B-induced oxidative damage and protective role of exopolysaccharides in desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 0: 1-7.
- Chen, Y.-C. (2001). Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and application for water quality control in fish culture. *Aquaculture*, 195: 71-80.
- Chen, Y.-C. (2003). Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. *Journal of Applied Phycology*, 15: 439-444.
- Cheng, L.; Zhang, L.; Chen, H.; Gao, C. (2006). Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, 50 (3): 324-329.
- Cheng-Wu, Z.; Zmora, O.; Kopel, R.; Richmond, A. (2001). An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Aquaculture*, 195: 35-49.
- Chini Zittelli, G., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., Tredici, M. R. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 70: 299-312.
- Chisti, Y. (2006) Microalgae as sustainable cell factories. *Journal of Environmental Engineering and Management*, 5: 261-274.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26 (3): 126-131.
- Chiu, S.Y.; Kao, C.Y.; Chen, C.H.; Kuan, T.C.; Ong, S.C.; Lin, C.S. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresourource Technology*, 99: 3389-3396.
- Chojnacka, K.; Chojnacki, A.; Gorecka, H. (2005). Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp. H1: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere* 59: 75-84.
- Chong, K.H. y Volesky, B. (1995). Description of two-metal biosorption equilibria by Langmuir-type models. *Biotechnology and Bioengineering*, 47: 451-460.
- Chow, C.W.K.; House, J.; Velzeboer, R.M.A.; Drikas, M.; Burch, M.D.; Steffensen, D.A. (1998). The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Water Research*, 32: 808-814.

- Cohen, Z. (1986). Products from microalgae. En CRC Handbook of Microalgal Mass Culture (421-454). Ed. Richmond, A. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Cohen, Y. (2001). Biofiltration-the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*, 77: 257-274.
- Comte, S.; Guibaud, G.; Baudu, M. (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 237-245.
- Converti, A.; Lodi, A.; Del Borghi, A.; Solisio, C. (2006). Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. *Biochemical Engineering Journal*, 32: 13-18.
- Cragg, G.M.; Grothaus, P.G.; Newman, D.J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemistry Reviews*, 109: 3012-3043.
- Cruz, C.C.V.; da Costa, A.C.A.; Henriques, C.A.V.; Luna, A.S. (2004). Kinetic modeling and equilibrium studies during cadmium biosorption by dead *Sargassum* sp. biomass. *Bioresource Technology*, 91: 249-257.
- D'Abzac, P.; Bordas, F.; Van Hullebusch, E.; Lens, P.N.L.; Guibaud, G. (2010). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (5): 1589-1599.
- Dembitsky, V.M. y Rezanka, T.R. (2005). Metabolites produced by nitrogen-fixing *Nostoc* species. *Folia Microbiologica*, 50 (5): 363-391.
- Demming-Adams B. y Adams, W.W. III (2002). Antioxidants in photo-synthesis and human nutrition. *Science*, 298: 2149-2153.
- Deng, M.D. y Coleman, J.R. (1999). Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 523-528.
- De la Rosa, M.A.; Serrano, A.; Hervás, M.; Losada, M. (1990). Capítulo 7 de Fotobioquímica. Ed. Síntesis. Madrid, España.
- De Morais, M.G. y Costa, J.A.V. (2007). Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 129: 439-445.
- De Oliveira, M.A.C.L.; Monteiro, M.P.C.; Robbs, P.G.; Leite, S.G.F. (1999). Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*, 7: 261-275.
- De Philippis, R.; Sili, C.; Tassinato, G.; Vincenzini, M.; Materassi, R. (1991). Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*. *Bioresource Technology*, 38: 101-104.
- De Philippis, R.; Margheri, M.C.; Pelosi, E.; Ventura, S. (1993). Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *Journal of Applied Phycology*, 5: 387-394.

- De Philippis, R. y Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 22: 151-175.
- De Philippis, R.; Margheri, C.; Materassi, R.; Vincenzini, M. (1998). Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments and exopolysaccharide producers. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (3): 1130-1132.
- De Philippis, R.; Faraloni, C.; Margheri, M.C.; Sili, C.; Herdman, M.; Vincenzini, M. (2000). Morphological and biotechnological characterization of the exocellular investments of polysaccharide-producing *Nostoc* strains from the Pasteur Culture Collection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 655-661.
- De Philippis, R.; Sili, C.; Paperi, R.; Vincenzini, M. (2001). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology*, 13: 293-299.
- Del Campo, J.A.; Rodríguez, H.; Moreno, J.; Vargas, M.A.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. (2001). Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 85: 289-295.
- Del Campo, J.A.; García-González, M.; Guerrero, M.G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 1163-1174.
- Dismukes, G.C.; Carrieri, D.; Bennette, N.; Ananyev, G.N.; Posewitz, M.C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 235-240.
- Doney, S.C.; Fabry, V.J.; Feely, R.A.; Kleypas, J.A. (2009). Ocean acidification: the other CO₂ problem. *Annual Review Marine Science*, 1:169-192.
- Donze, M.; Haveman, J.; Schiereck, P. (1972). Absence of photosystem II in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 256: 157-161.
- Doucha, J.; Straka, F.; Lívanský, K. (2005) Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 17: 403-412.
- Doucha, J. y Lívanský, K. (2006) Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a middle and southern european climate. *Journal of Applied Phycology*, 18: 811-826.
- Dow, K. y Downing, T.E. (2007). Diving the climate change en The Atlas of climate change (p. 39-51). Eds: King, J. y Lacey, C. Earthscan, London (UK).
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers; P. A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Ehling-Schulz, M.; Bilger, W.; Scherer, S. (1997). UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology*, 179: 1940-1945.

