



**UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA**

**Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente**

**Puesta en marcha de un cultivo de  
microalgas para la eliminación de  
nutrientes de un agua residual urbana  
previamente tratada anaeróbicamente.**

**Ana Ruiz Martínez**

**Abril 2011**

**Director: José Ferrer Polo**







# Contenido

<b>I. Objetivos</b>	7
<b>II. Introducción</b>	9
1. Las microalgas	9
1.1. Tipos y características	10
1.2. Función fotosintética	14
1.3. ¿Por qué hay interés en las microalgas?	16
1.3.1. Energía	16
1.3.2. Depuración	21
1.3.3. Otros productos	22
2. Producción de microalgas	24
2.1. Estanques	24
2.2. Fotobiorreactores	25
2.3. Crecimiento	29
2.3.1. Luz	29
2.3.2. Nutrientes	31
2.3.3. Salinidad	34
2.3.4. pH	34
2.3.5. Oxígeno	34
2.3.6. Agitación	35
2.3.7. Temperatura	35
3. Separación y post-tratamiento de las algas producidas	36
3.1. Separación	36
3.2. Post-tratamiento	37
4. Barreras y avances en la producción de microalgas	37
<b>III. Algas en depuración. Aplicación e investigación</b>	39
1. Historia	39
2. Lagunaje	40
3. Empleo de algas fijadas	40
4. Capacidad de las algas de eliminar otros compuestos	41
5. Eliminación por bioadsorción y precipitación	42
6. Revisión de ensayos	43

6.1.	Agua residual artificial	43
6.2.	Agua residual real	44
6.2.1.	Agua residual urbana	44
6.2.2.	Agua residual de explotaciones ganaderas y agrícolas	45
6.2.3.	Agua residual industrial	45
<b>IV.</b>	<b>Sistema de depuración propuesto</b>	<b>47</b>
1.	Introducción: agua residual urbana. Combinación de tratamiento anaerobio y cultivo de microalgas	47
2.	Planta piloto: biorreactor de membranas anaerobio	48
3.	Proceso de post-tratamiento propuesto	51
<b>V.</b>	<b>Puesta en marcha de un fotobiorreactor en el laboratorio</b>	<b>53</b>
1.	Objetivo	53
2.	Descripción del montaje	53
2.1	Sistema de concentración inicial del cultivo	54
2.2	Fotobiorreactor	54
3.	Métodos analíticos	57
4.	Procedimiento experimental	65
4.1.	Toma de muestras para la obtención de microalgas (I)	65
4.2.	Puesta en marcha del cultivo en el laboratorio (I)	66
4.3.	Toma de muestras (II)	68
4.4.	Concentración de las microalgas mediante filtración	69
4.5.	Cultivo de microalgas. Batch y semicontinuo	70
5.	Resultados obtenidos	71
5.1.	Batch	71
5.2.	Operación en semicontinuo	74
6.	Conclusiones	90
<b>VI.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>93</b>

## Indice de tablas

<i>Tabla 1: Datos de digestión anaerobia</i>	20
<i>Tabla 2: Microalgas empleadas en la degradación de diversos contaminantes</i>	22
<i>Tabla 3: Estado de la producción de microalgas para “otros usos” en 2010</i>	23
<i>Tabla 4: Productividades de biomasa en fotobiorreactores</i>	27
<i>Tabla 5: Características del agua de entrada y salida a la planta piloto AnBRM</i>	51
<i>Tabla 6: Sondas generales para identificación de bacterias nitrificantes y metanotróficas</i>	61
<i>Tabla 7: Volúmenes necesarios de formamida y agua mili-Q</i>	63
<i>Tabla 8: Toma de muestras inicial. Recuento aproximado de microorganismos</i>	65
<i>Tabla 9: Toma de muestras inicial. Recuento exhaustivo</i>	66
<i>Tabla 10: Concentraciones de nutrientes en el reactor a <math>t=t_i</math> y en la salida puntual</i>	68
<i>Tabla 11: Toma de muestras II. Recuento exhaustivo</i>	69
<i>Tabla 12: Planificación del cultivo</i>	70
<i>Tabla 13: Seguimiento de la concentración de nutrientes durante el cultivo batch</i>	71
<i>Tabla 14: Características del agua influente al cultivo de microalgas</i>	74
<i>Tabla 15: Características del agua efluente del cultivo de microalgas</i>	75
<i>Tabla 16: Nutrientes eliminados</i>	76
<i>Tabla 17: Fósforo suspendido y soluble eliminados. pH del cultivo</i>	78
<i>Tabla 18: Valores de clorofila medidos en el cultivo</i>	82
<i>Tabla 19: Sólidos suspendidos totales y volátiles</i>	82
<i>Tabla 20: Contenido en clorofila de la biomasa</i>	83
<i>Tabla 21: Recuento exhaustivo de microorganismos en el cultivo tras 34 días</i>	84

## Indice de figuras

<i>Fig. 1: Spirulina o Arthrospira</i>	11
<i>Fig. 2: Anabaena</i>	11
<i>Fig. 3: Pediastrum</i>	12
<i>Fig. 4: Scenedesmus</i>	12
<i>Fig. 5: Clorofíceas clorococales</i>	13
<i>Fig. 6: Clorofíceas volvocales</i>	13
<i>Fig. 7: Diatomeas penadas y céntrica</i>	14
<i>Fig. 8: Estructura de la clorofila a</i>	15
<i>Fig. 9: Espectro de absorción de la clorofila a y b</i>	16
<i>Fig. 10: Esquema de un canal de cultivo de microalgas</i>	25
<i>Fig. 11: Configuraciones de fotobiorreactores</i>	28
<i>Fig. 12: Esquema de varios tipos de fotobiorreactores</i>	28

<i>Fig. 13: Productividad en un reactor plano en función de la densidad del cultivo</i>	31
<i>Fig. 14: Productividad de Chlorococccum littorale</i>	31
<i>Fig. 15: Consumo de dióxido de carbono (mg/L·d) por varias especies de microalgas</i>	32
<i>Fig. 16: Diagrama de flujo de la planta piloto</i>	49
<i>Fig. 17: Diagrama de flujo del tratamiento propuesto</i>	52
<i>Fig. 18: Montaje de laboratorio para concentración inicial de la muestra</i>	54
<i>Fig. 19: Membrana empleada</i>	55
<i>Fig. 20: Disposición del sistema de iluminación</i>	56
<i>Fig. 21: Alimentación del fotobiorreactor con el agua efluente del AnBRM</i>	56
<i>Fig. 22: Obtención del efluente del cultivo de microalgas mediante filtración</i>	57
<i>Fig. 23: Smartchem</i>	57
<i>Fig. 24: Cultivo de la muestra tomada</i>	67
<i>Fig. 25: Seguimiento del OD y pH tras alimentar 1300 mL</i>	67
<i>Fig. 26: Reactor tras la concentración por filtración y aclimatación</i>	69
<i>Fig. 27: Concentración de nutrientes en el reactor durante el primer batch</i>	72
<i>Fig. 28: pH y oxígeno disuelto en el reactor durante el primer batch</i>	73
<i>Fig. 29: Concentración de clorofila durante el primer batch</i>	73
<i>Fig. 30: Fósforo suspendido, fosfato eliminado y pH máximo en el cultivo</i>	78
<i>Fig. 31: Seguimiento de pH y OD. Semana con alimentación 600mL/d</i>	79
<i>Fig. 32: Seguimiento de pH y OD. Semana con alimentación 800mL/d</i>	80
<i>Fig. 33: Seguimiento de pH y OD. Semana con alimentación 1000mL/d</i>	80
<i>Fig. 34: Seguimiento de pH y OD. Semana con alimentación 1500mL/d</i>	81
<i>Fig. 35: Evolución de la clorofila durante el cultivo en semicontinuo</i>	81
<i>Fig. 36: 07/02/2011. Muestra de la Albufera concentrada</i>	85
<i>Fig. 37: Muestra del fotobiorreactor durante el primer batch</i>	85
<i>Fig. 38: Muestra del fotobiorreactor durante proceso semicontinuo. 01/03/2011</i>	86
<i>Fig. 39: Muestra del fotobiorreactor durante proceso semicontinuo. 04/03/2011</i>	86
<i>Fig. 40: Muestra del fotobiorreactor durante proceso semicontinuo. 11/03/2011</i>	87
<i>Fig. 41: Muestra del fotobiorreactor durante proceso semicontinuo. 21/03/2011</i>	87
<i>Fig. 42: Imagen en contraste de fases y en epifluorescencia de muestras sin hibridar</i>	88
<i>Fig. 43: Positivos para amoniooxidantes Gram - , muestra del 01/03/2011</i>	89
<i>Fig. 44: Positivos para amoniooxidantes Gram - , muestra del 01/03/2011</i>	89
<i>Fig. 45: Positivos para metanotróficas, Gram - , muestra del 01/03/2011</i>	89



**Puesta en marcha de un cultivo de  
microalgas para la eliminación de  
nutrientes de un agua residual urbana  
previamente tratada anaeróbicamente.**

**Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente  
Universidad Politécnica de Valencia**

**Ana Ruiz Martínez  
Abril 2011**



# I. Objetivos

El presente trabajo describe la puesta en marcha de un fotobiorreactor a escala de laboratorio para el cultivo de microalgas.

El objetivo de dicho montaje es comprobar la viabilidad de un cultivo de microalgas autóctonas en condiciones controladas de luz, temperatura y nutrientes. Este cultivo se lleva a cabo de modo que el aporte de nutrientes se realiza a partir del agua efluente de un sistema de tratamiento anaerobio de aguas residuales ya existente. La característica principal de dicha agua es la presencia de nutrientes minerales (nitrógeno y fósforo) y un bajo contenido en materia orgánica, lo que lo hace en principio apropiado para un post-tratamiento mediante el cultivo de microalgas propuesto.

En un primer apartado del trabajo se introducen algunos conceptos básicos relacionados con las microalgas, con los sistemas de producción actuales y con sus posibles aplicaciones. A continuación se detalla la información sobre su posibilidad en el campo del tratamiento de aguas, para finalmente presentar el fotobiorreactor montado en el laboratorio y los resultados obtenidos.



## II. Introducción

### 1. Las microalgas

Bajo el término de *microalga* se incluyen aquellos microorganismos unicelulares capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. En esta categoría quedan agrupadas las cianobacterias (conocidas tradicionalmente como algas verdeazuladas) junto con algas eucariotas (tradicionalmente algas verdes, rojas y doradas).

Las microalgas son en general organismos fotoautótrofos, es decir, obtienen la energía de la luz proveniente del Sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono. Según esto, la producción de microalgas se divide en:

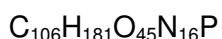
- Fotoautótrofa: las algas obtienen la energía del Sol y el carbono de compuestos inorgánicos (sales). Son a las que nos referiremos principalmente en este trabajo.
- Fotoheterótrofa: obtienen la energía del Sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- Mixotrófica: muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo obtienen por tanto de compuestos orgánicos y de CO<sub>2</sub>. Algunas de estas algas son la *Spirulina platensis* o la *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Heterótrofa: los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono. Es decir, existen en efecto algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, como por ejemplo *Chlorella protothecoides*.

La producción fotoautótrofa de algas (para uso distinto al energético) es actualmente la única técnica y económicamente viable a gran escala (Brennan 2010)

La **composición** de las microalgas (contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable, y puede ser manipulada mediante varios parámetros durante el proceso de su cultivo. Depende obviamente también de la especie considerada. En general, las cianobacterias tienen un contenido de hasta 20% en lípidos, mientras que el contenido lipídico de las algas procariontas oscila entre un 20 y 50% en peso seco.

La relación C:N para las microalgas varía entre 6 y 9 dependiendo de las especies.

Como fórmula molecular de las microalgas se puede emplear, a modo general, la siguiente, propuesta por Grobbelaar (2004):



de donde se deduce que un kilogramo de microalgas contendría:

- 523,9 g de carbono
- 74,5 g de hidrógeno
- 296,5 g de oxígeno
- 92,2 g de nitrógeno
- 12,76 g de fósforo

Un estudio de Ras et al (2011) da el siguiente contenido en un kilogramo de algas en masa seca:

- 367 g de carbono
- 61 g de nitrógeno
- 8,1 g de fósforo
- 6,6 g de potasio

A partir de lo que se puede deducir el grado de variabilidad en la composición de las microalgas estudiadas. El mismo estudio emplea un factor de conversión entre 5,1 y  $7,7 \cdot 10^9$  células/g DQO y un valor de 1,33-1,43 g DQO/g SSV

El **tamaño** de las algas eucariotas varía entre 0,5–30  $\mu\text{m}$  (Markou 2011), mientras que las cianobacterias pueden llegar a medir hasta 200  $\mu\text{m}$ .

Cabe destacar la comparación resultante entre las aproximadamente 250.000 especies de plantas verdes existentes en el planeta y los varios millones estimados de especies diferentes de microalgas.

## 1.1. Tipos y características

### Cianobacterias

Las **cianobacterias** o cianofíceas son un grupo extenso perteneciente al reino de las eubacterias. Son por tanto procariontes, es decir, no presentan un núcleo diferenciado sino que su material celular se concentra en una región del citoplasma denominada nucleoide. Pertenecen a la división de las cianofitas y son bacterias Gram negativas.

Las cianobacterias son organismos planctónicos sin motilidad propia, con diferencias morfológicas entre sí, y su presencia es común en medios extremos. Se desarrollan tanto en aguas dulces como salobres o salinas, y son capaces de producir grandes florecimientos conocidos como *blooms* cuando el medio presenta elevadas concentraciones de nutrientes. Estos *blooms* de cianobacterias indican por tanto que el medio está eutrofizado.

En general, como en el resto de microalgas, el hábitat y las necesidades ecológicas dependen del género o incluso de la cepa estudiada.

Las cianobacterias han sido tradicionalmente conocidas como algas verde-azuladas, debido a que, junto a la clorofila, contienen dos pigmentos accesorios (ficocianina y ficoeritrina) que le confieren su aspecto azul-verdoso.

*Spirulina platensis* es sin duda el género de cianobacteria más estudiado, por su importancia en alimentación y la producción de metabolitos. Otros géneros son *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Nadularia*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Nostoc*, *Nostochopsis* y *Scytonema*.

- *Spirulina*: Actualmente conocida como *Arthrospira*, tiene su rango de pH óptimo entre 9 y 10 y admite hasta pH 11,5, pero no se desarrolla a pH 7. Tras el aislamiento de diversas cepas y un estudio sobre su temperatura óptima de crecimiento, se ha llegado a la conclusión que para algunas ésta se sitúa entre 24-28°C mientras que para otras cepas el rango llega hasta 40-42°C. Su eficiencia de fijación de CO<sub>2</sub> puede llegar al 38%, siendo una de las más altas entre las microalgas. Se ha comprobado también que puede crecer en medios con alta carga orgánica, con hasta 10 g acetato/L, así como que es, junto con *Oscillatoria* y *Anabaena*, capaz de tomar como única fuente de nitrógeno el nitrógeno molecular N<sub>2</sub>, que emplea con la ayuda de la enzima nitrogenasa, reduciéndolo a amonio.



Fig. 1: *Spirulina* o *Arthrospira*

- *Anabaena* sp.: Su rango óptimo de pH se sitúa entre 7,4 y 8,4 y su productividad disminuye significativamente a pH mayores de 9. Sus velocidades de fijación de CO<sub>2</sub> llegan a 1,45 gCO<sub>2</sub>/L·d.



Fig. 2: *Anabaena*

- *Nostoc*: Cianobacteria de agua dulce. Forma colonias esféricas compuestas de filamentos (tricomas).

## Algas eucariotas

Las **clorofitas** o algas verdes son un grupo (división) importante de microalgas, que deben su color a la clorofila (sobre todo clorofila a y b), carotenoides y xantofilas presentes en su estructura. Son también capaces de provocar florecimientos o *blooms*. La clase más destacada de clorofitas son las clorofíceas, entre las que a su vez destacan los órdenes de las volvocales (organismos de agua dulce provistos de flagelos) y las clorococales (microorganismos desprovistos de flagelos). Destacamos algunas de las más estudiadas y que encontraremos en este trabajo más adelante:

- *Pediastrum*: clorofícea clorococal colonial con morfología muy característica.

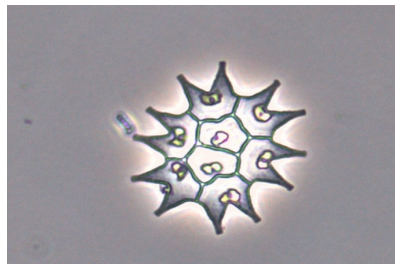


Fig. 3: *Pediastrum*

- *Scenedesmus*: clorofícea clorococal. Es un alga colonial, donde 2, 4 u 8 células alargadas se unen. A menudo presentan espinas en los extremos. Es común en aguas dulces y salobres en condiciones de nutrientes medio-altas. La relación óptima de nutrientes para este alga es N:P 16:1.