- El-Bestawy, E.A.; El-Salam, A.Z.A.; Mansy, A.E.-R.H. (2007). Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59: 180-192.
- El-Bestawy, E. (2008). Treatment of mixed domestic–industrial wastewater using cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 1503-1516.
- Eriksen, N.T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30: 1525-1536.
- Fattom, A. y Shilo, M. (1984a) Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 47: 135-143.
- Fattom, A. y Shilo, M. (1984b) *Phormidium* J-1 bioflocculant: production and activity. *Archives of Microbiology*, 139: 421-426.
- Fernandes, H.L.; Lupi, F.; Tomé, M.M.; Sá-Correia, I.; Novais, J.M. (1991). Rheological behaviour of the culture medium during growth of the microalga *Botryococcus braunii*. *Bioresource Technology*, 38: 133-136.
- Fernández Sevilla, J.M.; Molina Grima, E.; García Camacho, F.; Acien Fernández, F.G.; Sánchez Pérez, J.A. (1998). Photolimitation and photoinhibition as factors determining optimal dilution rate to produce eicosapentaenoic acid from cultures of the microalga *Isochrysis galbana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 199-205.
- Fernández Piñas, F.; Mateo, P.; Bonilla, I. (1991). Binding of cadmium by cyanobacterial growth media: free ion concentration as a toxicity index to the cyanobacterium *Nostoc* UAM 208. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 425-431.
- Figuerola J.; Fout, T.; Plasynski, S.; McIlvried, H.; Srivastava, R. (2008). Advances in CO₂ capture technology-The U.S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 2: 9-20.
- Filali Mouhim, R.; Cornet, J.F.; Fontane, T.; Fournet, B.; Dubertret, G. (1993). Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnology Letters*, 15: 567-572.
- Fischer, D.; Schlösser, U.G.; Pohl, P. (1997). Exopolysaccharide production by cyanobacteria grown in closed photobioreactors and immobilized using white cotton toweling. *Journal of Applied Phycology*, 9: 205-213.
- Fischer, W. W. (2008). Biogeochemistry: Life before the rise of oxygen. *Nature* 455 (7216): 1051-1052.
- Flaibani, A.; Olsen, Y.; Painter, T. J. (1989). Polysaccharides in desert reclamation-compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydrate Research*, 190: 235-248.

- Flores, E. y Herrero, A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 39-50.
- Folgar, S.; Torres, E.; Pérez-Rama, M.; Cid, A.; Herrero, C.; Abalde, J. (2009). *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. *Journal of Hazardous Materials*, 165: 486-493.
- Gadd, G.M. y White, C. (1993). Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology?. *Trends in Biotechnology*, 11: 353-359.
- Gallon, J.R. (2001). N₂ fixation in phototrophs: adaptation to a specialized way of life. *Plant and Soil*, 230: 39-48.
- Gambini, M. y Vellini, M. (2003). CO₂ Emission Abatement From Fossil Fuel Power Plants by Exhaust Gas Treatment. *Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, 125: 365-374.
- Gantar, M.; Rowell, P.; Kerby, N.W.; Sutherland, I.W. (1995). Role of extracellular polysaccharide in the colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) roots by N₂-fixing cyanobacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 41-48.
- García González, M.; Moreno, J.; Cañavate, J.P.; Anguis, V.; Prieto, A.; Manzano, J.C.; Florencio, F.J.; Guerrero, M.G. (2003). Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology*, 15: 177-184.
- García González, M.; Moreno, J.; Manzano, J.C.; Florencio, F.J.; Guerrero, M.G. (2005a). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-β-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 115, 81-90.
- García González, M.; Fernandez, J.M.; Guerrero, M.G. (2005b). Exopolysaccharide production by immobilized filaments of the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. The 10th International Conference on Applied Phycology, Kunming, China, Pp: 112–21. Chinese Academy of Science.
- García Guerrero, M.; Moreno Fernández, J.; García González, M.; Martínez Blanco, A.; Acién Fernández, F.G.; Molina Grima, E. (2006). Method of fixing carbon dioxide using a culture of cyanobacteria. Patente P200501126, W06070056ES.
- García Malea, M.C.; Acién, F.G.; Fernández, J.M.; Cerón, M.C.; Molina, E. (2006). Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 981-989.
- Garnham, G.W. (1997) The use of Algae as metal biosorbents. En *Biosorbents for metal ions* de D.A. John Wase. Ed. Taylor & Francis.
- Geresh, S.; Mamontov, A.; Weinstein, J. (2002). Sulfation of exocellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50: 179-187.
- Giráldez Ruiz, N.; Mateo, P.; Bonilla, I.; Fernández-Pinas, F. (1997). The relationship between intracellular pH, growth characteristics and calcium in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 exposed to low pH. *New Phytology*, 137: 599-605.

- Glazer, A.N. (1994). Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6: 105-112.
- Goldman, J.C. (1979). Outdoor algal mass cultures II. Photosynthetic yield limitations. *Water Research*, 13: 119-136.
- González López, C.V.; Ación Fernández, F.G.; Fernández Sevilla, J.M.; Sánchez Fernández, J.F.; Cerón García, M.C.; Molina Grima, E. (2009). Utilization of the *Anabaena* sp. ATCC 33047 in CO₂ removal processes. *Bioresource Technology*, 100: 5904-5910.
- González López, C.V. (2010). Tesis doctoral: Depuración de gases de combustión con microorganismos fotosintéticos. Universidad de Almería, Almería.
- Gouveia, L. y Oliveira, A.C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 269-274.
- Granado, F.; Olmedilla, B.; Blanco, I. (2003) Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90: 487-502.
- Greenwell, H.C.; Laurens, L.M.L.; Shields, R.J.; Lovitt R.W.; Flynn, K.J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of Royal Society Interface*, 7: 703-726.
- Gressel, J. (2008). Transgenic are imperative for biofuel crops. *Plant Science*, 174: 246-263.
- Grillo, J.F. y Gibson, J. (1979). Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Journal of Bacteriology*, 140: 508-517.
- Grobbelaar, J.U. (1994). Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations. *Journal of Applied Phycology*, 6: 331-335.
- Grobbelaar, J.U. (2009). Factors governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate. *Journal of Applied Phycology*, 21: 489-492.
- Grossman, A.R.; Schaefer, M.R.; Chiang, G.G.; Collier, J.L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57(3): 725-749.
- Guedes, A.C.; Amaro, H.M.; Malcata, F.X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine Drugs*, 9: 625-644.
- Guerin, M.; Huntley, M.E.; Olaizola, M. (2003). *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21: 210-216.
- Guerrero, M.G. (2009). Fotosíntesis, Microalgas, Biocombustibles. En *Memorias de la Real Academia Sevillana de Ciencias* (P. 29-72). Sevilla, España.
- Guerrero, M.G. y Losada, M. (1991). Producción fotosintética de compuestos de interés práctico por microalgas. En *Fijación y movilización biológica de nutrientes*, vol 1: Fotosíntesis aspectos fisiológicos y de estrés (Lopez Gorjé J, coord.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, pp. 169-182.

- Gupta, S.K.; Jha, A.K.; Pal, A.K.; Venkateshwarlu, G. (2007). Use of natural carotenoids for pigmentation in fishes. *Natural Product Radiance*, 6: 46-49.
- Hall, D.O. (1995). Providing energy and food for all. *People and the planet*, 4: 15-17.
- Hall, D.O. (1997). Biomass energy in industrialized countries –a view of the future. *Forest Ecology Management*, 91:17-45.
- Hall, D.; Markov, S.A.; Watanabe, Y.; Rao, K.K. (1995). The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynthesis Research*, 46: 159-167.
- Hamdy, A. A. (2000). Biosorption of heavy metals by marine Algae. *Current Microbiology*, 41: 232–238
- Hardy, G. (2000). Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*, 16: 688–697.
- Healey, F.P. (1973). Characteristics of phosphorus deficiency in *Anabaena*. *Journal of Phycology*, 9: 383-394.
- Herbert, D.; Phipps, P.J.; Strange, R.E. (1971). Chemical analysis of microbial cells. En *Methods in Microbiology*, vol 5B. Eds.: J.R. Norris y D.W. Ribbons. Academic Press, London.
- Hernández Corona, A.; Nieves, I.; Meckes, M.; Chamorro, G.; Barrón, B.L. (2002). Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, 56: 279-285.
- Herzog, H.; Drake, E.; Adamsy, E. (1997). CO₂ capture reuse and storage technologies for mitigating global climate change. A white paper. Department of energy. Energy laboratory. Massachusetts.
- Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM (2006) Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46:185-196
- Hill, D.R.; Peat, A.; Potts, M. (1994). Biochemistry and structure of the glycan secreted by desiccation-tolerant *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *Protoplasma*, 182: 126-148.
- Hill, D.R.; Keenan, T.W.; Helm, R.F.; Potts, M.; Crowe, L.M.; Crowe, J.H. (1997). Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *Journal of Applied Phycology*, 9: 237-248.
- Hirano, R.U.A.; Hirayama, S.; Ogushi, Y. (1997). CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22: 137-142.
- Hu, Q.; Guterman, H.; Richmond, A. (1996). A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnology and Bioengineering*, 51: 51-60.

- Hu, Q.; Faiman, D.; Richmond, A. (1998). Optimal tilt angles of enclosed reactors for growing photoautotrophic microorganisms outdoors. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85 (2): 230-236.
- Hu, C.; Liu, Y.; Paulsen, B.S.; Petersen, D.; Klaveness, D. (2003). Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydrate Polymers*, 54: 33-42.
- Hu, Q. y Richmond, A. (1996). Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 8: 139-145.
- Huang, Z.; Liu, Y.; Paulsen, B.S.; Klaveness, D. (1998). Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *Journal of Phycology*, 34: 962-968.
- Huang, W.J.; Lai, C.H.; Cheng, Y.L. (2007). Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. *Science of the Total Environment*, 377: 214-223.
- Hughes, T.P.; Baird, A.H.; Bellwood, D.R.; Card, M.; Connolly, S.R.; Folke, C.; Grosberg, R.; Hoegh-Guldberg, O.; Jackson, J.B.C.; Kleypas, J.; Lough, J.M.; Marshall, P.; Nystrom, M.; Palumbi, S.R.; Pandolfi, J.M.; Rosen, B.; Roughgarden, J. (2003). Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science*, 301: 929-933.
- Hulatt C.J. y Thomas, D.N. (2011). Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude. *Bioresource Technology*, 102: 6687-6695.
- Hussein, G.; Sankawa, U.; Goto, H.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. (2006) Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*, 69: 443-449.
- Illman, A.M.; Scragg, A.H.; Shales, S.W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 631-635.
- Inthorn, D.; Nagase, H.; Isaji, Y.; Hirata, K.; Miyamoto, K. (1996). Removal of cadmium from aqueous solution by the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix tenuis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82: 580-584.
- IPCC (2001). *Climate change 2001: the scientific basis*. Equipo de redacción principal: Houghton, J.T.; Ding, Y.; Griggs, D.J.; Noguer, M.; van der Linden, P.J.; Dai, X. Maskell, K. y Johnson, C.A.. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- IPCC (2005). *La captación y el almacenamiento de dióxido de carbono: Informe especial*. Editores: Metz, B.; Davidson, O.; de Coninck, H.; Loos, M. y Meyer, L. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- IPCC (2007). *Cambio climático 2007: Informe de síntesis*. Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. IPCC, Ginebra, Suiza.