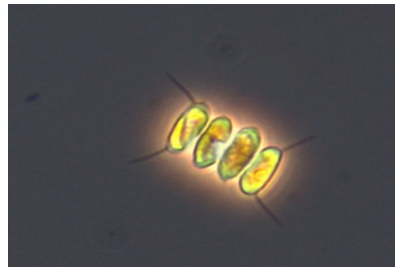


Fig. 4: *Scenedesmus*

- *Chlorella*: clorofícea clorococal especialmente conocida por su capacidad de eliminar nutrientes del agua. Se desarrolla por tanto en medios ricos en nutrientes. Es conocida por ser una de las microalgas de más rápido crecimiento. Es esférica y su diámetro oscila normalmente entre las 2 y 10  $\mu\text{m}$ . Contiene clorofila a y b.



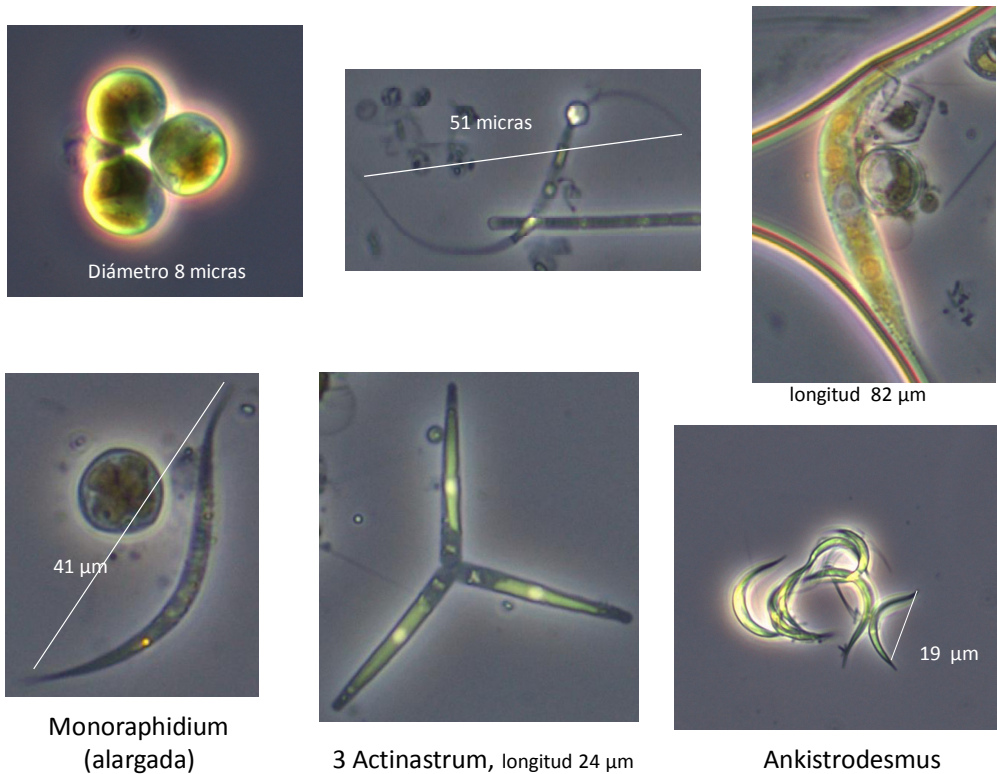


Fig. 5: Clorofíceas clorococales

- *Dunaliella salina*: clorofícea volvocal, se caracteriza por desarrollarse en medios de alta salinidad.

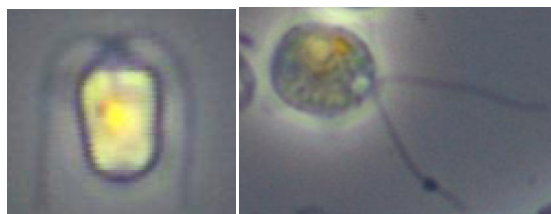


Fig. 6: Clorofíceas volvocales

Las **crisofitas** o algas doradas deben su color al enmascaramiento de la clorofila por parte del alto contenido en carotenos. Las diatomeas, algas que presentan una estructura silíceas, pertenecen a este grupo. Entre sus pigmentos fotosintéticos destacan la clorofila a y c y la fucoxantina (un carotenoide).

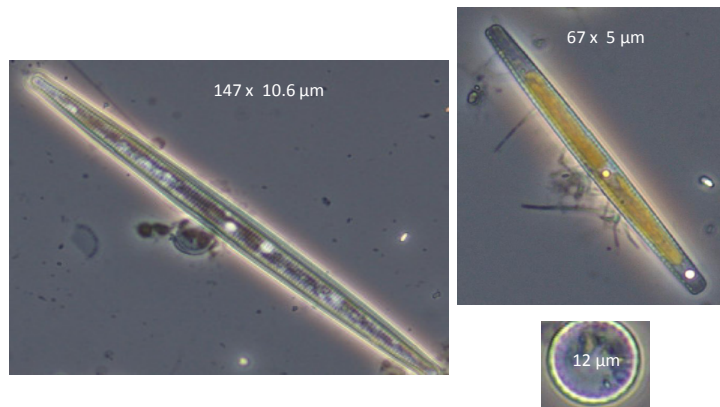


Fig. 7: *Diatomeas penadas y céntrica*

Las **rodofitas** o algas rojas son representativas del medio marino, encontrándose pocas en aguas dulces. Sus pigmentos fotosintéticos incluyen tres tipos de ficobilinas que les confieren su color característico.

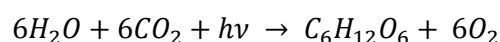
## 1.2. Función fotosintética

La fotosíntesis es un proceso llevado a cabo por organismos fotoautótrofos, que tienen la capacidad de sintetizar materia orgánica partiendo de la energía del Sol y la materia inorgánica. La importancia de este proceso no puede ser discutida, ya que la vida en la Tierra se mantiene fundamentalmente gracias a la fotosíntesis que realizan las algas en el medio acuático y las plantas en el medio terrestre, ya que éstas introducen los nutrientes minerales en la base de las cadenas tróficas de los ecosistemas, generando materia orgánica que es consumida por organismos superiores.

Las microalgas, como las cianobacterias y al igual también que las plantas verdes, emplean la energía de la luz del Sol para generar un oxidante lo suficientemente potente como para extraer del agua oxígeno, protones y electrones. Los electrones extraídos del agua reducen, en la **fase luminosa** de la fotosíntesis, el  $\text{NADP}^+$  a  $\text{NADPH}$ .

$\text{NADP}^+$  es la forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, una coenzima que interviene en numerosas vías anabólicas.  $\text{NADPH}$  es su forma reducida, que interviene en la **fase oscura** de la fotosíntesis (ciclo de Calvin) donde se reduce el  $\text{CO}_2$ . El  $\text{NADPH}$  actúa como transportador de energía, la cual se emplea finalmente en sintetizar macromoléculas orgánicas a partir de moléculas precursoras pequeñas.

La estequiometría del proceso fotosintético total, en el que se libera oxígeno molecular, es como sigue:



Donde  $h\nu$  representa la energía lumínica en función de su frecuencia  $\nu$  y la constante de Planck  $h$ . El proceso fotosintético de fijación de  $\text{CO}_2$  provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de  $\text{OH}^-$ .

En la actualidad se denomina a este proceso fotosíntesis oxigénica, y se diferencia de la fotosíntesis anoxigénica o bacteriana, llevada a cabo por las bacterias purpúreas y verdes del azufre. En este proceso, en el que no entraremos en mayor detalle, el dador de electrones es el sulfuro de hidrógeno, y consecuentemente, el elemento químico liberado no será oxígeno sino azufre. El azufre puede ser acumulado en el interior de la bacteria, o expulsado al agua.

Dentro de las células, la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos, unos orgánulos citoplasmáticos de color verde exclusivos de las células fotosintéticas. En una cámara en su interior se encuentra el estroma, un medio interno donde tienen lugar las reacciones oscuras del ciclo de Calvin. El estroma alberga componentes necesarios para la fotosíntesis, como la principal enzima responsable de la fijación del dióxido de carbono: la RBP-carboxilasa o RuBisCO. Es una proteína formada por 16 polipéptidos que cataliza la transformación del  $\text{CO}_2$  a una forma orgánica.

Por su parte, los **pigmentos fotosintéticos** se encuentran en la membrana de los tilacoides, unos sacos que son también llamados lamelas. Los pigmentos que absorben la luz solar son:

- Clorofila: La clorofila a es el pigmento involucrado directamente en la transformación de la energía lumínica en energía química. Absorbe en la región del rojo (650-700 nm) y azul (400-500 nm). Las células fotosintéticas casi siempre contienen un segundo tipo de clorofila, la clorofila b, con un espectro de absorción ligeramente diferente. También existe una clorofila c, la cual se puede hallar en algas pardas. El contenido de clorofila del alga fitoplanctónica es entre el 1 y 2% en peso seco. La relación clorofila:carbono varía por tanto bastante, dependiendo de la fase de crecimiento: desde menos de 1:100 a más de 3:100.
- Carotenoides, que absorben en la región del azul (400-500 nm) y se encuentran principalmente en las bacterias purpúreas. Se dividen en carotenos y xantofilas.

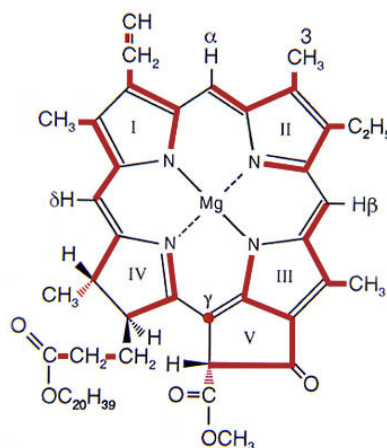


Fig. 8: Estructura de la clorofila a

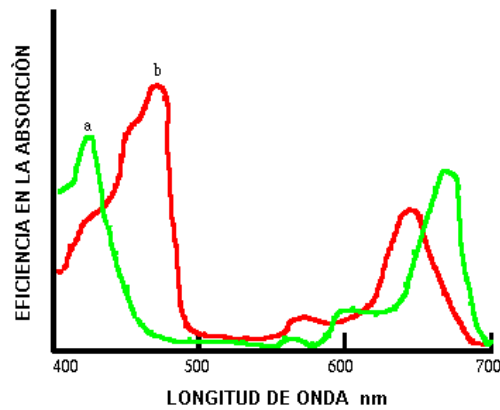


Fig. 9: Espectro de absorción de la clorofila a y b

- Ficobilinas, que absorben en la región anaranjada del espectro (600-650). Se encuentran presentes sólo en las cianobacterias y las algas rojas.

### 1.3. ¿Por qué hay interés en las microalgas?

El cultivo de algas ha sido objeto de estudio durante las últimas décadas debido al interés suscitado tanto por su capacidad para combatir el efecto invernadero (eliminar el CO<sub>2</sub> de corrientes gaseosas industriales) como para la obtención de productos de valor añadido (nutrición, farmacia, química fina, etc.) y, principalmente, como fuente alternativa a los combustibles fósiles tradicionales (producción de biodiesel, biometano, biohidrógeno y bioetanol).

A continuación entraremos en detalle en los usos e investigación en cada uno de estos campos:

#### 1.3.1. Energía

Podría decirse que una de las principales preocupaciones actuales es la búsqueda de fuentes de energía sustitutas o complementarias al petróleo, dado el pronóstico del agotamiento de las reservas del planeta y los problemas derivados de su uso: emisiones de efecto invernadero, subida de los precios, inestabilidad de los mercados por dependencia energética de países productores, etc.

La investigación actual en microalgas está mayoritariamente centrada en la obtención de cultivos con alto contenido en lípidos para la producción de biodiesel. Existen, sin embargo, además de dicha conversión química, otras posibilidades de aprovechamiento energético de las microalgas, de modo similar a como se aprovechan otros tipos de biomasa del planeta (residuo forestal, residuo orgánico urbano, etc.): mediante conversión termoquímica, química o bioquímica. Todas estas posibilidades se detallan a continuación.

## Biodiesel

El biodiesel es un combustible líquido obtenido a partir de lípidos mediante procesos de esterificación y transesterificación. Estos lípidos provienen de grasas animales o de aceites de diversos cultivos, como los de soja (en la actualidad la materia prima más empleada), maíz, girasol, palma, colza, remolacha, jatropha, etc. El principal problema de estas materias primas vegetales es la necesidad de grandes extensiones de tierra para su cultivo y la competencia con productos de alimentación, lo que ha generado en los últimos años un amplio debate sobre su sostenibilidad económica, medioambiental y social.

Numerosas especies de microalgas pueden ser inducidas, manipulando las características físico-químicas del medio de cultivo, a producir elevadas cantidades de lípidos o ácidos grasos, que pueden ser posteriormente empleados para la producción de biodiesel. Estas manipulaciones pueden ser simples, como variación de la salinidad, temperatura, pH o disponibilidad de micronutrientes. La acumulación de lípidos se atribuye a un consumo de azúcares mayor al crecimiento celular, que favorece la conversión a lípidos de los azúcares en exceso. Sin embargo, y por regla general, las microalgas con alto contenido lipídico no presentan altas velocidades de crecimiento. Es por ello que lo que se busca optimizar es la producción neta de lípidos por unidad de volumen de reactor o de superficie ocupada.

Las ventajas del empleo de algas para la obtención de biodiesel son principalmente las siguientes:

- No compite en el mercado de productos de alimentación.
- La producción no es estacional por dependencia con las cosechas.
- El consumo de agua es menor.
- La superficie necesaria para su cultivo es mucho menor: empleando aceite de colza se producen alrededor de 1190 L biodiesel/ha de cultivo, mientras que en el caso de las algas se pueden obtener hasta 12000 L/ha.
- Su alta velocidad de crecimiento en comparación con los cultivos tradicionales: la productividad por unidad de superficie es entre 20 y 40 veces mayor en el caso de las algas.
- Eliminación del empleo de herbicidas y pesticidas.

Los principales problemas técnicos de la obtención de biodiesel a partir de microalgas radican en la dificultad de la extracción de los lípidos de las células. Estos procedimientos son complejos y están todavía en fase de desarrollo. Los principales problemas económicos derivan por consecuente del alto precio de la tecnología necesaria, así como del hecho que compiten con precios de carburantes relativamente bajos.

## Conversión termoquímica

La conversión termoquímica es la descomposición térmica de la materia orgánica de la biomasa mediante diferentes métodos:

- La **combustión directa** genera gases calientes quemando la biomasa en presencia de aire. Pese a la posibilidad de quemar todo tipo de biomasa, el proceso sólo es rentable para aquella con un contenido en humedad menor al 50%. La viabilidad del empleo de microalgas en combustión no ha sido estudiada como tal, sin embargo existen estudios donde la biomasa algal se combina con carbón en su combustión, disminuyendo la producción de gases de efecto invernadero.
- **Gasificación**: es la oxidación parcial de la biomasa a temperaturas entre 800 y 1000°C, que genera gas de síntesis (una mezcla de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CO, N<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>). Existen estudios de gasificación de microalgas como *Spirulina* y *Chlorella*, sin embargo la bibliografía al respecto es escasa.
- La **pirólisis** transforma la biomasa, en ausencia de aire y mediante temperaturas que oscilan entre los 350 y 700°C, a aceite, carbón vegetal y gas de síntesis. La investigación actual defiende el potencial de la pirólisis como medio para obtener carburantes líquidos sustitutos del petróleo. Existen varios tipos de pirólisis aunque los procesos presentan todavía barreras técnicas que salvar para tratar correctamente los aceites producidos (craqueo catalítico, hidrogenación, eliminación de álcalis, etc.). La investigación en pirólisis de algas presenta resultados prometedores que podrían llevar a la explotación comercial, sobre todo a partir de microalgas que crecen en heterotrofia.
- La **licuefacción termoquímica** de las microalgas representa una opción viable para su aprovechamiento energético, ya que no es necesario el secado de la biomasa. Se emplean bajas temperaturas alrededor de 300 – 350°C y altas presiones (5-20 MPa), junto con un catalizador en presencia de hidrógeno. Los reactores son complejos y la tecnología es costosa, sin embargo, existen diferentes estudios que demuestran un balance energético positivo del proceso completo de licuefacción de por ejemplo *B. braunii* o *Dunaliella tertiolecta*.

## Hidrógeno

Las microalgas poseen las características genéticas, metabólicas y enzimáticas para producir hidrógeno en condiciones anaerobias. Las enzimas hidrogenasas son capaces de producirlo a partir de los protones extraídos del agua, si bien son inhibidas rápidamente por dicho hidrógeno producido. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, por ejemplo, es capaz de producir hidrógeno gaseoso en lugar de oxígeno molecular mediante la fotosíntesis cuando hay deficiencia de azufre. Esto indica que existen vías alternativas de transporte de electrones durante el proceso fotosintético que no implican al oxígeno o al NADP<sup>+</sup>. Las investigaciones al respecto son recientes y por tanto los resultados concretos son aún escasos. Se están llevando a cabo investigaciones a escala de laboratorio y desarrollando diferentes métodos para

incrementar el rendimiento de la producción y optimizar el proceso. Existen principalmente dos métodos: producción simultánea de oxígeno e hidrógeno y producción en dos etapas, en la segunda de las cuales las algas se ven privadas de azufre.

## Conversión bioquímica

La conversión bioquímica de la biomasa de microalgas incluye principalmente la digestión anaerobia y la fermentación alcohólica. En la primera, la biomasa debe presentar, para un buen desarrollo del proceso, una relación C:N apropiada, mientras que para la fermentación con vistas a obtener bioetanol es deseable que la biomasa contenga alto contenido en carbohidratos, ya que éstos son los finalmente transformados en alcohol.