- Iqbal, M. y Edyvean, R.G.J. (2004). Alginate coated loofa sponge discs for the removal of cadmium from aqueous solutions. *Biotechnology Letters* 26: 165-169.
- Iqbal, M. y Saeed, A. (2011). Utilization of cyanobacterium *Phormidium* sp. to produce immobilized hybrid disc biosorbent for the removal of Cd²⁺ from aqueous solution. *Pakistan Journal of Botany*, 43 (3): 1753-1758.
- Jacob-Lopes, E.; Scoparo, C.H.G.; Franco, T.T. (2008). Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica Nägeli* in tubular photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing*, 47: 1365-1373.
- Jacob-Lopes, E.; Revah, S.; Hernández, S.; Shirai, K.; Franco, S.T. (2009). Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chemical Engineering Journal*, 153: 120-126.
- Janssen, M.; Tramper, J.; Mur, L.R.; Wijffels, R.H. (2002). Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81: 193-210.
- Jiménez Aguilar, A.; Huber-Sannwald, E.; Belnap, J.; Smart, D.R.; Arredondo Moreno, J.T. (2009). Biological soil crusts exhibit a dynamic response to seasonal rain and release from grazing with implications for soil stability. *Journal of Arid Environments*, 73: 1158-1169
- Katircioglu, H.; Aslim, B.; Türker, A.R.; Atıcı, T.; Beyatlı, Y. (2008). Removal of cadmium(II) ion from aqueous system by dry biomass, immobilized live and heat-inactivated *Oscillatoria* sp. H1 isolated from freshwater (Mogan Lake). *Bioresource Technology*, 99: 4185-4191.
- Kim, S.-G.; Choi, A.; Ahn, C.-Y.; Park, C.-S.; Park, Y.-H.; Oh, H.-M. (2005). Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 190-194.
- Klimmek, S.; Stan, H.J.; Wilke, A.; Bunke, G.; Buchholz, R. (2001). Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environment Science and Technology*, 35: 4283-4288.
- Knuckey, R.M.; Brown, M.R.; Robert, R.; Frampton, D.M.F. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35 (3): 300-313.
- Kochert, G. (1978). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Eds.: J.A. Hellebust y J.S. Craigie. Cambridge University Press, Cambridge.
- Krinsky N.I. y Johnson E.J. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26:459-516.
- Kucho, K.; Okamoto, K. Tsuchiya, Y.; Nomura, S.; Nango, M. (2005). Global analysis of circadian expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 187(6): 2190-2199.
- Kumar, K.; Dasgupta, C.N.; Nayak, B.; Lindblad, P.; Das, D. (2011). Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 102 (8): 4945-4953.

- Kurano, N.; Ikemoto, H.; Miyashita, H.; Hasegawa, T.; Hata, H.; Miyachi S. (1995) Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Conversion and Management*, 36 (6-9): 689-692.
- Lamelas, C.; Benedeti, M.; Wilkinson, K.J.; Slaveykova, V.I. (2006). Characterization of H⁺ and Cd²⁺ binding properties of the bacterial exopolysaccharides. *Chemosphere*, 65: 1362-1370.
- Lau, P.S.; Tam, N.F.Y.; Wong, Y.S. (1998). Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 63: 115-121.
- Lavens, P. y Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of life food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. 361: 7-42.
- Lavoie, A y de la Noüe, J. (1986). Harvesting of *Scenedesmus obliquus* in wastewater: auto- or bioflocculation?. *Biotechnology and Bioengineering*, 30: 852-859.
- Lee, S.K. y Choi, H.S. (2001) Spectrophotometric determination of cadmium and copper with ammonium pyrrolidine dithiocarbamate in nonionic Tween 80 micellar media. *Bulletin of the Korean Chemistry Society*, 22: 463-466.
- Leenen, E.J.T.M.; Dos Santo, V.A.P; Grolle, K.C.F.; Tamper, J.; Wijffels, R.H. (1996). Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research*, 30: 2985-2996.
- Lehr, F. y Posten, C. (2009). Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 280-285.
- Li, P.; Liu, Z.; Xu, R. (2001). Chemical characterisation of the released polysaccharide from the cyanobacterium *Aphanothece halophytica* GR02. *Journal of Applied Phycology*, 13: 71-77.
- Liu, Y.K.; Seki, M.; Tanaka, H.; Furusaki, S. (1998). Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85: 416-421.
- Liu, L. y Rei, K.S. (2010). New Peptides Isolated from *Lyngbya* Species: A Review. *Marine Drugs*, 8: 1817-1837.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lu, Y.M.; Xiang, W.Z.; Wen, Y.H. (2010). *Spirulina* (Arthrospira) industry in Inner Mongolia of China: current status and prospects. *Journal of Applied Phycology*, 23(2): 265-269.
- Mackinney, J. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal Biological Chemistry*, 140: 315-322.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals*, 15: 377-390.
- Maqubela, M.P.; , Mnkeni, P.N.S.; Muchaonyerwa, P.; D'Acqui, L.P.; Pardo, M.T. (2010). Effects of cyanobacteria strains selected for their bioconditioning and

- biofertilization potential on maize dry matter and soil nitrogen status in a South African soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56: 552-559.
- Markou, G. y Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88 (10): 3389-3401
- Marquardt, J.; Senger, H.; Miyashita, H.; Miyachi, S.; Mörschel, E. (1997). Isolation and characterization of biliprotein aggregates from *Acaryochloris marina*, a Prochloron-like prokaryote containing mainly chlorophyll d. *FEBS Letters*, 410 (2): 428-432.
- Martínez, M.E.; Sánchez, S. Jiménez, J.M.; El Yousfi, F.; Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73: 263-272.
- Mata, Y.N.; Blázquez, M.L.; Ballester, A.; González, F.; Muñoz, J.A. (2008). Characterization of the biosorption of cadmium, lead and copper with the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Hazardous Materials*, 158: 316-323.
- Materassi, R.; Tredici, M.; Balloni, W. (1984). *Spirulina* culture in sea-water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19:384-386.
- Merrifield, M.A. y Merrifield, S.T. (2009). An anomalous recent acceleration of global sea level rise. *Journal of Climate*, 22: 5772-5781.
- Metting Jr, F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 477-489.
- Micheletti, E.; Colica, G.; Viti, C.; Tamagnini, P.; De Philippis, R. (2008). Selectivity in the heavy metal removal by exopolysaccharide-producing cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 88-94.
- Moheimani, N.R. y Borowitzka, M.A. (2006) Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) grown in outdoor raceway ponds. *Biotechnology and Bioengineering*, 96: 27-36.
- Molina Grima, E.; Martínez, M.E.; Sánchez, S.; García, F.; Contreras, A. (1991). Growth and biochemical composition with emphasis on the fatty acids of *Tetraselmis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 21-25.
- Molina Grima, E.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A.; Fernández Sevilla, J.M.; Ación Fernández, F.G.; Contreras Gómez, A. (1994). A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 61 (2): 167-173.
- Molina Grima, E.; Ación Fernández, G.; García Camacho, F.; Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of Biotechnology*, 70: 231-247.
- Molina Grima, E.; Fernández, J.; Ación F. G.; Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor desing for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 2: 113-131.
- Molina Grima, E.; Belarbia, E.-H.; Ación Fernández, F.G.; Robles Medina, A.; Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20: 491-515.

- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review in Microbiology*, 3: 371-394.
- Moreno, J.; Vargas, M.A.; Fontes, A.G.; Guerrero, M.G.; Losada, M. (1987) Effect of several parameters on the productivity of a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. In Terol S (ed.), *Proceedings of the 1986 International Congress on Renewable Energy Sources*, vol. 1, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 206-211.
- Moreno, J.; Rodríguez, H.; Vargas, M.A.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. (1995). Nitrogen-fixing cyanobacteria as source of phycobiliprotein pigments. Composition and growth performance of ten filamentous heterocystous strains, *Journal of Applied Phycology*, 7: 17-23.
- Moreno, J.; Vargas, M.A.; Olivares, H.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. (1998). Exopolysaccharide production by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047 in batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*, 60: 175-182.
- Moreno, J.; Vargas, M.A.; Madiedo, J.M.; Muñoz, J.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. (2000) Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biotechnology and Bioengineering*, 67 (3): 283-290.
- Moreno, J.; Vargas, M.A.; Rodríguez, H.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. (2003). Outdoor cultivation of a nitrogenous fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biomolecular Engineering*, 20: 191-197.
- Moreno Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99: 3949-3964.
- Moreno-Garrido, I.; Campana, O.; Lubián, L.M.; Blasco, J. (2005). Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, 51: 823-929.
- Morin, A. (1998). Screening of polysaccharides-producing microorganisms, factors influencing the production, and recovery of microbial polysaccharides. *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. Dumitriu, S. E. New York, Marcel Dekker, Inc. 8: 275-296.
- Mulkidjanian, A. Y.; Koonin, E. V.; Makarova, K.S.; Mekhedov, S.L.; Sorokin, A.; Wolf, Y.I.; Dufresne, A. Partensky, F.; Burd, H.; Kaznadzey, D.; Haselkorn, R.; Galperin, M.Y. (2006). The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 103 (35): 13126-13131.
- Nguyen, M.T.; Choi, S.P.; Lee, J.W.; Lee, J.H.; Sim, S.J. (2009). Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19 (2): 161-166.
- Nicolaus, B.; Panico, A.; Lama, L.; Romano, I.; Manca, M.C.; De Giulio, A.; Gambacorta, A. (1999). Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry*, 52: 639-647.

- Nordberg, G.F.; Herber R.F.M.; Alessio, L. (1993). Cadmium in the human environment: toxicity and carcinogenicity, IARC Scientific Publications.
- Nriagu, J.O. y Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water, and soils by trace elements. *Nature*, 333: 134-139.
- Nunnery, J.K.; Mevers, E.; Gerwick, W.H. (2010). Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 787-793
- Nurdogan, Y. y Oswald, W.J. (1996). Tube settling of high-rate pond algae. *Water Science Technology*, 33: 229-241.
- Ogbonda, K.H.; Aminigo, R.E.; Abu, G.O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, 98: 2207-2211.
- Olmedilla, B.; Granada, F.; Blanco, I.; Vaquero, M. (2003). Lutein, but not α -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo- controlled pilot study. *Nutrition* 19: 21-24.
- Ono, E. y Cuello, J. L. (2003). Selection of optimal microalgae species for CO₂ sequestration. *Proceedings 2nd Annual Conference on Carbon Sequestration*, Alexandria, 1-7.
- Oren, A. y Shilo, M. (1979). Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*: sulfur respiration and lactate fermentation. *Archives of Microbiology*, 122: 77-84.
- Otero, A. y Vincenzini, M. (2003). Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology*, 102: 143-152.
- Otero, A. y Vincenzini, M. (2004). *Nostoc* (Cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *Journal of Phycology*, 40: 74-81.
- Ozturk, S.; Aslim, B.; Suludere, Z. (2010). Cadmium(II) sequestration characteristics by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource Technology*, 101: 9742-9748.
- Padan, E. y Cohen, Y. (1982). Anoxygenic photosynthesis, en *The biology of cyanobacteria*. Ed. Carr, N.G. y Whitton, B.A., Blackwell Scientific Publications, University of California (p. 215-235).
- Padroni, P.M.; Lamenti, G.; Prospero, G.; Ritorto, L.; Scolla, G.; Capuano, F.; Valdiserri, M. (2005). En *Greenhouse gas control technologies*, vol II (Wilson M, Morris T, Gale J, Thambimuthu, eds.) 1037-1042.
- Painter, T. J. (1993). Carbohydrate polymers in desert reclamation-the potential of microalgal biofertilizers. *Carbohydrate Polymers*, 20: 77-86.
- Pajdak-Stós, A.; Fialkowska, E.; Fyda, J. (2001). *Phormidium autumnale* (Cyanobacteria) defense against three ciliate grazer species. *Aquatic Microbial Ecology*, 23: 237-244.