La fermentación anaerobia y la digestión anaerobia son los procesos de aprovechamiento energético, junto con la licuefacción termoquímica, en los que las microalgas se pueden emplear en base húmeda, mientras que otros métodos de recuperación energética, como por ejemplo en la recién comentada producción de biodiesel, implican el secado de la biomasa. Las operaciones de secado de la biomasa son, como veremos, un proceso con un sensible consumo energético que debe ser tenido en cuenta.

- Fermentación alcohólica: la fermentación es un proceso, llevado a cabo por levaduras, en que los azúcares complejos como el almidón o la celulosa son convertidos en etanol en ausencia de oxígeno. Es un proceso exotérmico que se lleva a cabo en fermentadores a temperaturas bajas (alrededor de los 30°C) y tras el proceso de fermentación el producto obtenido se destila para eliminar aguas y otras impurezas. El producto final contiene un 95% en etanol y puede ser empleado como carburante. Se han obtenido resultados de hasta un 65% de eficiencia en la conversión en etanol de *Chlorella vulgaris*, que supone una buena materia prima por su alto contenido en almidón (aproximadamente un 37% en peso seco). Sin embargo, la biomasa proveniente de microalgas necesita un procesado previo adicional, por lo que la viabilidad de producción de etanol a partir de microalgas es todavía discutida.
- Digestión anaerobia: la digestión anaerobia es un proceso llevado a cabo por bacterias donde la biomasa es transformada en biogás, un gas que contiene metano y CO<sub>2</sub>, junto con trazas de otros gases como H<sub>2</sub>S. Tiene lugar en tres pasos: hidrólisis de los compuestos complejos en azúcares, fermentación de estos compuestos en alcohol, ácido acético, ácidos grasos volátiles, hidrógeno gas y CO<sub>2</sub>, y metanogénesis, mediante la cual se produce el metano. En este proceso se puede emplear biomasa con un 80-90% de contenido en humedad, por lo que hace apropiado el uso de microalgas. Esta idea fue mencionada por primera vez en 1957 por Golueke, quien comparó la digestión anaerobia de las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* con la de los fangos de aguas residuales domésticas. Dicho estudio proporciona unos datos de potencial de biometanización de 0,25-0,50 L CH<sub>4</sub>/g SV para las microalgas a 35–50 °C y con

un tiempo de retención de 11 días. Los sólidos volátiles eliminados fueron un 45%. Los resultados obtenidos con posterioridad (a escala de laboratorio y a escala industrial) son similares, y las principales causas que desde entonces se atribuyen a los bajos rendimientos son la toxicidad del amonio y el carácter recalcitrante de las paredes celulares de las microalgas. La relación C:N de las algas, que oscila alrededor de 6:1, es un valor menor al recomendado para la digestión anaerobia (30-40), por lo que una posibilidad para mejorar dicho proceso sería la codigestión con residuos de mayor relación C:N, como fango de digestión de depuradoras de agua residual, agua residual de la industria papelera, etc. (Salerno 2009).

La ventaja de la digestión anaerobia como estrategia de aprovechamiento energético de las microalgas, frente al biodiesel principalmente, es que elimina el paso de extracción de lípidos y su conversión química posterior, lo que podría reducir el consumo energético global. Por otro lado, la posibilidad de reciclar los nutrientes presentes en la fracción líquida resultante potencia la sostenibilidad del proceso.

Según Collet (2011) la digestión anaerobia de las microalgas produce una cantidad de biogás aprovechable para la obtención de energía que compensa el consumo necesario en el proceso del cultivo de la biomasa y su separación del agua tratada mediante membranas.

<b>Características de la biomasa</b>	
gSSV/gSST	0,90
gDQO/gSSV	1,43
gCOT/gDQO	0,29
gNKT/gCOT	0,167
<b>Digestión anaerobia</b>	
mL CH <sub>4</sub> /gSSV	292
mLCH <sub>4</sub> /gDQO	204
%CH <sub>4</sub> en el biogás	70
Biodegradabilidad	0,56

*Tabla 1: Datos de digestión anaerobia obtenidos por Ras et al (2011)*

Cabe destacar que la conversión bioquímica de las microalgas puede tener lugar tras la extracción de los lípidos para su empleo en producción de biodiesel, con lo que es posible la combinación de varios sistemas de aprovechamiento energético para mejorar el rendimiento global



### 1.3.2. Depuración

La **fitoremediación**, en términos generales, es el empleo de plantas para la eliminación o transformación de contaminantes, incluyendo por ejemplo nutrientes presentes en el agua o el CO<sub>2</sub> presente en gases de escape. La fitoremediación lleva asociada una producción de biomasa, ya sea ésta plantas superiores (filtros verdes, etc.), macroalgas o microalgas.

Una de las primeras descripciones del empleo de algas en el tratamiento de aguas residuales se remonta a 1957 y se debe a Oswald, quien describe un sistema de tratamiento mediante lagunaje. Las algas han ido ganando atención desde entonces debido a su potencial de eliminación de nutrientes de aguas residuales urbanas (de-Bashan 2010), industriales (Bordel 2009) y de la agricultura (Olguin 2003).

Junto a los cultivos de algas en suspensión, otros autores han investigado la depuración de aguas residuales mediante algas fijas en medios como alginato o quitosán, o mediante biofilms (Abe y Takahashi 2008).

Se han probado tanto monocultivos como cultivos de varias especies en aguas residuales artificiales y reales, de modo que investigaciones paralelas han concluido, sobre un extenso número de especies de microalgas, que éstas son aptas para la eliminación de contaminantes en aguas residuales y que la eficacia del proceso es prometedora. Los resultados muestran porcentajes de eliminación que alcanzan el 100% en algunos casos, aunque obviamente varían en función de las condiciones de operación, especies empleadas, y características del agua residual. Otros estudios han trabajado con aguas de elevada carga orgánica, ya sea de ganadería o agricultura, concluyendo asimismo que la depuración mediante microalgas es posible.

Algunas de las especies estudiadas son *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus obliquus* (Martínez et al., 2000, Park et al., 2010), *Spirulina platensis* (Lodi et al., 2003, Olguín et al., 2003) y *Chlorella sp.* (Hernández et al., 2006, Wang et al., 2010). Estas especies pueden utilizar en su crecimiento diferentes compuestos de nitrógeno tales como amonio, nitrato o urea (Xin et al., 2010). En la sección III se realiza una revisión a este tipo de trabajos.

Asimismo, numerosos estudios se han centrado en el secuestro del CO<sub>2</sub> por parte de las algas, debido al efecto invernadero del gas y al hecho de que las microalgas y cianobacterias pueden fijar CO<sub>2</sub> con una eficiencia entre 10 y 50 veces mejor que las plantas terrestres.

Cabe destacar también el potencial que presentan las microalgas en la eliminación de metales pesados en las aguas residuales, como se revisa en la sección III.

En la Tabla 2 se resumen algunas de las microalgas que han sido empleadas en la depuración de diversos tipos de aguas residuales.

Microalga	Tipos de aguas residuales
<i>Prototheca zopfi</i>	Hidrocarburos derivados del petróleo
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Tintes azoicos en aguas residuales
<i>Chlorella sp.</i>	Residuos de ganadería digeridos anaeróbicamente
<i>Ankistrodesmus y Scenedesmus</i>	Aguas residuales de industria del papel y alperujos
<i>Spirulina platensis</i>	Agua residual urbana
<i>Chlorella sokoniana</i>	Agua residual en heterotrofia sin luz
<i>Botryococcus braunii</i>	Agua residual tras tratamiento secundario
<i>Scenedesmus</i>	Altos niveles de amonio en efluente de digestión anaerobia

Tabla 2: Microalgas empleadas en la degradación de diversos contaminantes (Rawat 2010)

### 1.3.3. Otros productos

La producción a escala industrial de algas para usos no energéticos comenzó en los años sesenta en Japón con el cultivo de *Chlorella* para **aditivo en alimentación**. Este consumo se extendió a países como los EEUU, India, Israel o Australia. El consumo de microalgas para alimentación está sin embargo restringido a unas pocas especies debido a la estricta regulación en materia de alimentos. El mercado está dominado por *Chlorella*, *Dunaliella* y *Spirulina* en forma de comprimidos o en polvo, si bien es cierto que existen estudios que relacionan el consumo de cianobacterias con varias enfermedades del sistema nervioso.

Las microalgas son una fuente importante de **ácidos grasos poliinsaturados**, esenciales para el ser humano por, entre otras cosas, reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Estos ácidos grasos suelen obtenerse a partir de aceites del pescado. Actualmente el único disponible comercialmente a partir de microalgas es el ácido docosahexaenoico (DHA) ya que la obtención de otros (eicosapentaenoico EPA, gamma linoleico GLA y araquidónico AA) no es competitiva con la producción a partir de otras fuentes.

Las microalgas se cultivan también para **alimentación animal** como suplementos que mejoran la respuesta inmunológica o fertilidad, controlan el peso o el estado de las pieles de los animales. Se emplean microalgas como *Chlorella*, *Spirulina* o *Scenedesmus*, principalmente en acuicultura.

De las microalgas, sobretodo de *Dunaliella salina*, se obtiene  **$\beta$ -caroteno**, que tiene un amplio rango de aplicaciones como colorante, fuente de provitamina A y aditivo en cosméticos.

La microalga *Haematococcus pluvialis* produce **astaxantina**, que se emplea en la industria nutracéutica, cosmética, de colorantes y de alimentación. Es un potente antioxidante con posibles acciones beneficiosas en humanos como protección ante la

radiación UV, precursor hormonal y del sistema inmunológico, antiinflamatorio y fuente de provitamina A.

La **C-ficocianina**, que se obtiene principalmente de *Spirulina platensis* y *Porphyridium cruentum*, es un pigmento fotosintético con aplicaciones en nutrición humana y animal y como colorante natural para alimentos y cosméticos, así como en la industria farmacéutica por su poder antioxidante.

El carbón vegetal resultante de la pirólisis (ver apartado 1.3.1) se emplea como **fertilizante** y se ha propuesto como un biocombustible que fija CO<sub>2</sub>, aunque los estudios no son concluyentes (Brennan 2010).

Microalga	Producción anual (tn peso seco)	País productor	Aplicación y producto	Precio (€)
<i>Spirulina</i>	3000	China, India, EEUU, Myanmar, Japón	Nutrición humana	36 kg <sup>-1</sup>
			Nutrición animal	
			Cosméticos	
			Ficobiliproteínas	11 mg <sup>-1</sup>
<i>Chlorella</i>	2000	Taiwan, Alemania, Japón	Nutrición humana	36 kg <sup>-1</sup>
			Cosméticos	
			Acuicultura	50 L <sup>-1</sup>
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Australia, Israel, EEUU, Japón	Nutrición humana	
			Cosméticos	
			β-caroteno	215 – 2150 kg <sup>-1</sup>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500	EEUU	Nutrición humana	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300	EEUU, India, Israel	Acuicultura	50 L <sup>-1</sup>
			Astaxantina	7150 kg <sup>-1</sup>
<i>Shizochytrium</i>	10 tn aceite DHA	EEUU	DHA	43 g <sup>-1</sup>
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 tn aceite DHA	EEUU	DHA	43 g <sup>-1</sup>

Tabla 3: Estado de la producción de microalgas para “otros usos” en 2010 (Brennan 2010)

## 2. Producción de microalgas

Como se ha comentado, las microalgas se pueden cultivar de manera fotoautótrofa, heterótrofa o en condiciones de mixotrofia. Según Brennan (2010) la producción fotoautótrofa es hoy en día el único método de producción de microalgas a gran escala que resulta económicamente rentable y técnicamente viable en el caso de que no haya producción de energía.

Respecto a los sistemas de cultivo, éstos se suelen clasificar, según su configuración y tipo de funcionamiento, en cultivo abierto (canales o estanques) y fotobiorreactores. Los cultivos abiertos son una tecnología relativamente simple que consiste en realizar el cultivo de microalgas en estanques o en canales de unos 20 a 50 centímetros de profundidad. Los fotobiorreactores, por el contrario, se basan en el cultivo de algas en espacios cerrados con geometrías de diverso tipo.

### 2.1. Estanques

Este sistema de cultivo abierto se ha venido empleando desde los años 50 (Borowitzka 1999) y es el más común para la producción comercial de microalgas (Pulz, 2001). Se pueden clasificar en aguas superficiales naturales, como estanques, lagunas y lagos, y estanques artificiales. Dentro de éstos últimos, los estanques de carrusel o canales son los más empleados (*raceway ponds* en inglés). Suelen ser canales de hormigón ovalados, donde el cultivo es recirculado y mezclado para favorecer la estabilización del crecimiento y productividad de las microalgas. Un rodete se encarga de ello, de modo que el inóculo y los nutrientes se integran en el sistema al principio, y las microalgas se recirculan a través del *loop* hasta el punto de extracción. Se evita así también la sedimentación.

Debido a su poca profundidad, la difusión desde la atmósfera permite a las algas obtener el CO<sub>2</sub> necesario para su crecimiento. En ocasiones, sin embargo, se instalan difusores en el fondo del estanque.

La producción mediante estanques o lagunaje es un método más barato en comparación con los fotobiorreactores, tanto en inversión como en mantenimiento y consumo energético durante el funcionamiento. En la Fig. 10 se muestra un esquema de un estanque de carrusel.

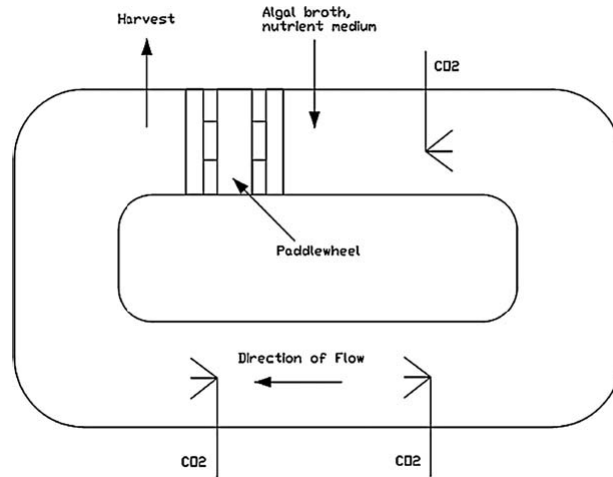


Fig. 10: Esquema de un canal de cultivo de microalgas

En un sistema de cultivo abierto es difícil mantener una sola especie de microalga, debido a la facilidad de contaminación biológica, que puede incluso suponer la infección de dicho cultivo por bacterias u otros microorganismos. El modo de conseguir mantener un monocultivo en este tipo de sistemas es mediante el control de las condiciones ambientales, de modo que éstas tomen valores extremos. Esto es posible con algunos tipos de microalgas (extremófilas), pero no con todas. Por ejemplo, *Chlorella*, *Dunaliella salina* y *Spirulina* son géneros que presentan esta opción, mediante el control de un alto nivel de nutrientes, elevada salinidad y elevada alcalinidad respectivamente.

El control de la temperatura es también complejo en un sistema de cultivo abierto, ya que si bien es verdad que la evaporación ejerce efecto de refrigeración, las oscilaciones diarias no se ven amortiguadas, y por otro lado la evaporación provoca cambios en la composición iónica del medio de cultivo.

Otros posibles problemas de este tipo de sistemas son la dificultad de mezclado eficiente, la potencial falta de  $\text{CO}_2$  y la limitación de la luz en capas inferiores. Para maximizar la productividad de biomasa se ha de optimizar el mezclado y la profundidad del estanque.

## 2.2. Fotobiorreactores

Los sistemas cerrados de cultivo de microalgas son reactores transparentes, de plástico o vidrio, con geometrías de diverso tipo: tubulares, cilíndricas o planas. Se empezaron a desarrollar con posterioridad a los sistemas de lagunaje y su configuración y geometría dependen de condiciones locales, del producto a obtener y de las especificaciones económicas del sistema.

Una de las principales ventajas por las cuales se desarrolla este tipo de cultivo es la mayor facilidad de mantener un **monocultivo**, sin contaminación por otras especies, que proporcione un producto de pureza apta para su procesado en la industria farmacéutica o alimentaria. Es también más fácil mantener un cultivo durante períodos más largos, ya que la protección contra otras contaminaciones biológicas (depredación o toxicidad) es más fácil. Los parámetros de proceso son en definitiva más controlables.

La **productividad** alcanzada en sistemas de cultivo cerrados es mayor, por lo que requieren mucho menos espacio que los sistemas abiertos y por otro lado disminuyen los costes de recolección de la biomasa generada. La mayor productividad es debida a desventajas importantes de los sistemas abiertos de cultivo, que son, entre otras, una baja eficiencia de mezclado y bajas eficacias fotosintética y de consumo de CO<sub>2</sub>. Aún así, los costes totales son mayores cuando se emplean fotobiorreactores, comparados con sistemas de cultivo abierto: presentan mayores costes de inversión, operación y mantenimiento. Por otro lado, la productividad alcanzada en los fotobiorreactores aún no es la máxima teórica, y no ha sido siempre posible llevar a gran escala resultados de laboratorio (Posten 2009). El desarrollo y optimización de fotobiorreactores que permitan el cultivo económico a gran escala de microalgas es aún hoy en día una de las mayores tareas a realizar.

Gran parte de los estudios de cultivo de microalgas en sistemas cerrados se basa en configuraciones **cilíndricas** de fotobiorreactor, debido principalmente a sus características de transferencia de masa y calor y los bajos costes de operación (bajo consumo energético). Normalmente se introduce aire burbujeándolo por la parte inferior. El diámetro suele ser menor a 200 cm para evitar que no llegue luz al interior de la columna. Algunos investigadores han desarrollado reactores anulares que eliminan la parte interior del reactor cilíndrico, de modo que el reactor viene delimitado por dos paredes concéntricas. Su altura se ve limitada a 4 metros por motivos estructurales y por evitar la sombra en una extensión donde existan instalados más de un fotobiorreactor.

Los reactores **tubulares** son tubos de diámetro igual o menor a 100 cm, dispuestos de modo horizontal, vertical, helicoidal o inclinado. La biomasa es recirculada mediante bombas o empuje por aire. La longitud puede alcanzar los cientos de metros. Una de las principales ventajas de este diseño es una relación superficie/volumen de más de 100 m<sup>-1</sup>. Su principal desventaja es el alto consumo energético.

Se encuentran también numerosas referencias de reactores **planos** tanto para la obtención de sustancias de interés (Cheng-Wu 2001) o para el estudio del cultivo de microalgas (Harun 2010). La ventaja de los **reactores planos** radica en su robustez y en la gran superficie expuesta a la radiación solar. La productividad obtenida es elevada y la limpieza es fácil. Son una de las primeras configuraciones que se probó, y se pueden alcanzar densidades de células mayores a 80 g/L. Ramos de Ortega y Roux experimentaron en 1986 el cultivo de la microalga *Chlorella* en reactores planos, determinando la influencia de varios factores en su crecimiento. Otros estudios han sido publicados posteriormente (Qiang y Zarmi 1998, Cheng-Wu 2001, Hoekema et al., 2002) tratando el cultivo de diferentes especies de microalgas.

A continuación se muestra una tabla (Tabla 4) con valores bibliográficos de productividad de microalgas en fotobiorreactores de distinto tipo. En las Fig. 11 y Fig. 12 se muestran varias configuraciones para el cultivo de microalgas.

<b>Especies</b>	<b>Tipo de reactor</b>	<b>Volumen (L)</b>	<b>Concentración <math>X_{max}</math> (g/L)</b>	<b>Productividad (<math>g/m^2 \cdot d</math>)</b>	<b>Productividad (g/L·d)</b>
<i>Porphyridium cruentum</i>	Tubular	200	3	–	1,5
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Tubular	200	–	20	1,2
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Tubular	200	–	32	1,9
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Tubular	6	1,5	–	1,47
<i>Arthrospira platensis</i>	Tubular	11	6	47,7	2,7
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Tubular helicoidal	75	–	–	1,4
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Tubular paralelo	25	–	13	0,05
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Cilíndrico	55	1,4	–	0,06
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Tubular	55	7	–	0,41
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Placas planas	440	–	–	0,27
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Placas planas	25	–	10,2	–
<i>Spirulina platensis</i>	Tubular	5,5	–	–	0,42
<i>Arthrospira</i>	Tubular	146	2,37	25,4	1,15
<i>Chlorella</i>	Placas planas	400	–	22,8	3,8
<i>Chlorella</i>	Placas planas	400	–	19,4	3,2
<i>Tetraselmis</i>	Cilíndrico	ca. 1000	1,7	38,2	0,42
<i>Chlorococcum</i>	Parábola	70	1,5	14,9	0,09
<i>Chlorococcum</i>	Cúpula	130	1,5	11,0	0,1

Tabla 4: Productividades de biomasa en fotobiorreactores (Brennan 2010)

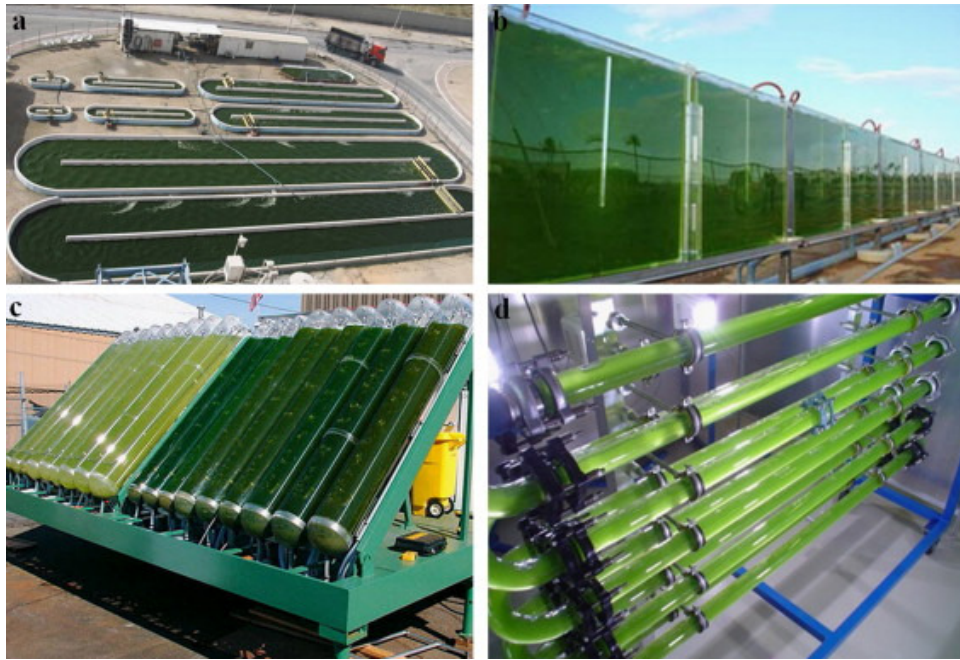


Fig. 11: Configuraciones de fotobiorreactores  
 a: estanques, b: placas planas, c: cilíndricos, d: tubulares horizontales

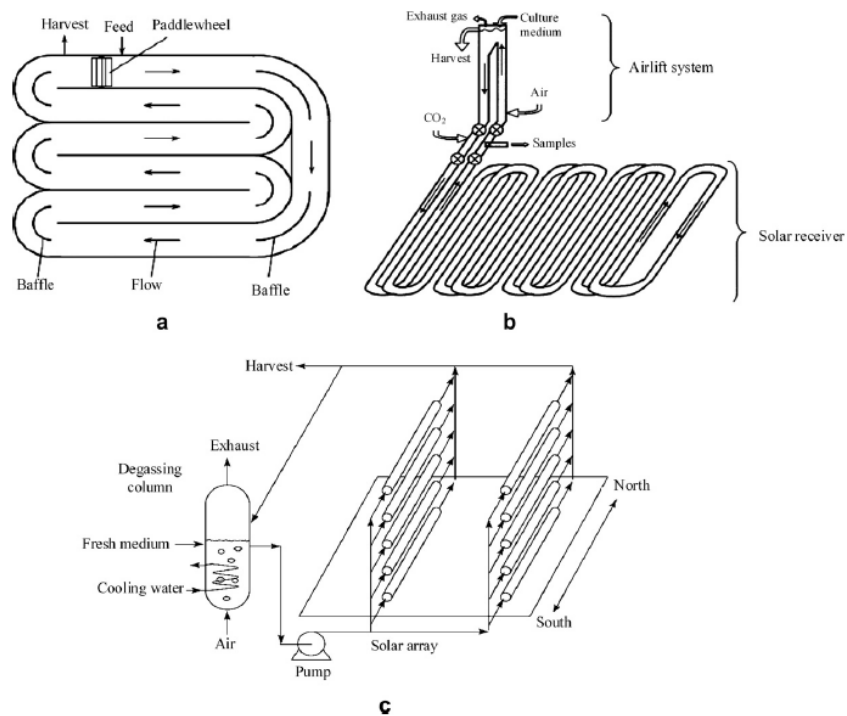


Fig. 12: Esquema de varios tipos de fotobiorreactores  
 a: canal, b: tubular con loop externo, c: tubular horizontal



## 2.3. Crecimiento

Cada especie y subespecie de microalga presenta sus características propias respecto a condiciones óptimas de crecimiento, así como productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de sistema de cultivo. Los factores influyentes son sin embargo comunes y se comentan en este apartado.

Tanto la composición de las microalgas como su productividad están determinadas, principalmente, por la alcalinidad del medio, el pH, la temperatura, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y tipo de luz, la densidad celular del cultivo y la contaminación o depredación por otros organismos.

A continuación se comenta la influencia de estos factores en el desarrollo de las microalgas. Lo expuesto es en general válido para todo tipo de cultivo, aunque en ocasiones se centra más en los cultivos cerrados por ser en éstos donde su control es realmente posible y por ser un fotobiorreactor de lo que en este trabajo se trata.

En promedio, las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, en fase exponencial algunas algas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3,5 horas (Brennan 2010).

### 2.3.1. Luz

Los organismos fotosintéticos sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm. Esta fracción fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés) supone un 40% de la radiación total del Sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de alrededor del 1% en lo que a conversión de energía lumínica en biomasa se refiere. Se han demostrado, para las microalgas, eficiencias de conversión luz-biomasa entre 1 y 4 % en sistemas abiertos y aún mayores en fotobiorreactores cerrados (Stephens 2010).

El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida siempre que ésta se sitúe por debajo de un cierto valor máximo (fotolimitación). A partir de éste, los sistemas fotosintéticos receptores se ven dañados y la fotosíntesis se ve inhibida. A este fenómeno se le denomina fotoinhibición. En la mayoría de las microalgas la fotosíntesis se ve saturada a niveles lumínicos que representan sobre el 30% de la radiación total que la Tierra recibe del Sol. Esto supone alrededor de 1700 – 2000  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ . Las algas adaptadas a bajos niveles de luminosidad tienen una respuesta más rápida a cambios en la intensidad luminosa que las que están adaptadas a intensidades de luz altas. Las algas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila a de sus células, de modo que las algas adaptadas a bajas intensidades lumínicas tienen más clorofila.

Un parámetro importante en el diseño de un fotobiorreactor es la distancia de penetración de la luz, que depende de la intensidad de la radiación incidente, la dispersión de la luz en la superficie del reactor y la atenuación en el medio de cultivo. La dispersión en la superficie debe ser minimizada para maximizar la luz que entra al reactor, y la atenuación depende de la densidad del cultivo y de la longitud de onda de la radiación, provocando un gradiente de intensidad de luz en su dirección de penetración.

Se puede generalizar diciendo que es necesario encontrar, para cada especie, la densidad óptima de cultivo para cada configuración de reactor, de modo que la intensidad de luz incidente y transmitida en el cultivo permita el crecimiento de las microalgas e impida su inhibición.

Según Pulz (1998) la luz es generalmente el factor limitante en la producción de microalgas al aire libre. Por otro lado, debido a que las concentraciones óptimas de biomasa son diferentes para diferentes niveles de irradiación solar, y ésta cambia a lo largo del día, la biomasa debe adecuarse a ello. Así como el sistema fotosintético se adapta mejor a la hora de capturar la energía lumínica cambiante (mediante el contenido en clorofila a), se han llevado a cabo investigaciones que sugieren que el cuello de botella se sitúa en la biosíntesis de biomasa estructural a partir de carbono fijado fotosintéticamente.

La iluminación artificial puede contribuir a una producción continua, pero obviamente a mayor coste económico y energético. Ante la necesidad de elección de luz artificial, es importante conocer el espectro de absorción de las algas cultivadas, que depende de los pigmentos mayoritarios presentes en ellas. Un estudio de Kommareddy y Anderson (2003) que incluía lámparas fluorescentes, incandescentes, halógenas, y LEDs (emitiendo en 643 nm) determinó que estos últimos son la fuente más eficiente y económica ya que emiten más del 98% de su luz entre 600 y 700 nm.

Según Richmond (2000), la proporción óptima entre zona iluminada de un reactor y zona oscura es 15:85. Es decir, un 15% del reactor correspondería a zona fótica mientras que un 85% de las algas estarían en la oscuridad en cada momento. El problema del control de la luz como factor de gran influencia en el crecimiento de las algas es la imposibilidad de definirlo mediante un único parámetro, ya que entran en juego intensidades, frecuencia de cambio luz-oscuridad, proporción de duración de los ciclos, hidrodinámica, configuración del reactor o estanque, etc.

A continuación se muestran, a modo de ejemplo, los gráficos obtenidos por Hu et al (1996 y 1998), donde se muestra la productividad en mg peso seco/h·L en función de la densidad del cultivo en g/L. Cada campana corresponde a una intensidad lumínica, y se observa un óptimo de densidad de cultivo distinto en función de dicha intensidad. Las intensidades en la Fig. 13 son, de menor a mayor campana: 270, 740, 1200, 2000, 6000 y 8000  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .

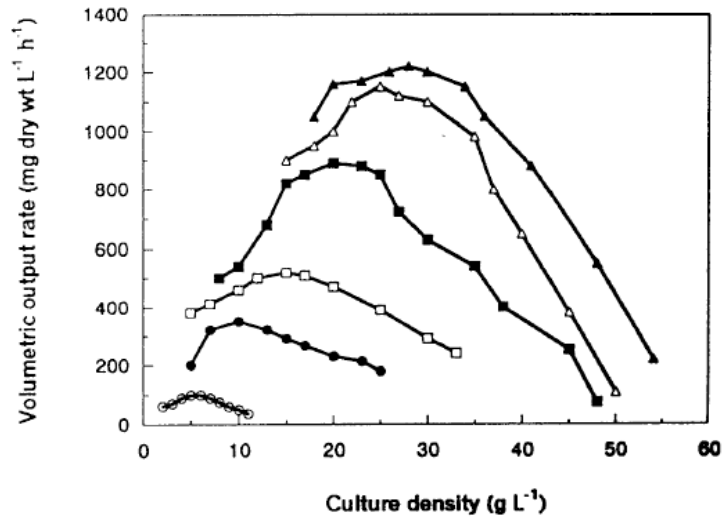


Fig. 13: Productividad en un reactor plano en función de la densidad del cultivo

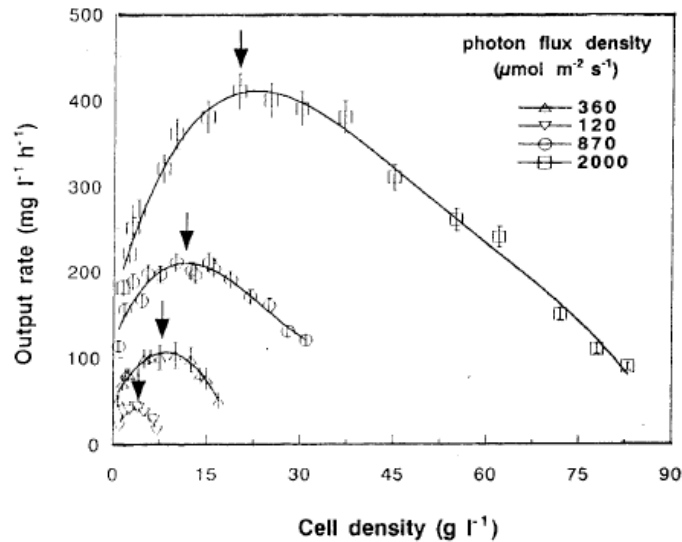


Fig. 14: Productividad de *Chlorococcum littorale*

### 2.3.2. Nutrientes

Como se ha mencionado anteriormente, las algas pueden ser autótrofas, heterótrofas, o mixotróficas, pero nos centraremos principalmente en las microalgas autótrofas. Los principales nutrientes minerales que éstas toman del medio y necesitan para su desarrollo son:

**Carbono:** Las microalgas pueden emplear como fuente de carbono el  $\text{CO}_2$  presente en la atmósfera, así como los iones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) con la ayuda de una enzima llamada anhidrasa carbónica. En promedio, son capaces de tolerar hasta unas 150.000 ppmv de  $\text{CO}_2$  en aire, aunque hay especies, como *Chlorella*, que han

demostrado que toleran hasta 400.000 ppmv. Algunos sistemas de cultivo inyectan aire enriquecido en dióxido de carbono en el reactor. Cuando se provee a las algas de carbonato, se hace generalmente en forma de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{NaHCO}_3$ .

El suministro de carbono (en forma normalmente de  $\text{CO}_2$ ) y la eliminación de oxígeno generado son, después de la distribución de luz, la cuestión de mayor importancia en un fotobiorreactor. La necesidad de carbono se puede calcular estequiométricamente conociendo la composición de la biomasa, resultando un mínimo de 1,85 g  $\text{CO}_2/\text{g}$  biomasa. Por otro lado, para asegurar que las microalgas pueden tomar dicho  $\text{CO}_2$ , su presión parcial en el líquido ha de ser de 0,1-0,2 kPa.

Una ventaja de los fotobiorreactores frente a los sistemas abiertos de cultivo es un menor escape de  $\text{CO}_2$  a la atmósfera. Investigaciones recientes apuntan al uso de membranas para favorecer la transferencia de gas al seno del fluido en el cultivo (Posten 2009).