- Pandey, P.K.; Saxena, R.K.; Bisen, P.S. (2002). Immobilization results in sustained calcium transport in *Nostoc calcicola* Bréb. *Current Microbiology*, 44: 173-177.
- Panoff, J.-M.; Priem, B.; Morvan, H.; Joset, F. (1988). Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714. *Archives of Microbiology*, 150: 558-563.
- Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 637-669.
- Payer, H.D.; Chiemvichak, Y.; Hosakul, K.; Kongpanichkul, C.; Kraidej, L.; Nguitragul, M.; Reungmanipytoon, S.; Buri, P. (1980). Temperature as an important climatic factor during mass production of microscopic algae, en *Algae biomass*. Ed: Shelef G. y Soeder, C.J. (389-399). Elsevier-Nort-Holland.
- Pedroni, P. M.; Lamenti, G.; Prospero, G.; Ritorto, L.; Scolla, G.; Capuano, F.; Valdiserri, M. (2004). EniTecnologie R&D Project on Microalgae Biofixation of CO₂: Outdoor Comparative Tests of Biomass Productivity using Flue Gas CO₂ from a NGCC Power Plant. *Proceedings of the 7th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies*, 5-9 September 2004, Vancouver, Canada.
- Pedrosa Bezerra, R.; Ortiz Montoya, E.Y.; Sato, S.; Perego, P.; Monteiro de Carvalho, J.C.; Converti, A. (2011). Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. A kinetic Monod-type approach. *Bioresource Technology*, 102: 3215-3219.
- Pereira, S.; Zille, A.; Micheletti, E.; Moradas-Ferreira, P.; De Philippis, R.; Tamagnini, P. (2009). Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (5): 917-941.
- Piorreck, M. y Pohl, P. (1984). Formation of biomass, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids in green and blue-green algae during one growth phase. *Phytochemistry*, 23: 217-223.
- Pirt, S.J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. John Pirt (Ed.) Blackwell Scientific Publications.
- Posten, C. y Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels- a process view. *Journal of Biotechnology*, 142 (1): 64-69.
- Postius, C.; Ernst, A.; Renter, U.; Boger, P. (1996). Persistence and genetic diversity among strains of phycoerythrin-rich cyanobacteria from the picoplankton of Lake Constance. *Journal of Plankton Research*, 18: 1159-1166.
- Potts, M. (1999). Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 34: 319-328.
- Pradhan, S. y Rai, L.C. (2000). Optimization of flow rate, initial metal ion concentration and biomass density for maximum removal of Cu²⁺ by immobilized *Microcystis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16: 579-584.
- Pulz, O.; Gerbsch, N.; Buchholz, R. (1995). Light energy supply in plate-type and light diffusing optical fiber bioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 7: 145-149.

- Pulz, O. y Scheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 59: 123-152.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 287-293.
- Pulz, O. y Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 635-648.
- Pushparaj, B.; Pelosi, E.; Torzillo, G.; Materassi, R. (1993). Microbial biomass recovery using a synthetic cationic polymer. *Bioresource Technology*, 43: 59-62.
- Putt, R.; Singh, M.; Chinnasamy, S.; Das, K.C. (2011). An efficient system for carbonation of high-rate algae pond water to enhance CO₂ mass transfer. *Bioresource Technology*, 102 (3): 3240-3245.
- Quesada, A.; Vincent, W.F.; Lean, D.R.S. (1999). Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 315-323.
- Raghukumar, C.; Vipparthy, V.; David, J.; Chandramohan, D. (2001). Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 433-436.
- Rangsayatorn, N.; Upatham, E.S.; Kruatrachue, M.; Pokethitiyook, P.; Lanza, G.R. (2002). Phytoremediation potential of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*: bio-sorption and toxicity studies of cadmium. *Environmental Pollution*, 119: 45-53.
- Rangsayatorn, N.; Pokethitiyook, P.; Upathamb, E.S.; Lanzac, G.R. (2004). Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel. *Environment International*, 30: 57-63.
- Rao, K.K. y Hall, D.O. (1984). Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems. *Trends in Biotechnology*, 2: 124-129
- Rao, S. y Riahi, K. (2006). The role of non-CO₂ greenhouse gases in climate change mitigation: long-term scenarios for the 21st century. *Energy Journal*, 3: 177-200.
- Reboloso Fuentes, M.M.; García Sánchez, J.L.; Fernández Sevilla, J.M.; Ación Fernández, F.G.; Sánchez Pérez, J.A.; Molina Grima, E. (1999). Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Journal of Biotechnology*, 70: 271-288.
- Reboloso Fuentes, M. M.; Navarro-Pérez, A.; García-Camacho, F.; Ramos Miras, J. J.; Guil-Guerrero, J. L. (2001). Biomass Nutrient Profiles of the Microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2966-2972.
- Richmond, A.; Lichtenberg, E.; Stahl, B.; Vonshak, A. (1990). Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. *Journal of Applied Phycology*, 2: 195-206
- Richmond, A. y Cheng-Wu, Z. (2001). Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. *Journal of Biotechnology*, 85: 259-269.

- Richmond, A. y Hu, Q. (1997). Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-65: 649-658.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycolgy*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M.; Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111: 1-61.
- Robinson, P.K.; Mak, A.L.; Trevan, M.D. (1986). Immobilized algae: a review. *Process Biochemistry*, August: 122–126.
- Robles Medina, A., Molina Grima, E., Giménez Giménez, A., Ibáñez González, M. J. (1998). Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 16: 517-580.
- Rodolfi, L.; Chini Zittelli, G.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102: 100-112.
- Romo, S. y Pérez Martínez, C. (1997). The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. *Journal of Phycology*, 33: 1073-1076.
- Roux, J.M. (1996). Production of polysaccharide slime by microbial mats in the hypersaline environment of a Western Australian solar saltfield. *International Journal of Salt Lake Research*, 5: 103-130.
- Rubin, E.S.; Cooper, R.N.; Frosch, R.A.; Lee, T.H.; Marland, G.; Rosenfeld, A.H.; Stine, D.D. (1992). Realistic mitigation options for global warming. *Science*, 10: 148-266.
- Saeed, A. e Iqbal, M. (2006). Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 775-782.
- Sánchez Mirón, A.; Contreras Gómez, A.; García Camacho, F.; Molina Grima, E.; Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, 70: 249-270.
- Sánchez, F.; Fernández, J.M.; Acién, F.G.; Rueda, A.; Pérez-Parra, J.; Molina, E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43 (4): 398-405.
- Sarmiento, J.L y Gruber, N. (2002). Sinks for anthropogenic carbon. *Physics Today*, 30-36.
- Schaeffer D.J. y Krylov, V.S. (2000). Anti-HIV activity of extracts and compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 208-227.

- Serreze, M.C.; Holland, M.M.; Stroeve, J. (2007). Perspectives on the Arctic's shrinking sea-ice cover. *Science*, 315: 1533-1536.
- Shah, V.; Garg, N.; Madamwar, D. (2000) Characterization of the exopolysaccharide produced by a marine cyanobacterium *Cyanothece* sp. *Current Microbiology*, 40: 274-278.
- Shahidi, F.; Metusalach; Brown, J.A. (1998). Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science*, 38 (1): 1-67.
- Sharma, N.K.; Tiwari, S.P.; Tripathi, K.; Rai, A.K. (2010). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-010-9626-3
- Shashirekha, S.; Uma, L.; Subramanian, G. (1997). Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 130-133.
- Schiller, H., H. Senger, Miyashita, H.; Miyachi, S.; Dau, H. (1997). Light-harvesting in *Acaryochloris marina*-spectroscopic characterization of a chlorophyll d-dominated photosynthetic antenna system. *FEBS Letters*, 410 (2-3): 433-436.
- Sheng, P.X.; Ting, Y.-P.; Chen, J.P.; Hong, L. (2004). Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 131-141.
- Sierra, E.; Ación, F.G.; Fernández, J.M.; García, J.L.; González, C.; Molina, E. (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 138: 136-147.
- Singh, S.; Arad, S.; Richmond, A. (2000). Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors. *Journal of Applied Phycology*, 12: 269-275.
- Singh, S. y Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98: 2243-2257.
- Skjånes, K.; Lindblad, P.; Muller, J. (2007). BioCO₂-A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. *Biomolecular Engineering*, 24: 405-413.
- Slegers, P.M.; Wiffels, R.H.; van Straten, G.; van Boxtel, A.J.B. (2011). Design scenarios for flat panel photobioreactor. *Applied Energy*. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.37
- Smith, I.H. y Pace, G.W. (1982). Recovery of microbial polysaccharides. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 32: 119-129.
- Sobczuk, M.T.; García Camacho, F.; Camacho Rubio, F.; Ación Fernández, F.G.; Molina Grima, E. (2000). Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 67 (4): 465-475.
- Solovchenko, A.E.; Khozin-Goldberg, I.; Didi-Cohen, S.; Cohen, Z.; Merzlyak, M.N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty

- acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20: 245-251.
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 87-96.
- Stacey, G.; Van Baalen, C.; Tabita, F.R. (1977). Isolation and characterization of a marine *Anabaena* sp. capable of rapid growth on molecular nitrogen. *Archives of Microbiology*, 114: 197-201.
- Stewart, W.D.P.; Fitzgerald, G.P.; Burris, R.H. (1967). In situ studies on N₂-fixation using the acetylene reduction technique. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, 58: 2071-2078.
- Su, C.; Zhenming, C.; Weidong, Lu. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece* sp. 113. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 25: 411-417.
- Sudo, H.; Burgess, J.G.; Takemasa, H.; Nakamura, N.; Matsunaga, T. (1995). Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*. *Current Microbiology*, 30: 219-222.
- Summons, R. E., Jahnke, L. L.; Hope J.M.; Logan, G.A. (1999). 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature*, 400 (6744): 554-557.
- Sun, L.; Wang, C.; Ma, C.; Shi, L. (2010). Optimization of renewal regime for improvement of polysaccharides production from *Porphyridium cruentum* by uniform design. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 33: 309-315.
- Sutherland, I.W. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides en Cambridge studies in biotechnology*, vol 9. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Thajuddin, N. y Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*, 89: 47-57.
- Thomas, C.D.; Cameron, A.; Green, R.E.; Bakkenes, M.; Beaumont, L.J.; Collingham, Y.C.; Erasmus, B.F.N.; Ferreira de Siqueira, M.; Grainger, A.; Hannah, L.; Hughes, L.; Huntley, B.; van Jaarsveld, A.S.; Midgley, G.F.; Miles, L.; Ortega-Huerta, M.A.; Townsend Peterson, A.; Philips, O.L.; Williams, S.E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427: 145-148.
- Ting, C. S.; Rocap, G.; King, J.; Chisholm, S.W. (2002). Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends in Microbiology*, 10 (3): 134-142.
- Ting, C. S.; Ramsey, M.E.; Wang, Y.L.; Frost, A.M.; Jun, E.; Durham, T. (2009). Minimal genomes, maximal productivity: comparative genomics of the photosystem and light-harvesting complexes in the marine cyanobacterium, *Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research*, 101(1): 1-19.
- Torzillo, G.; Carlozzi, P.; Pushparaj, B.; Montaini, E.; Materassi, R. (1993). A two plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(7):891-498.

- Travieso, L.; Benitez, F.; Weiland, P.; Sánchez, E.; Dupeyrón, R.; Domínguez, A.R. (1996). Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresource Technology*, 55: 181-186.
- Travieso, L.; Cañizares, R. O.; Borja, R.; Benítez, F.; Domínguez, A.R.; Dupeyrón, R.; Valiente, V. (1999). Heavy metal removal by microalgae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62:144-151.
- Travieso, L.; Hall, D.O.; Rao, K.K.; Benitez, F.; Sánchez, E.; Borja, R. (2001). A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47: 151-155.
- Tredici, M.R. y Materassi, R. (1992). From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in the development of reactors for the mass cultivation of phototrophic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*, 4: 221-231.
- Tredici, M.R. y Rodolfi, L. (2004). Reactor for industrial culture of photosynthetic microorganisms. World patent WO 2004/074423 A2 (Università degli Studi di Firenze, Italia).
- Tredici, M.R. y Zittelli, G.C. (1998). Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (2): 187-197.
- Tsezos, M. (1986). Adsorption by microbial biomass as a process for removal of ions from process or waste solutions. In *Immobilization of Ions by Biosorption*, eds. Eccles H.H. & Hunt S. pp. 200-209, Chichester: Ellis Horwood Publication.
- Uduman, N.; Qi, Y.; Danquah, M.K. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2: 012701.
- Ugwu, C.U.; Ogbonna, J.C.; Tanaka, H. (2002). Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photo- bioreactors by installation of internal static mixers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 600-607.
- Ugwu, C.U.; Aoyagi, H.; Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99: 4021-4028.
- Urrutia, I.; Serra, J.L.; Llama, M.J. (1995). Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 200-205.
- Vaishampayan, A.; Sinha, R.P.; Hader, D.P.; Dey, T.; Gupta, A.K.; Bhan, U.; Rao, A.L. (2001). Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *The botanical review*, 67 (4): 453-516.
- Van Bergeijk, S.A.; Salas-Leiton, E.; Cañavate, J.P. (2010). Low productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis* aff. *galbana* (T-iso) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquacultural Engineering*, 43: 14-23.
- Vargas, M.A.; Rodríguez, H.; Moreno, J.; Olivares, H.; Del Campo, J.A.; Rivas, J.; Guerrero M.G. (1998). Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 34: 812-817.