El **consumo** normal de las microalgas se sitúa entre 200 y 600 mg  $\text{CO}_2/\text{L}\cdot\text{d}$ , aunque se han recogido datos de **eliminación** de 800 – 1000 mg/L·d en cultivos de *Chlorella sp.*, interesantes sobre todo en aplicaciones de mitigación del efecto invernadero de los gases de escape de diversas industrias. A continuación se muestran valores de fijación de  $\text{CO}_2$  alcanzados por ciertas microalgas.

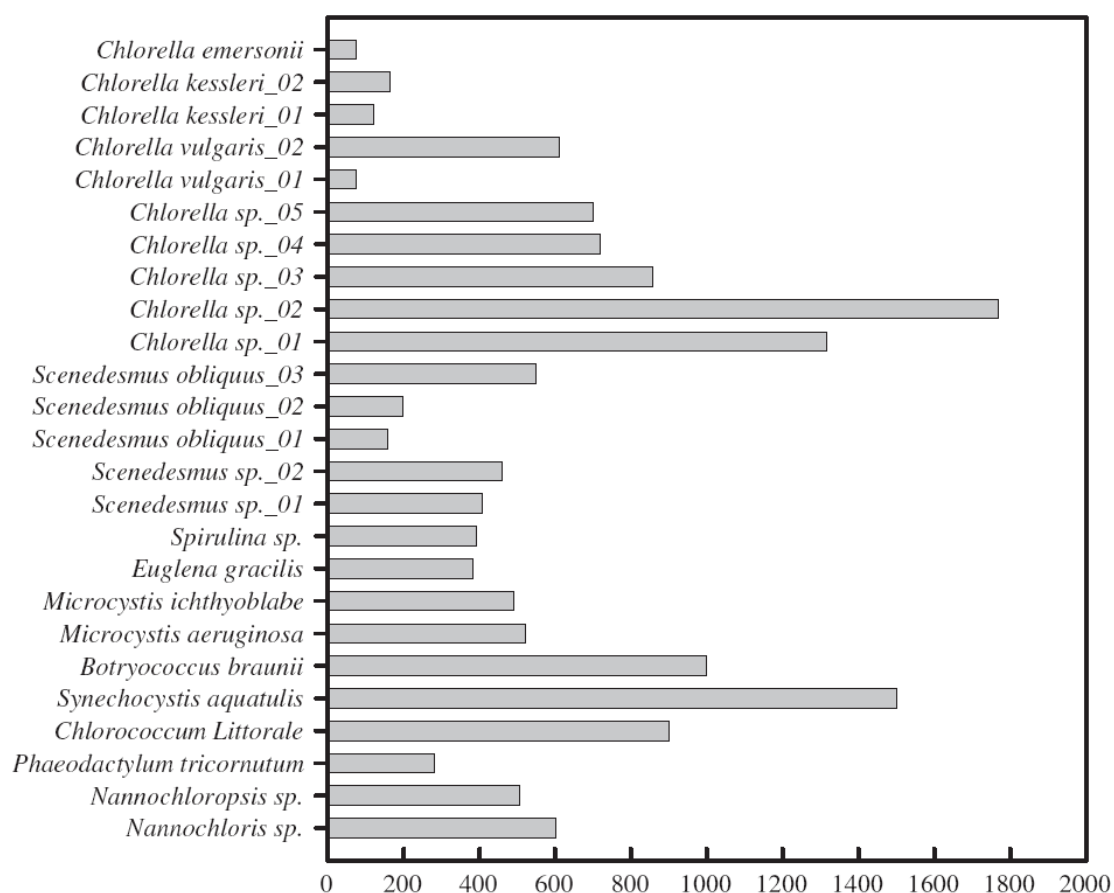


Fig. 15: Consumo de dióxido de carbono (mg/L·d) por varias especies de microalgas (Ho et al 2011)

El consumo de CO<sub>2</sub> por parte de las especies de microalgas en la figura viene determinado no sólo por la especie sino por otros parámetros como concentración de CO<sub>2</sub> disponible, temperatura, configuración del reactor, medio de cultivo o intensidad de la luz. No es, por tanto, una comparación estricta entre especies sino información orientativa sobre los rangos de valores y las especies de algas estudiadas para la mitigación del efecto invernadero del CO<sub>2</sub> industrial.

**Nitrógeno:** el contenido en nitrógeno de la biomasa puede suponer desde un 1% hasta más del 10%, y depende de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. En general, las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) en algunos casos.

En un estudio (Xin 2010) se demostró, para la microalga *Scenedesmus sp. LX1*, que ésta crece más rápidamente con amonio, seguido de urea y finalmente de nitrato. Sin embargo, la eliminación de fósforo y nitrógeno fue más completa en el cultivo donde éste está presente en forma de nitrato y urea que en aquél con amonio.

El nitrógeno en forma de amonio, cuyo equilibrio de disociación depende de la temperatura y el pH del medio, inhibe también el crecimiento de las microalgas, ya que es en general tóxico para los organismos fotosintéticos. El amonio desacopla el transporte electrónico en el fotosistema II (uno de los dos sistemas complejos que captan la energía lumínica y transportan los electrones por resonancia dentro de las células) y compite con el agua en las reacciones de oxidación que generan el O<sub>2</sub> libre. La tolerancia a él depende de la especie en cuestión. Por ejemplo, la *Spirulina* se ve prácticamente inhibida ante concentraciones de 200 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L mientras que *Chlorella sorokiniana* no muestra inhibición ante concentraciones de 400 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L.

El **fósforo** es otro de los macronutrientes esenciales en el crecimiento de las microalgas. Es tomado en forma de ortofosfatos (P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>), cuya concentración en equilibrio con las formas protonadas depende lógicamente del pH del medio. Existen factores que ralentizan la toma de fosfatos por parte de las algas, como un pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio. La cantidad necesaria de fósforo es mucho menor que la de nitrógeno para una misma cantidad de biomasa generada, como se ha podido comprobar en el apartado 1.

Diversos autores han concluido que la relación N:P en el medio de cultivo influye en la toma de nutrientes por parte de las microalgas, de modo que cuanto más próxima esté a la composición de los microorganismos, mayor crecimiento y toma de nutrientes tendrá lugar. Por ejemplo, para la microalga *Chlorella* la relación óptima es de 8:1 según Aslan y Kapdan (2008). Sin embargo, las microalgas son capaces de adaptarse al medio de cultivo y tomar uno de los nutrientes en una proporción mayor que la presente, en principio, en su composición celular.

Cabe destacar, por otro lado, que un déficit de nutrientes provoca en las microalgas una acumulación de lípidos siempre que haya luz y CO<sub>2</sub> disponibles (Rodolfi 2009, Khozin-Goldberg 2006).

Las microalgas requieren, para su crecimiento, de **otros** macronutrientes como azufre, calcio, magnesio y potasio, así como de micronutrientes como molibdeno, hierro,

níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro. En ciertos grupos de algas se requieren nutrientes especiales o característicos, como sucede con las diatomeas y el silicio.

### 2.3.3. Salinidad

La salinidad del medio de cultivo tiene gran influencia tanto sobre el crecimiento de las algas como sobre la productividad de lípidos u otras sustancias de interés. En un estudio con 10 cepas diferentes de microalgas (Araujo 2011) se observó cómo cada una de ellas responde de modo distinto ante un cambio en la salinidad del medio de 25 g/L a 35 g/L. En este estudio en concreto, se presentan resultados de rendimiento y productividad de biomasa y de aceite por volumen cultivado. Especies como *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis tetrathele* no presentaron cambios frente a la salinidad. La mayor productividad se alcanzó con *Chlorella vulgaris*, cuya relación biomasa inicial:final alcanzó 1:10.

### 2.3.4. pH

El pH en la mayoría de cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9, con un óptimo entre 8,2–8,7. El control de pH se consigue mediante aireación o adición de CO<sub>2</sub>. Como se ha explicado, el proceso fotosintético de fijación de CO<sub>2</sub> provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH<sup>-</sup>, lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por *stripping* a la atmósfera y eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos.

### 2.3.5. Oxígeno

El nivel de oxígeno disuelto debe ser controlado, ya que altas concentraciones pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima RuBisCo. Esta inhibición se ve favorecida por alta radiación y temperatura, así como en el caso de déficit de CO<sub>2</sub>. Muchas especies de microalgas no son capaces de sobrevivir en un medio sobresaturado de oxígeno más de 2 o 3 horas (para algunas el 120% de saturación en el aire, para otras el 200%). Además, la producción fotosintética de oxígeno en cultivos de alta densidad puede alcanzar hasta 40 mg/L, de modo que mediante la radiación adecuada pueden llegar a desarrollarse radicales de oxígeno. Estos radicales libres serían tóxicos para las células y causarían daños en sus membranas. La presión parcial del oxígeno en el cultivo puede disminuirse mediante aumento de la turbulencia y *stripping* de aire.

### 2.3.6. Agitación

La agitación, además de facilitar la eficiencia en el transporte, impedir la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes del reactor y homogeneizar el pH, asegura la distribución de los gases y de la luz. Una correcta agitación es capaz de someter a las algas a ciclos rápidos de mezclado, en los que en cuestión de milisegundos pasan de una zona oscura a una zona iluminada.

Si se tiene en cuenta que en el medio natural las densidades celulares del fitoplancton rondan las  $10^3$  células/ml, de modo que la distancia media entre células es de 250 veces su diámetro, y que en sistemas artificiales de cultivo esta distancia se ve reducida a tan sólo 10 veces su diámetro, ya que se alcanzan densidades de  $10^9$  células/ml, se entiende que el flujo turbulento es de gran importancia en cultivos de alta densidad. El flujo laminar provoca, además de distribución heterogénea de la luz, gradientes de difusión. Según este principio, los fotobiorreactores con alta densidad de cultivo han de ser en general delgados y disponer de mezclado rápido, para que la eficiencia de conversión de la luz solar se vea incrementada. Sin embargo, tanto la construcción como la operación de dichos reactores no hacen fácil su escalabilidad de modo rentable.

Cabe tener en cuenta sin embargo, que no todas las especies toleran una agitación fuerte que provea al reactor de un buen mezclado, ya que son sensibles al estrés hidrodinámico.

### 2.3.7. Temperatura

A pesar de que gran variedad de microalgas son capaces de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas (*Chlorella* destaca por ejemplo en este aspecto, ya que puede crecer entre 5 y 42°C), todas ellas presentan un rango fuera del cual se ven inhibidas o incluso mueren.

En sistemas abiertos de cultivo un incremento de temperatura se ve compensado con evaporación del agua, regulándose de este modo la temperatura máxima. En sistemas cerrados de cultivo es necesaria la refrigeración adicional en zonas cálidas, donde la relación entre nivel de luz y temperatura puede afectar a la biomasa en gran medida. Por otro lado, si la fluctuación entre temperatura máxima y mínima es muy amplia, puede ser igual de importante el calentamiento durante las horas de poca luz como la refrigeración durante las horas del día de mayor iluminación. Para ello es conveniente el empleo de frío o calor recuperado del mismo proceso o de un proceso industrial asociado en el caso de que éste exista, para mantener un balance neto favorable de energía. La refrigeración puede ser evitada mediante sistemas que regulen la cantidad de luz que llega al reactor (sombra, dilución de la luz).

Se ha demostrado que en el caso de que el dióxido de carbono o la luz sean limitantes en el cultivo, la temperatura no ejerce una influencia significativa.

## 3. Separación y post-tratamiento de las algas producidas

### 3.1. Separación

En la producción de microalgas, su separación del medio de cultivo supone entre el 20 y 30% del coste total (Molina Grima 2003). Esto significa que esta etapa es determinante en la economía y en el balance energético del proceso. Las microalgas son, en general, difíciles de separar por su pequeño tamaño, si bien es cierto que, por su tamaño, algunas cianobacterias sedimentan (decantación espontánea) o flotan, y que algunas microalgas forman agregados (biofloculación), lo que facilita su decantación.

La técnica de separación depende de la microalga en cuestión, la densidad del cultivo, el uso posterior y factores económicos como el precio del subproducto obtenido. En general, tiene lugar en dos etapas: en una primera etapa se produce una separación más basta en la que se alcanza una concentración de microalgas entre el 2 y 7%. Se puede realizar por floculación, sedimentación por gravedad o flotación. En una segunda etapa se realiza un secado más fino y de mayor coste energético, mediante centrifugación, filtración o ultrasonidos.

La **flotación** es sólo posible en los casos de las especies que flotan naturalmente, y no necesita reactivos químicos, al contrario que la **floculación**, que consiste en adicionar cationes multivalentes o poliméricos ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) para neutralizar las cargas negativas que de forma natural poseen las membranas exteriores de las microalgas, y facilitar su agregación.

La eficacia de la **decantación** depende del radio de los microorganismos y su densidad. Es el método más empleado en el tratamiento de agua, debido a las grandes cantidades de biomasa con que se trabaja y su bajo valor añadido. Sin embargo, sólo es posible en algunos casos, como en el de la *Spirulina*. Los **ultrasonidos** previos a la decantación han demostrado que optimizan la eficiencia de agregación y el factor de concentración del proceso.

En el caso de productos de alto valor añadido, la **centrifugación** es el método más extendido (Molina Grima 2003), aunque presenta como inconveniente el elevado consumo energético y el peligro de dañar las células debido al esfuerzo cortante. No siempre es un sistema rentable, debido al gasto energético y de mantenimiento del equipo. Es un método rápido y que alcanza grados de sequedad del 85%.

La **filtración** puede ser un método más competitivo comparado con otros sistemas de separación de las microalgas cultivadas: por ejemplo, para volúmenes menores a 2 m<sup>3</sup>/día, la rentabilidad es mayor que en el caso de centrifugación (Brennan 2010). Para mayores volúmenes (>20m<sup>3</sup>/día) los costes de bombeo y de reemplazo de las membranas pueden hacer perder competitividad al método.

La filtración se puede llevar a cabo mediante flujo tangencial (membranas externas) o fibra hueca (membranas sumergidas), así como mediante microfiltración, ultrafiltración,



filtración a vacío, etc. Sin embargo, las microalgas pueden causar un importante efecto de *fouling* en las membranas debido a que segregan materia orgánica extracelular, un material mucilaginoso que aumenta la resistencia a la filtración. Se han demostrado sin embargo pretratamientos para contrarrestar este efecto.

### **3.2. Post-tratamiento**

La biomasa, una vez separada del medio de cultivo, suele ser deshidratada para evitar reacciones de descomposición. Se deshidrata mediante secado al sol, a baja presión, con *spray*, en tambores, en lecho fluidizado o por congelación. En el caso de extracción de lípidos para obtención de biodiesel, es importante encontrar el compromiso entre grado de secado y rentabilidad del proceso (valor energético del producto final).

En el caso de extracción de productos de interés, es común la necesidad de romper las células previamente, para lo cual se emplean homogeneizadores, autoclavado, adición de ácido hidrocórico o NaOH y lisis alcalina. También se llevan a cabo extracciones con disolventes.

## **4. Barreras y avances en la producción de microalgas**

A pesar del potencial de las microalgas para su aprovechamiento en los sectores de la energía, depuración y fabricación de productos de alto valor añadido, el desarrollo de su producción a nivel industrial o semiindustrial se ha visto impedido en algunos casos por una falta de rentabilidad económica. Algunos de los motivos, que a su vez constituyen posibles campos de mejora, son los siguientes:

- La selección de especies debe permitir al mismo tiempo la producción de biodiesel y de otros productos de valor añadido.
- Los sistemas de producción precisan de mayor grado de desarrollo que permita alcanzar eficiencias fotosintéticas mayores.
- Aún existen problemas a solventar en la mantención de monocultivos, evitando la contaminación.
- La evaporación debería ser reducida, así como las pérdidas de difusión de CO<sub>2</sub>.
- La energía necesaria en el proceso debe ser minimizada a toda costa, ya que en ocasiones el gasto energético total (bombeo, transferencia de CO<sub>2</sub>, separación, secado, extracción, etc.) no compensa con la energía obtenida.
- La existencia de pocas plantas industriales en funcionamiento, y el recelo de sus dueños a compartir información, hace difícil la recolección de datos para realizar balances completos y optimización.

En consecuencia, la investigación actual en microalgas se desarrolla en varios frentes, como el de la ingeniería: diseño de fotobiorreactores donde el aprovechamiento de la luz sea óptimo, la simulación de dinámica de fluidos para estudiar el efecto que tienen las condiciones hidrodinámicas y la agitación en la productividad, el estudio del empleo de membranas para inyectar el CO<sub>2</sub> en el cultivo, la modelación de los procesos de toma de nutrientes, y un amplio etcétera orientado en definitiva a maximizar la productividad y disminuir el consumo energético.

En el campo de la biotecnología existen por ejemplo estudios microbiológicos que pretenden reducir la energía requerida para la fotosíntesis en un reactor, de modo que al reducir el tamaño de la antena que recoge la luz en los sistemas fotosintéticos de las algas, se permite que cada uno de ellos tome la luz que necesita, y no más. De esta manera la luz que se suele disipar en forma de calor y fluorescencia en el reactor y su superficie, penetra en el cultivo y así la eficiencia general aumenta. (Stephens 2010). De esta manera la energía de agitación puede ser también disminuida.

Por otro lado, las colecciones de algas existentes en todo el mundo contienen una infinidad de especies y cepas que, combinadas con los avances recientes en ingeniería genética, suponen una base importante sobre la que desarrollar procesos y sistemas de producción de microalgas que sean capaces tanto de producir sustancias de interés nuevas como de aumentar las productividades de los procesos existentes. Por otro lado, se buscan microorganismos que sean capaces de tratar aguas de diferentes características de modo estable y eficiente, o que no presenten inhibición ante gases de escape que ahora son tóxicos. Técnicas como la lipidómica, genómica y metabolómica trabajan en la búsqueda y desarrollo de microalgas con gran capacidad de crecimiento, adaptabilidad, tolerancia a contaminantes y habilidad de producir productos de alto valor añadido.

Asimismo, existe un gran potencial en la combinación de procesos de los que las microalgas son partícipes, como la obtención de biodiesel a partir de microalgas que a su vez fijan gases de escape, o la digestión anaerobia para obtención de metano de las microalgas tras haberseles extraído los lípidos u otras sustancias. La combinación de varios procesos mejora la viabilidad económica y medioambiental. En esta línea, existe la posibilidad de combinar la producción de microalgas y el tratamiento de aguas, de modo que se produce un importante ahorro en el consumo de nutrientes, ya que éstos provienen de un agua residual que, por su parte, ha de ser tratada.

El presente trabajo se centra en esta idea, donde los nutrientes del agua son, por un lado, eliminados de ella produciendo un efluente de calidad, y por otro lado, recuperados para el cultivo de microalgas. En un segundo paso, esta biomasa producida se puede aprovechar energéticamente mediante digestión anaerobia, obteniendo una corriente de gas metano y un digerido rico en nutrientes que puede ser aprovechado como enmienda o fertilizante. En los apartados posteriores se detalla el sistema aquí apuntado, y la experimentación de laboratorio en que consiste el presente trabajo pretende a su vez demostrar su viabilidad o fijar las bases para la experimentación a escala piloto.

# III. Algas en depuración. Aplicación e investigación

## 1. Historia

El empleo de las microalgas para la depuración de aguas residuales ha sido promovido desde finales de la década de los cincuenta (Oswald, 1957). En los años 70 se desarrollaron en los EEUU sistemas abiertos de cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, donde se transformaba la biomasa obtenida en metano (Ugwu 2008). Sin embargo, este sistema de tratamiento ha visto frenada la extensión de su uso debido a la gran superficie de terreno que necesita, y a la extensión de otros sistemas como el de fangos activados. Las algas son empleadas en numerosas partes del mundo para el tratamiento de aguas residuales, pero a pequeña escala.

La capacidad de las algas de eliminar nitrógeno y fósforo del agua las convierte sin embargo en una posibilidad real para la eliminación de nutrientes del agua residual. De hecho, se ha demostrado que en la eliminación del fósforo pueden ser tan eficientes como el tratamiento químico convencional (Hoffman, 1998). Sus principales ventajas son el menor coste, ya que no son necesarios productos químicos, y la recuperación de los nutrientes en forma de biomasa que puede ser empleada como fertilizante. Por otro lado, el consorcio algas-bacterias, en que las primeras generan el oxígeno necesario para la respiración de las segundas, cuya descomposición a su vez proporciona los nutrientes necesarios, junto a la energía lumínica, para la fotosíntesis, ha sido estudiado por diversos autores.

Los principales sistemas de depuración con algas son lagunas de estabilización no demasiado extensas, o sistemas de lagunaje de alta carga (*high rate algal ponds* o *HRAP* en inglés). Estos sistemas son canales de oxidación de poca profundidad y con sistemas mecánicos de mezclado, y han demostrado gran eficacia en el tratamiento de agua residual.

Uno de los principales motivos por el que estos cultivos de microalgas no son empleados en el tratamiento de agua residual a gran escala es la dificultad y coste de la separación de la biomasa generada del agua depurada, debido al pequeño tamaño de las algas y su baja densidad en un sistema de canales de oxidación. A este respecto, se ha investigado con especies de cianobacterias filamentosas con alta capacidad de autofloculación, así como con biomasa fijada. Por otro lado, para una eliminación de nutrientes efectiva son necesarias altas productividades de biomasa fotosintética, así como la selección de microalgas que soporten las condiciones del medio y los posibles contaminantes.

Las microalgas clorofíceas han demostrado ser especialmente resistentes a diversas aguas residuales de características diferentes, y muy eficientes en la acumulación de los nutrientes de dichas aguas. En las lagunas de oxidación y las lagunas de alta carga, las especies *Chlorella* y *Scenedesmus* son las más abundantes. La mayoría de estudios, como veremos más adelante, han examinado su crecimiento.

## 2. Lagunaje

Los sistemas de lagunaje de alta carga (*HRAP*) se empezaron a desarrollar en la década de 1950. Son lagunas de 300-600 cm de profundidad que trabajan en el rango de 4–10 días de tiempo de retención hidráulico. Su poca profundidad favorece el crecimiento de las microalgas, debido a la posibilidad de penetración de la luz en todo el volumen. El agua se impulsa normalmente con una rueda a una velocidad de entre 10 y 30 cm/s, consumiendo el total del sistema hasta 0,57 kWh/kg DBO eliminada. Han sido empleados para tratar efluentes de digestión anaerobia de residuos porcinos, o residuos de acuicultura (Olgún 2003).

El efecto de la oscilación de la temperatura y luz solar a lo largo del día y del año es importante en la productividad de las algas, tanto en el sentido limitante como inhibitorio. El cultivo de algas en sistemas de lagunaje con iluminación natural puede presentar por tanto inconvenientes derivados de esta estacionalidad. Otros problemas posibles son la presencia de zooplancton depredador del cultivo (protozoos, hongos, incluso virus).

Como se ha nombrado en el punto anterior, gran número de autores coinciden en que el coste y/o dificultad técnica de separación del agua de la biomasa generada es la principal barrera a vencer en el camino hacia una operación económica de este tipo de sistemas, entendiéndose que ésta pasa por una recuperación de la biomasa generada, ya sea para alimentación animal, aprovechamiento energético, etc. Se ha estudiado la posibilidad de emplear *Spirulina* por su capacidad de floculación, así como del empleo de *Phormidium bohneri* debido a su capacidad de producir agregados multicelulares. Otra estrategia empleada para evitar altos costes de separación de la biomasa es su fijación, que se comenta en el apartado 3.

## 3. Empleo de algas fijadas

Varios microorganismos (*Phormidium*, *Scenedesmus*, *Chlorella*) han sido inmovilizados en matrices sintéticas como acrilamida, poliuretano, resinas, espumas de polivinilo o en polímeros naturales como alginato, carragenato, agar, agarosa, así como en quitosán, un derivado de la quitina, para la eliminación de nutrientes del agua, principalmente amonio, nitrato y ortofosfato, alcanzándose porcentajes de eliminación satisfactorios. En general, las matrices deben ser hidrofílicas, resistentes

física y químicamente para facilitar su uso prolongado, así como fáciles de separar del agua tratada, evitando métodos complejos de inmovilización.

Un estudio llevado a cabo por Ruiz-Marín et al (2010) inmovilizó microalgas de la especie *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* mediante centrifugación y posterior resuspensión del concentrado en una solución con alginato sódico. Al adicionar una solución de cloruro cálcico se forman gotas agregadas de aproximadamente  $3,5 \cdot 10^5$  células cada una, con un diámetro total aproximado de 2,5 mm. Los agregados se lavan y son introducidos en el fotobioreactor, junto con el agua residual, tal que la proporción final es de 1:25 en volumen. Los resultados de eliminación de amonio en ciclos batch oscilan entre 65% y 96%, para aguas residuales artificial y real.

De-Bashan (2010) hace una extensa revisión sobre la capacidad y potencial en depuración de las microalgas inmovilizadas o fijas, desde la eliminación de nutrientes hasta la eliminación de otros compuestos, lo que nos lleva al apartado 4 de esta sección.

#### **4. Capacidad de las algas de eliminar otros compuestos**

Como se ha comentado al hablar de los sistemas de lagunaje (*HRAP*), éstos han sido empleados con éxito en el tratamiento de aguas residuales derivadas de agricultura y ganadería, donde los principales contaminantes son los nutrientes nitrógeno y fósforo. Asimismo, existen referencias del empleo de este tipo de lagunaje para tratar agua residual de industrias de goma, textiles (Lim 2010), mineras y para eliminar metales.

El estudio de Lim comprueba la capacidad que tienen diez especies de microalgas de eliminar tintes azoicos del agua residual, entre las que concluyen que *Chlorella* presenta mejor crecimiento en el agua estudiada. Se comprueba la eliminación de hasta el 50% del color mediante el cultivo del microorganismo en un *HRAP*.

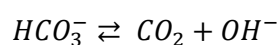
Los microorganismos fotosintéticos son capaces de acumular metales pesados mediante adsorción química, intercambio iónico y quimisorción, enlace covalente, precipitación de superficie, reacciones redox o cristalización sobre la superficie de su pared celular. En ocasiones el metal es transportado al interior de la célula como mecanismo de defensa para evitar su intoxicación, o simplemente como medio para acumular elementos traza necesarios para su desarrollo. Por otro lado, las microalgas son capaces de segregar metabolitos que actúan como agentes quelantes de iones metálicos. Otra razón por la que las aguas tratadas mediante microalgas presentan menor concentración de iones metálicos es la precipitación química debido al aumento de pH asociado a la fotosíntesis.

En un estudio llevado a cabo por Wang y Min (2009) queda patente la capacidad de las microalgas, mayor que de la biomasa bacteriana y fúngica, de eliminar metales como hierro, aluminio, manganeso, magnesio y zinc de cuatro tipos diferentes de agua residual (porcentajes de eliminación entre 56 y 100%).

Respecto a las algas inmobilizadas, como se ha mencionado en el apartado anterior, éstas han demostrado ser capaces de eliminar diversos metales pesados. La completa revisión de de-Bashan (2010) nombra cadmio, cromo, cobalto, oro, iones férricos, plomo, mercurio, níquel, uranio y zinc. Por otro lado, recoge ejemplos de empleo de microalgas en la eliminación de compuestos orgánicos como biocidas, hidrocarburos o surfactantes.

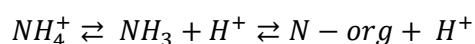
## 5. Eliminación por bioadsorción y precipitación

Durante la fotosíntesis, los iones carbonato del agua proveen a los microorganismos del carbono necesario para su desarrollo, en forma de  $CO_2$ :



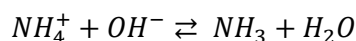
proceso que aumenta el pH.

Por otro lado, el empleo del ion amonio como fuente de nitrógeno disminuye el pH del medio:



Sea que el componente principal de la célula es el carbono, la generación de aniones hidroxilo predomina.

Debido al aumento de pH que acompaña al proceso fotosintético tienen lugar una serie de procesos de eliminación no directamente relacionados con la biología de los microorganismos. La precipitación de óxidos de metales pesados es uno de ellos, y ya se ha comentado anteriormente. Por otro lado, la eliminación de amonio puede tener lugar debido al *stripping* de amoníaco hacia la atmósfera, ya que el equilibrio  $NH_4^+ \leftrightarrow NH_3$  depende del pH del medio, de modo que a pH mayores de 7 se desplaza hacia la producción de amoníaco:



Por su parte, la eliminación de fósforo puede ser debida a la precipitación química, así como a la adsorción a la superficie de las microalgas (Martínez 2000). Diversos autores han llamado la atención sobre este hecho durante el análisis de los resultados de ensayos con microalgas para la depuración de aguas (Wang 2009). Así, se sabe que por ejemplo la relación calcio/fósforo presente en el agua es, junto con el pH, dos factores que controlan el proceso de eliminación de fósforo por precipitación. El incremento tanto de uno como de otro proporciona mayores valores de eliminación de fósforo, que precipita en forma de fosfato cálcico amorfo,  $Ca_3(PO_4)_2$  o cristalino  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  (hidroxiapatita). La presencia de otros iones posibilita la precipitación de otros componentes como estuvita (en presencia de magnesio y amonio)

## 6. Revisión de ensayos

En este último apartado de la sección se muestra una selección de estudios publicados sobre el empleo de microalgas en la depuración de aguas.

### 6.1. Agua residual artificial

Las aguas residuales artificiales permiten un primer estudio simplificado a escala de laboratorio, mediante el cual el análisis de los principales componentes puede hacerse sin necesidad de tener en cuenta variables desconocidas como factores bióticos. La mayoría de medios contienen elevadas concentraciones de determinados nutrientes y no presentan materia orgánica u otras sustancias potencialmente tóxicas. Es por ello que los estudios que comparan el crecimiento de microalgas en aguas reales y artificiales obtienen valores mayores para las aguas artificiales, aunque la eliminación de nutrientes sea similar. Mediante aguas residuales artificiales se eliminan también inhibiciones por sustancias segregadas por otros microorganismos, competencia de otras bacterias por el sustrato o incluso depredación por parte de protozoos. Si bien es cierto que el empleo de aguas residuales artificiales facilita por ejemplo la obtención de parámetros cinéticos y estequiométricos, obviamente la evaluación final de la posibilidad real del empleo de microalgas para la depuración de un agua residual concreta pasa por el estudio y la experimentación con dicha agua.

Aslan (2006) investiga la influencia de la concentración inicial de nitrógeno y fósforo en un agua residual artificial sobre la capacidad de *Chlorella* de eliminar nutrientes en el agua. Determina coeficientes cinéticos (empleando la expresión de Michaelis-Menten) como la constante de reacción  $k$ , constante de semisaturación  $K_m$  y rendimiento  $Y$  tanto para el nitrógeno:

$$k=1,5 \text{ mg N-NH}_4/\text{mg chla}\cdot\text{d} \quad K_m=31,5 \text{ mg/L} \quad Y=0,15 \text{ mg chla/mgN-NH}_4$$

como para el fósforo:

$$k=0,5 \text{ mg P-PO}_4/\text{mg chla}\cdot\text{d} \quad K_m=10,5 \text{ mg/L} \quad Y=0,14 \text{ mg chla/mgP-PO}_4$$

Lodi y Binaghi (2003) estudian la eliminación por parte de *Spirulina platensis* de nitratos y fosfatos de un medio artificial de cultivo, determinando rendimientos de eliminación en función de la temperatura y de la cantidad inicial de microalgas presentes en el inóculo. Los crecimientos obtenidos oscilan desde los 16 a los 42 mg/L·d, la eliminación de fosfatos de 0,2 a 0,6 mg/L·d y la eliminación de nitratos de 1,6 a 4 mg/L·d.

Kong y Li (2010) han cultivado la especie *Chlamydomonas reinhardtii* en laboratorio y en un fotobiorreactor, comparando los resultados con agua artificial y agua residual real tomada en tres puntos diferentes de un tratamiento tradicional. Determinan el efecto que la concentración inicial de los nutrientes tiene sobre su eliminación, así como la influencia de la temperatura, pH y CO<sub>2</sub>.

Yuan y Kumar (2011) han alcanzado altas densidades de *Spirulina platensis* (3,5-3,8 g/L) cultivada en un fotobiorreactor, concluyendo que el sistema muestra un buen potencial para tratar aguas residuales con altas concentraciones de nutrientes (412 mg nitrógeno/L y 90 mg fósforo/L)

Xin et al. (2010) han empleado aguas sintéticas para estudiar la influencia de la forma en que se presenta el nitrógeno en la toma de las microalgas de dicho nutriente, determinando que el amonio posibilita un mayor crecimiento

## 6.2. Agua residual real

Existen numerosas investigaciones que tratan la depuración de agua residual real mediante el cultivo de microalgas. A continuación se comenta una selección de las más recientes.

### 6.2.1. Agua residual urbana

El principal potencial de las microalgas en depuración de agua residual radica en su capacidad de asimilación, y por tanto eliminación del medio, de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. Es por ello que la mayoría de estudios se centran en el uso de las microalgas como tratamiento terciario de las aguas, es decir, aquél tras el cual el agua es devuelta al medio, y previo al cual se ha eliminado la mayor parte de materia orgánica disuelta y suspendida.

En concreto, algunas especies de microalgas verdes presentan especial tolerancia a medios altos en nutrientes. Estas especies son *Chlorella* y *Scenedesmus*, y existe gran cantidad de estudios sobre ellas.

Wang y Min (2009) evaluaron el crecimiento de *Chlorella* en agua residual de cuatro puntos de su proceso de tratamiento: previa a la decantación primaria, tras la decantación primaria, tras el tratamiento de fangos activos, y el sobrenadante de la centrífuga de fangos. Su estudio proporciona datos de velocidades específicas de crecimiento (desde 0,34 d<sup>-1</sup> tras fangos activos hasta 0,95 d<sup>-1</sup> para el sobrenadante) y de eliminación de nutrientes y DQO. También llama la atención sobre el hecho de que las microalgas eliminan aluminio, calcio, hierro, magnesio y manganeso del sobrenadante de la centrífuga.

Wang y Lan (2011) estudian la producción de biomasa y la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana tras su tratamiento secundario mediante el cultivo de *Neochloris oleoabundans*, obteniendo una concentración de biomasa de 2100 mg/L, una producción de 233mg/L·d y una eliminación total de 218 mgN-NO<sub>3</sub>/L y 47 mgPO<sub>4</sub>/L.