- Vidal, R. (2009). Tesis doctoral: Producción fotosintética de etanol por la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Vincenzini, M.; De Philippis, R.; Sili, C.; Materassi, R. (1993). Stability of molecular and theological properties of the exopolysaccharide produced by *Cyanospira capsulata* cultivated under different growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, 5: 539-541.
- Vinnikov, K.Y.; Robock, A.; Stouffer, R.J.; Walsh, J.E.; Parkinson, C.L.; Cavalieri, D.J.; Mitchell, J.F.B.; Garrett, D.; Zakharov, V.F. (1999). Global warming and northern hemisphere sea ice extent. *Science*, 286: 1934-1937.
- Volesky, B. y Holan, Z.R. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, 11: 235-250.
- Volk, R.B.; Venke, K.; Blaschek, W. (2007). Structural investigation of a polysaccharide released by the cyanobacterium *Nostoc insulare*. *Journal of Applied Phycology*, 19: 255-262.
- Vonshak, A.; Boussiba, S.; Abeliovich, A.; Richmond, A. (1983). Production of *Spirulina* biomass: Maintenance of monoalgal culture outdoors. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 341-349.
- Vonshak, A. y Novoplansky, N. (2008). Acclimation to low temperature of two *Arthrospira platensis* (Cyanobacteria) strains involves down-regulation of PSII and improved resistance to photoinhibition. *Journal of Phycology*, 44: 1071-1079.
- Vunjak-Novakovic, G.; Kim, Y.; Wu, X.; Berzin, I.; Merchuk, J.C. (2005). Air-Lift Bioreactors for Algal Growth on Flue Gas: Mathematical Modeling and Pilot-Plant Studies. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44: 6154-6163.
- Walsby, A.E. (1968). Mucilage secretion and the movements of blue-green algae. *Protoplasma*, 65: 223-238.
- Wang, B; Li, Y.; Wu, N.; Lan, C.Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 707-718.
- Watanabe, I. y Liu, C.C. (1992). Improving nitrogen-fixing systems and integrating them into sustainable rice farming. *Plant and Soil*, 141: 57-67.
- Watson, R.T.; Noble, I.R.; Bolin, B.; Ravindranath, N. H.; Verardo, D.J.; Dokken, D.J. (2000). IPCC, Land Use, Land-Use Change, and Forestry. Ed Cambridge University Press, UK.
- Whitton, B.A. y Potts, M. (2000). The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space (1-11). Ed: Whitto, B.A. y Potts, M. Kluwer Academics Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Wilde, E.W. y Benemann, J.R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*, 11: 781-812.
- Williams, P.J. le B. y Laurens, L.M.L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environmental Science*, 3: 554-590.

- Winter, C.; Winter, M.; Pohl, P. (1994). Cadmium adsorption by non-living biomass of the semi-macroscopic brown alga, *Ectocarpus siliculosus*, grown in axenic mass culture and localisation of the adsorbed Cd by transmission electron microscopy. *Journal of Applied Phycology*, 6: 479-487.
- Witvrouw, M. y De Clercq, E. (1997). Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology*, 29 (4): 497-511.
- Wu, Z.Y. y Shi, X.M. (2008). Rheological properties of *Chlorella pyrenoidosa* culture grown heterotrophically in a fermentor. *Journal of Applied Phycology*, 20: 279-282.
- Xiankong, Z.; Haskell, J.B.; Tabita, F.R.; Van Baalen, C. (1983). Aerobic hydrogen production by the heterocystous cyanobacteria *Anabaena* spp. Strain CA and 1F. *Journal of Bacteriology*, 156 (3): 1118-1122.
- Yang, Z.; Kong, F.; Shi, X.; Zhang, M.; Xing, P.; Cao, H. (2008). Changes in the morphology and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) during flagellate grazing. *Journal of Phycology*, 44: 716-720.
- Yu, H; Jia, S.; Dai, Y. (2010). Accumulation of exopolysaccharides in liquid suspension culture of *Nostoc flagelliforme* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 552-560.
- Zhang, K.; Miyachi, S.; Kurano, N. (2001). Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 428-433.
- Zhou, L.-C.; Li, Y.-F.; Bai, X.; Zhao, G.H. (2009). Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove Cu(II) from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1-3): 1106-1113.
- Zou, N. y Richmond, A. (1999). Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biotechnology*, 70: 351-356.
- Zulpa de Caire, G.; Storni de Cano, M.; Zaccaro de Mule, M.C.; Palma, R.M.; Colombo, K. (1997). Exopolysaccharide of *Nostoc muscorum* (Cyanobacteria) in the aggregation of soil particles. *Journal of Applied Phycology* 9: 249-253.

Páginas Web

Directiva europea 76/464/EEC (Comisión Europea de Medio Ambiente)
<http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/list1.htm>

Eurofoam: www.redon.hu/eurofoam/angol/ipari.html

Informe EPA 40 CFR (Environmental Protection Agency). National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants: Final Standards for Hazardous Air Pollutants for Hazardous Waste Combustors (Phase I Final Replacement Standards and Phase II). <http://www.epa.gov/wastes/laws-regs/state/revision/frs/fr212.pdf>

Protocolo de Kyoto (1998). Artículo 2, 1 a iv. Texto en español del protocolo disponible en la página web: <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf>

National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA research. (U.S. Department of Commerce): <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>