Un estudio de Ruiz-Marín (2010) al que ya nos hemos referido anteriormente obtuvo un porcentaje de eliminación de amonio del 100% y 60% en cultivos tipo batch de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

Yang y Li (2011) han conseguido, mediante *Chlorella elipsoidea*, eliminaciones de 99% y 95% de nitrógeno total y fósforo total, respectivamente, al tratar aguas residuales urbanas tras su tratamiento secundario mediante tres configuraciones diferentes (fangos activos, A2O y canales de oxidación).

### **6.2.2. Agua residual de explotaciones ganaderas y agrícolas**

Estas aguas se caracterizan por presentar muy elevadas concentraciones de nutrientes, y diversos estudios han demostrado la capacidad de determinadas especies de microalgas de eliminarlos del medio. Como ejemplo citaremos *Botryococcus braunii*, estudiada por An et al. (2003), *Microspora willeana*, *Ulothrix sp.* y *Rhizoclonium hierglypticum* (Pittman 2011).

Park y Jin (2010) han estudiado el tratamiento mediante el cultivo de *Scenedesmus sp.* de efluentes provenientes de digestión anaerobia de residuos ganaderos, demostrando la capacidad de dicha microalga de eliminar altos contenidos en nutrientes (5-6 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L·d) y la importancia del aporte de carbono inorgánico en forma de alcalinidad del medio, ante la ausencia de inyección de CO<sub>2</sub>.

En una revisión por Markou (2011) se hace referencia a numerosos ejemplos de cultivo de cianobacterias para tratar residuos y aguas residuales de industrias porcinas, de ganado vacuno y de aves.

### **6.2.3. Agua residual industrial**

En el caso de las aguas residuales industriales el principal interés no suele radicar en la eliminación de nutrientes sino en la eliminación de metales pesados (cadmio, cromo, zinc) o compuestos tóxicos orgánicos (hidrocarburos, biocidas, tensioactivos) que pueden ser eliminados por determinadas microalgas, como ya se ha comentado. Debido a que en este tipo de aguas los nutrientes no se encuentran en altas concentraciones, el crecimiento de las algas es más lento y por tanto la cantidad de biomasa generada es menor.

Existen también ejemplos, como un estudio reciente en agua residual de una industria de fabricación de alfombras, donde las microalgas *Chlorella saccharophila*, *Pleurochrysis carterae* y *B. braunii* son sin embargo capaces de generar una cantidad importante de biomasa, que podría ser empleada para usos energéticos según los autores. (Chinnasamy 2010). Para más ejemplos véase el punto 4 de esta sección.



## **IV. Sistema de depuración propuesto**

### **1. Introducción: agua residual urbana. Combinación de tratamiento anaerobio y cultivo de microalgas**

En secciones anteriores se ha presentado la capacidad de las microalgas de eliminación de nutrientes, demostrada por numerosos estudios tanto en aguas sintéticas como en aguas residuales reales. Dada esta capacidad de eliminación de nitrógeno y fósforo, junto con las ventajas también comentadas de aprovechamiento de la energía solar y posibilidad de recuperación de nutrientes, se propone el empleo de un cultivo de microorganismos fotosintéticos como post-tratamiento al tratamiento anaerobio de un agua residual urbana.

El grupo de investigación CALAGUA opera una planta a escala piloto donde se lleva a cabo el tratamiento del agua residual urbana e industrial afluente a la EDAR del Carraixet (Valencia) mediante un biorreactor anaerobio de membranas. El efluente de dicho tratamiento contiene bajos contenidos de materia orgánica pero concentraciones elevadas de nitrógeno amoniacal y fósforo en forma de polifosfatos que es necesario eliminar antes de verter al medio, así como en el caso de pretender una reutilización del agua. Como tratamiento para este efluente se propone el cultivo de microalgas.

Este tratamiento se considera apropiado ya que la combinación de una etapa anaerobia con una etapa de depuración mediante microalgas presenta las siguientes ventajas:

- La etapa anaerobia elimina materia orgánica, a partir de la cual se obtiene energía en forma de biogás. Los organismos fotosintéticos no precisan de dicha materia orgánica para su desarrollo, de modo que es posible generar biomasa de microalgas a partir del efluente disponible sin consumir materia orgánica.
- El efluente de la etapa anaerobia aporta los nutrientes necesarios a las microalgas para su desarrollo, a la vez que es depurado, disminuyendo su concentración en amonio y fosfatos, lo que evita la eutrofización tras su descarga al medio receptor.
- Las microalgas necesitan para su desarrollo una fuente de carbono inorgánico en forma de  $\text{CO}_2$  o de ion carbonato disuelto en el agua. El efluente de la etapa anaerobia presenta una alta alcalinidad en comparación con otros medios de depuración de aguas residuales, como podría ser por ejemplo el proceso convencional de fangos activos con nitrificación-desnitrificación. Dicha alcalinidad es aprovechada por las microalgas en su crecimiento, haciendo de dicho efluente un medio de cultivo adecuado para los microorganismos fotosintéticos.

- La biomasa generada en el reactor de cultivo de microalgas, que ha crecido a expensas de los nutrientes presentes en el efluente del reactor anaerobio, puede ser recirculada a dicho reactor para contribuir a la generación de biogás y recuperación energética del proceso.
- El digerido resultante del proceso anaerobio contiene ahora nitrógeno y fósforo orgánicos que pueden ser recuperados como fertilizante y que mediante otros tratamientos habrían sido expulsados a la atmósfera en forma gaseosa ( $N_2$ ) o habrían precipitado químicamente en forma de sales metálicas (el fósforo).

## 2. Planta piloto: biorreactor de membranas anaerobio

En este apartado se introduce el concepto de BRM anaerobio y se presentan las características del proceso concreto con el que se trabaja en la planta piloto, así como de su agua efluente.

Los **biorreactores de membrana o BRM convencionales** combinan el proceso de fangos activos convencional con un sistema físico de separación por membranas, de modo que la separación del licor mezcla del efluente se lleva a cabo a través de un proceso de separación por membranas. El objetivo de esta combinación es minimizar el volumen de reactor necesario. El proceso de separación física por membranas se caracteriza por una mayor capacidad de retención de sólidos y por tanto el efluente obtenido presenta una concentración de sólidos despreciable y en algunos casos, en función del tamaño de poro de la membrana seleccionada, está exento de bacterias y de patógenos.

El funcionamiento de un **biorreactor de membranas anaerobio** o AnBRM es similar a un BRM con la excepción que en este caso se combina el proceso anaerobio de degradación de la materia orgánica con el sistema de separación por membranas. La principal diferencia es que no se precisa aporte de oxígeno, y que el sistema permanece herméticamente cerrado para el almacenamiento y recolección del biogás producido. Este tipo de sistemas permiten obtener tiempos de retención celular lo suficientemente elevados para el completo desarrollo de la biomasa anaerobia, gracias a la gran capacidad de retención de sólidos que presentan las membranas, evitando además la problemática existente con la sedimentabilidad de los fangos anaerobios.

El tratamiento de aguas residuales vía anaerobia es un proceso secuencial a partir del cual la materia orgánica compleja es degradada a compuestos sencillos sin necesidad de un aceptor de electrones externo, como serían el nitrato u oxígeno en tratamientos por vía anóxica o aerobia. Mediante este proceso, la materia orgánica inicial en el agua residual es transformada biológicamente a metano ( $CH_4$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ).

Los principales beneficios de la tecnología anaerobia de BRM se resumen en:

- Se obtiene un efluente completamente clarificado y prácticamente desinfectado.

- Se minimiza considerablemente la extensión de terreno necesaria para la EDAR (combinación de decantador primario, reactor de fangos y decantador secundario).
- Se reduce la problemática asociada a la decantación del fango.
- Se desacopla y se hacen independientes el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el tiempo de retención celular (TRC), gracias a la separación por membranas.
- No existe consumo energético por aporte de oxígeno al sistema, ya que éste no es necesario.
- Se obtiene una corriente de biogás, lo que supone la recuperación energética de los contaminantes del agua residual.
- Presenta una alta capacidad de eliminación para los sustratos lentamente biodegradables, principalmente a altas concentraciones de materia orgánica, pero también para bajas/medias concentraciones.
- Presenta la posibilidad de potenciar la producción de productos intermedios, como por ejemplo la maximización de producción de hidrógeno.
- Presenta una muy baja producción de fangos en comparación con los procesos aerobios, aproximadamente una producción entre 5 y 10 veces menor.
- Los fangos obtenidos están estabilizados y se pueden aprovechar como fertilizantes.

A continuación se muestra un diagrama de flujo de la planta piloto de biorreactor de membranas anaerobio instalada en la planta del Carraixet y se explican los elementos que la componen:

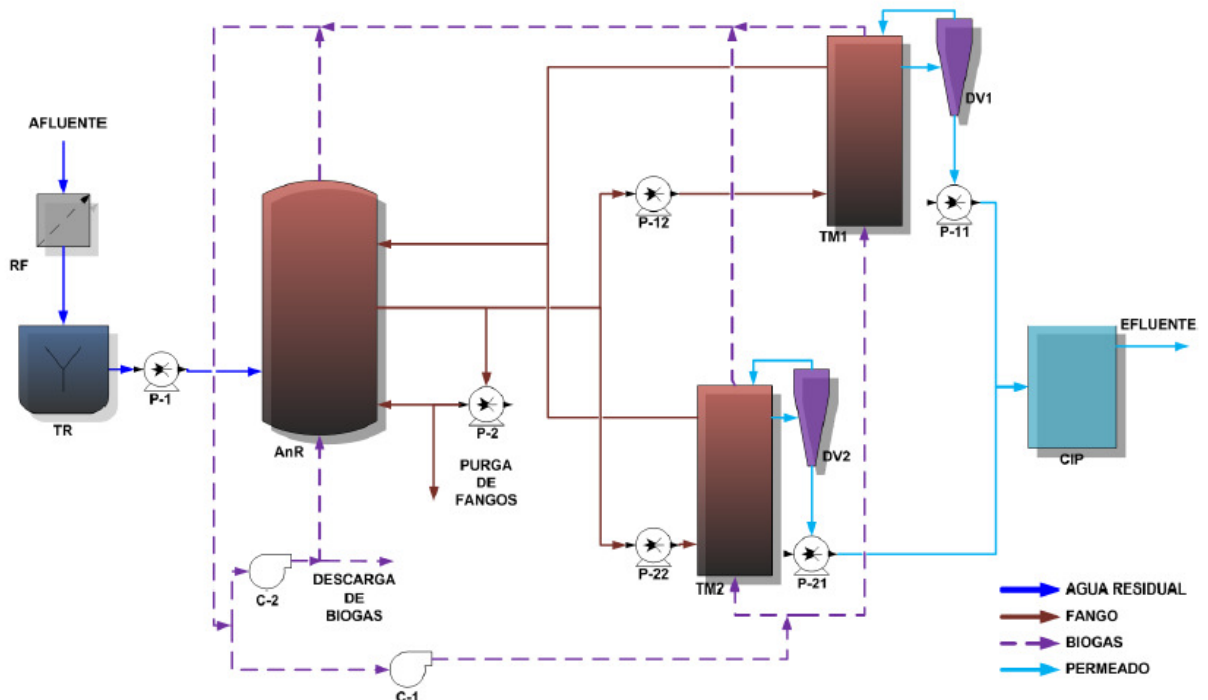


Fig. 16: Diagrama de flujo de la planta piloto

Un rotofiltro (RF) con una luz de paso de 0,5 mm funciona como pre-tratamiento del agua residual, reteniendo las partículas gruesas o fibras que puedan dañar las partes móviles de los equipos o la superficie de las membranas. Un tanque de regulación (TR) amortigua las variaciones en las cargas a lo largo del día y homogeneiza mediante agitación mecánica continua.

El reactor anaerobio cerrado (AnR), que se encuentra encamisado y conectado a un sistema de calefacción externa, tiene una capacidad máxima de trabajo de 1000L y en su espacio de cabeza de 300L se almacena y recoge el biogás. Este tanque se mantiene agitado continuamente mediante la recirculación, por la parte inferior, del biogás producido en el proceso. El biogás es introducido a través de tres difusores de membrana (difusores de burbuja fina). Como elemento adicional de agitación, el reactor consta de una recirculación interna de fangos que a su vez funciona como conducción para la descarga de los mismos cuando sea necesario (purga de fangos en exceso).

Dos tanques de 800 L (TM1 y TM2), donde tiene lugar la filtración del licor de mezcla, contienen las membranas de fibra hueca sumergidas (membranas de ultrafiltración de 0,05  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro) con un área total de filtración por tanque de 30  $\text{m}^2$ . Cada módulo de membranas dispone de un sistema de mezcla mediante la recirculación del biogás producido mediante toberas de burbuja gruesa. El objetivo de esta reintroducción de biogás es la minimización del *fouling* (deposición de partículas sobre la superficie de las membranas), así como la homogeneización del licor mezcla en el interior del tanque. Cada uno de los tanques contiene también un sistema de separación de gases (degasificadores DV1 y DV2) situados a la salida del permeado, que permiten la separación del biogás. Este biogás recuperado es reintroducido al tanque de membrana en etapas posteriores de operación

Existe un tanque CIP (*clean-in-place*) de 200L situado tras los tanques de membranas, donde se almacena una parte del permeado obtenido en las etapas de filtración para posteriores etapas de limpieza física de las membranas.

El sistema de distribución de gases está compuesto por dos soplantes (C1 y C2) que reintroducen el biogás producido tanto en el reactor como en los tanques de membrana. Una válvula de membrana automatizada permite la descarga del biogás en exceso cuando el controlador correspondiente lo determine.

La planta piloto es alimentada con el efluente del pre-tratamiento de la EDAR del Carraixet, que consiste en desbaste (enrejados), desarenador, y desengrasador. Los datos medios de la caracterización del agua afluente y efluente de la planta piloto se muestran en la Tabla 5. Los datos corresponden al período 01-02-2011/11-03-2011.

Se comprueba que, pese a las ventajas enumeradas anteriormente, el sistema de depuración de agua residual urbana mediante tratamiento anaerobio precisa de un segundo paso o postratamiento mediante el cual se disminuyan las concentraciones de amonio y ortofosfato hasta los límites de vertido.

Parámetro	Entrada	Salida puntual
SST (mg/L)	289,14	-
SSV (mg/L)	266,08	-
N-NH <sub>4</sub> (mg/L)	32,77	50,61
P-PO <sub>4</sub> (mg/L)	3,73	6,91
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	316,6	582,1

Tabla 5: Características del agua de entrada y salida a la planta piloto AnBRM

### 3. Proceso de post-tratamiento propuesto

Para la eliminación de los nutrientes del agua residual tratada anaeróbicamente se propone un cultivo de microalgas, que se estima apropiado debido a la alta concentración de nutrientes y alcalinidad del agua y su bajo contenido en materia orgánica. El cultivo de microalgas se plantea por tanto como un tratamiento que completa y complementa el que se lleva a cabo actualmente en el biorreactor de membranas anaerobio. Esto es así ya que por un lado elimina nitrógeno y fósforo del agua obtenida tras el tratamiento anaerobio, y por otro lado genera como consecuencia una cantidad significativa de materia orgánica que aumenta la producción de biogás.

La eliminación de nutrientes y generación de energía a partir de estos compuestos inorgánicos convierte este tratamiento en una interesante alternativa a los tratamientos tradicionales. Además, esta eliminación de nutrientes tiene lugar sin necesidad de aporte de oxígeno y por tanto supone un ahorro de su consumo energético asociado, que sería necesario en un tratamiento convencional.

El sistema de cultivo propuesto consiste en un fotobiorreactor donde se desarrolla la biomasa algal, seguido de un proceso de separación de dicha biomasa generada mediante membranas, de modo que ésta es recirculada al tratamiento anaerobio. La aplicación de procesos de membranas permite obtener efluentes de alta calidad que hacen posible su reutilización para diferentes usos agrícolas e industriales y controlar el estado fisiológico de las algas al desacoplar los tiempos de retención hidráulico y celular.

El presente trabajo consiste en la primera experimentación al respecto de este tratamiento propuesto, de modo que, a escala de laboratorio, se diseña y opera un montaje compuesto por un fotobiorreactor y una etapa de filtración con membranas. Mediante este montaje, como se explicará en la sección V, se pretende comprobar la viabilidad del cultivo de microalgas con el agua efluente de la planta piloto de tratamiento anaerobio, así como obtener unos resultados previos de eliminación de

nutrientes. Por otro lado, el montaje debe servir para adquirir una mínima experiencia respecto del cultivo de microorganismos fotosintéticos, así como de base para un futuro diseño del sistema a escala piloto. Una aproximación a dicho diseño del sistema a escala piloto sería la siguiente:

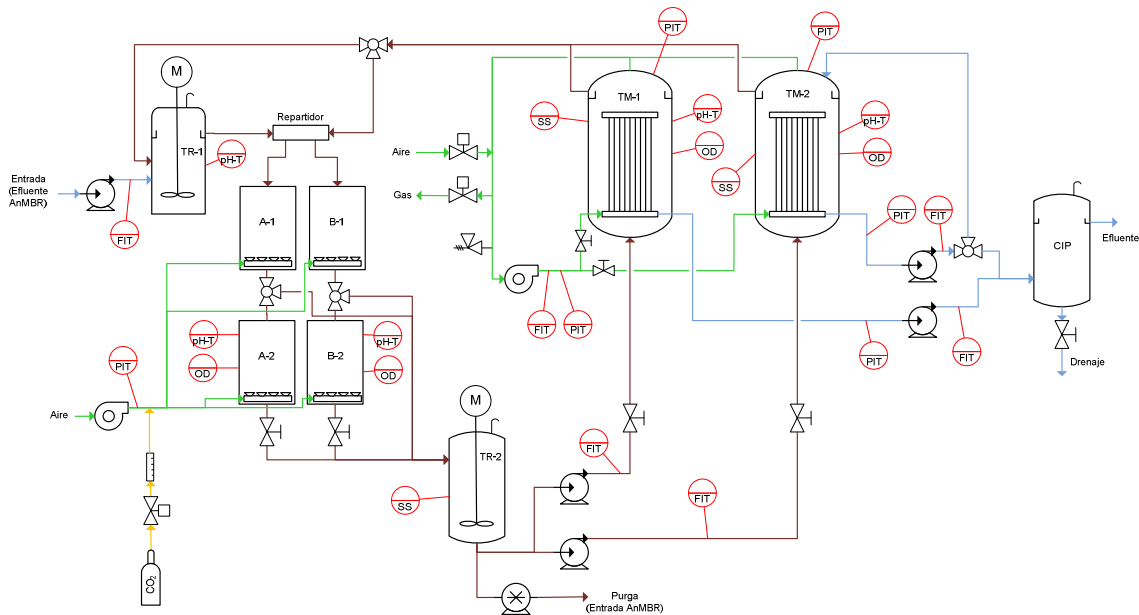


Fig. 17: Diagrama de flujo del tratamiento propuesto

En el diagrama de flujo preliminar (Fig. 17) se aprecia el tanque de regulación (TR), que homogeneiza el efluente de la planta de tratamiento anaerobio, seguido de los fotobiorreactores (A-1, A-2, B-1 y B-2). Mediante un sistema de inyección de gases se introduce aire enriquecido en  $\text{CO}_2$  a los reactores, para aportar a las microalgas el carbono inorgánico que no aporta la alcalinidad del agua residual, así como para regulación del pH del cultivo. En ellos la luz del Sol es aprovechada por las algas para su crecimiento, durante el cual toman los nutrientes del agua. Tras un segundo tanque de regulación (TR-2), el cultivo pasa a los tanques de membrana TM-1 y TM-2, donde es filtrado y la biomasa devuelta al fotobiorreactor. La purga del sistema, así como la recirculación al tratamiento anaerobio existente, se realiza desde el tanque de regulación TR-2.

Las ventajas de este sistema son fundamentalmente dos: por un lado, el fósforo y nitrógeno se eliminan del agua, de modo que se cumplen los requisitos de vertido y se previene la eutrofización del medio. Los nutrientes se recuperan en la formulación del digerido resultante del tratamiento anaerobio, de modo que es posible su uso en la agricultura como fertilizante (directamente o tras una separación sólido/líquido). Por otro lado, se consigue un aumento considerable en la producción de metano, lo cual supone un aumento de la eficiencia energética del proceso global combinado, siempre y cuando el consumo de energía aumente en menor medida, lo que es esperable. Se mejora de este modo la calidad del agua tratada, el aprovechamiento de los nutrientes en ella originalmente presentes, y el aprovechamiento energético.



# V. Puesta en marcha de un fotobiorreactor en el laboratorio

## 1. Objetivo

Como se indicó en la sección I, el objetivo del montaje en el laboratorio de un fotobiorreactor es doble: por un lado, comprobar la viabilidad de un cultivo de algas autóctonas en condiciones controladas de luz, temperatura y nutrientes; por otro lado, y a su vez, llevar a cabo este cultivo de modo que el aporte de nutrientes se haga a partir del agua efluente de un sistema de tratamiento de aguas residuales ya existente, tal que se compruebe el grado de depuración alcanzado por parte de las microalgas sobre dicho efluente.

El sistema de tratamiento existente consiste en un biorreactor de membranas anaerobio, descrito en la sección IV, que elimina la mayor parte de la materia orgánica de un agua residual urbana, pero cuyo efluente presenta concentraciones de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) y de fósforo en forma de ortofosfatos ( $\text{P-PO}_4$ ) que superan los límites de vertido. Son estos nutrientes, por tanto, los que se pretenden eliminar mediante el cultivo de microalgas. Dicho efluente presenta también una característica interesante para el cultivo de microalgas: su elevada alcalinidad, que permite a éstas tomar el carbono inorgánico que precisan para su desarrollo, o parte de éste, en forma de carbonatos presentes en el medio.

## 2. Descripción del montaje

El principal montaje de laboratorio consiste en el fotobiorreactor: un reactor cilíndrico de 6 litros de volumen útil, iluminado uniformemente en su superficie por tubos fluorescentes. El reactor está agitado y dispone de un módulo de membrana de fibras huecas sumergidas, a través de las cuales se introduce el alimento y se filtra el agua tratada.

Por otro lado, durante la puesta en marcha del montaje se ha instalado y hecho uso de un sistema de filtración con membranas tubulares para concentrar la muestra inicial de algas tomada y obtener un cultivo viable.

A continuación se detallan ambos sistemas.

## 2.1 Sistema de concentración inicial del cultivo

Para la concentración del cultivo durante su puesta en marcha se han empleado dos módulos de membranas tubulares NORIT X-Flow 38GRHF5385. Sus características se detallan a continuación:

- Material: PVDF
- Área total: 0,025 m<sup>2</sup>
- Tamaño de poro: 0,03 μm
- Estructura tubular: 1m de longitud y 8mm de diámetro

El montaje durante la concentración del cultivo se muestra en la Fig. 18: **Montaje de laboratorio para concentración inicial de la muestra:**

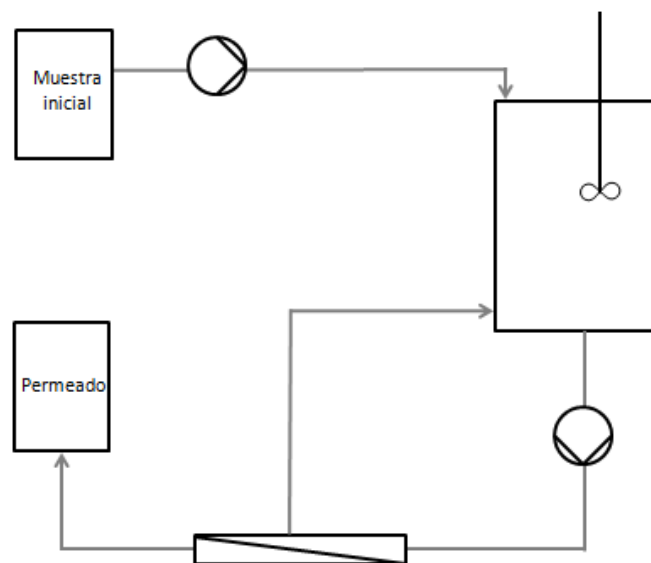


Fig. 18: Montaje de laboratorio para concentración inicial de la muestra

Mediante dicho montaje se alimenta de forma continua y con ayuda de una bomba peristáltica el agua procedente de la toma de muestra inicial al reactor. Esta muestra es tomada en la Albufera (Valencia), como se detalla más adelante. Del fotobiorreactor se extrae a su vez mediante una bomba centrífuga, que impulsa el cultivo a través de la membrana, de modo que el rechazo, donde se encuentran los microorganismos, es devuelto al reactor. El permeado se descarta.

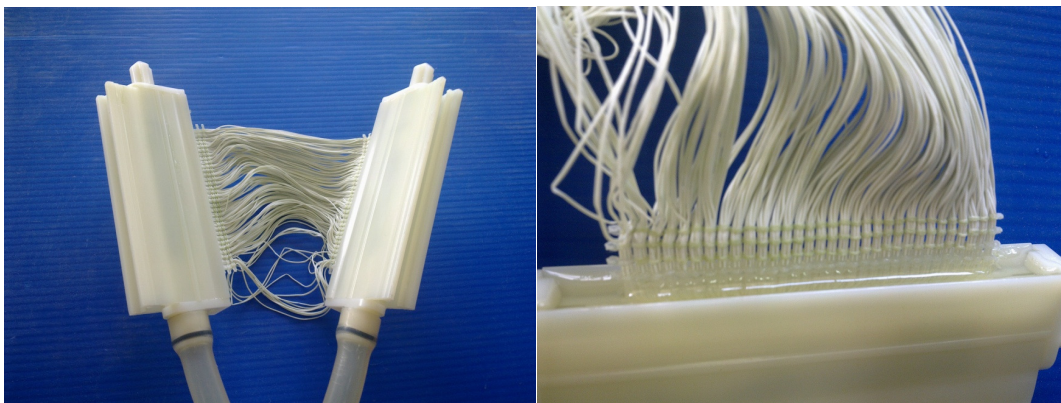
## 2.2 Fotobiorreactor

El fotobiorreactor para el cultivo de las microalgas autóctonas tomadas de la Albufera consiste de:

- Reactor cilíndrico de metacrilato de 20 cm de diámetro y altura total de 54 cm. Volumen total 10,3L, Volumen útil 6L. Área iluminada: 0,156 m<sup>2</sup>. El reactor se encuentra en el interior de una cámara climática que mantiene la temperatura constante a 20°C.
- Agitador de paleta plana de velocidad de giro 135 rpm.
- Membrana:

La configuración de la membrana es de fibras huecas, que el efluente permeado atraviesa desde el exterior hacia su interior. Sus características se detallan a continuación:

Fabricante:	Mitsubishi Rayon
Superficie total:	0,1125 m <sup>2</sup>
Tamaño de poro:	0,1 μm



*Fig. 19: Membrana empleada  
izqda: vista general, dcha: detalle de las fibras*

La membrana se sumerge manualmente en el reactor para la filtración del agua de salida, que es separada así del cultivo de microalgas. Funciona con un tiempo de 120 segundos de filtración y 20 segundos de contralavado, para evitar un ensuciamiento rápido u obstrucción (*clogging*) de la membrana.

Con el mismo objetivo se realiza la alimentación del tanque a través de las fibras huecas, mediante contralavado. Asimismo, mientras no es necesario su uso, la membrana se mantiene en un recipiente auxiliar con agua desionizada para prevenir el ensuciamiento.

- Bomba peristáltica Watson Marlow: conectada a la parte superior del módulo de membrana y a un depósito de contralavado, se emplea tanto para succión (producción de permeado) como para impulsión (contralavado) ya que es capaz de cambiar el sentido de giro, según se establezca mediante el programador (Logo! 230RC de Siemens). También es posible regular la velocidad de giro de la bomba.
- Sistema de iluminación: 3 tubos fluorescentes PHILIPS TL Mini 8W/54-765 colocados verticalmente mediante soporte de aluminio, y dispuestos alrededor del reactor según la Fig. 20: **Disposición del sistema de iluminación**

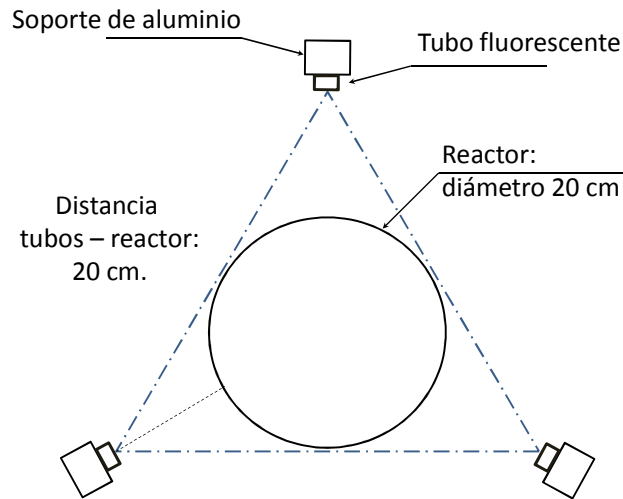


Fig. 20: Disposición del sistema de iluminación

- Sistema de seguimiento de las condiciones del cultivo mediante sondas y dispositivo de adquisición de datos:
  - Analizador multiparámetro: Consort C832
  - Sonda de pH
  - Sonda de potencial redox
  - Sonda de conductividad
  - Sonda de oxígeno
  - PC

En las Fig. 21 y Fig. 22 se muestra el funcionamiento del montaje, tanto en alimentación al reactor con el agua efluente de la planta piloto de tratamiento anaerobio como en la etapa de filtrado para obtención del efluente.

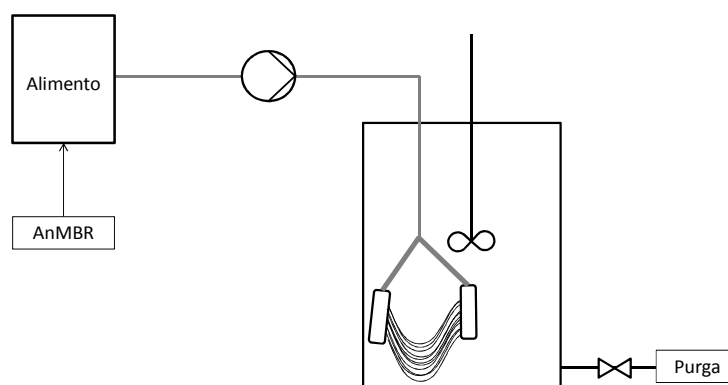


Fig. 21: Alimentación del fotobiorreactor con el agua efluente del AnBRM

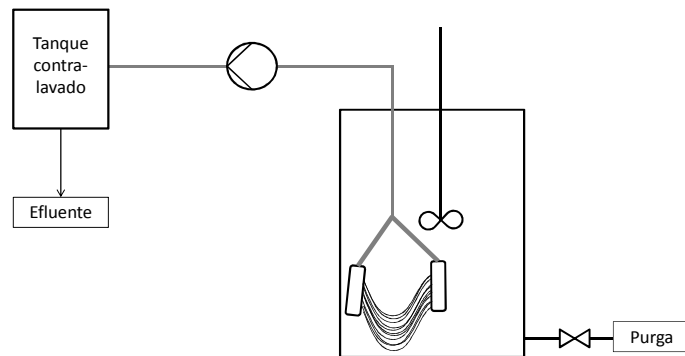


Fig. 22: Obtención del efluente del cultivo de microalgas mediante filtración

### 3. Métodos analíticos

#### ○ **Análisis de nutrientes:**

Para el análisis del nitrógeno amoniacal ( $N-NH_4^+$ ), nitrito ( $N-NO_2^-$ ), nitrato ( $N-NO_3^-$ ) y fosfato ( $P-PO_4^{3-}$ ) se ha empleado un analizador discreto automático de Westco Scientific Instruments: Smartchem 200 (Analyzer Medical System).



Fig. 23: Smartchem

- Amonio: rango de medida de 0 a 10 mg/L. Método conforme con US EPA 350.1 y Standard Methods 4500-NH3-G.
- Nitrito: 0 a 20 mg/L. Método conforme con US EPA 354.1 y Standard Methods 4500-NO2-B.
- Nitrato: 0 a 20,33 mgN/L. Método conforme con Standard Methods 4500-NO3-H.
- Fosfato: 0 a 10 mg/L. Método conforme con US EPA 365.1 y Standard Methods 4500-P-F.

#### ○ **Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad**

Para la determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad se ha utilizado el método de valoración ácido-base de 5 puntos propuesto por Moosbrugger et al. (1992) para la determinación de la concentración de ácidos volátiles de cadena corta (mg HAc/L) y alcalinidad (mg  $CaCO_3/L$ ).

El procedimiento consiste en la valoración con HCl 0,1N de la muestra filtrada por papel filtro estándar. Se determinan los volúmenes de valorante necesarios para alcanzar los puntos de pH 6,70, 5,90, 5,20 y 4,30 sucesivamente. Esto se realiza de manera automática mediante el equipo Methom 716 DMS Titrino. La concentración de los ácidos volátiles y de la alcalinidad de la muestra se calculan mediante un programa informático distribuido por los propios autores del método analítico, basado en el equilibrio químico de las especies involucradas, tomando en cuenta no sólo los AGV y los carbonatos, sino también los fosfatos, el amonio y los sulfuros, que se presentan comúnmente como ácidos o bases débiles en el agua.

- **Determinación de demanda química de oxígeno**

La DQO se determina mediante el método colorimétrico, para lo cual se ha empleado un espectrofotómetro de UV/VIS: Spectroquant® Pharo 300 con un rango de longitudes de onda 190-1100, lámpara de Xenon y +- 1 nm de precisión.

- **Determinación de sólidos suspendidos**

Se emplea la metodología gravimétrica propuesta por Standard Methods (ME 2540-D). La concentración de sólidos suspendidos totales (SST) se determina así mediante la eliminación de la humedad a 105°C de una muestra filtrada. Después de someter los SST a una temperatura de 550°C, la pérdida de peso se debe a los sólidos suspendidos volátiles (SSV).

- **Determinación de fósforo total**

Para la determinación de fósforo total de las muestras se realiza una digestión ácida previa mediante la cual los polifosfatos y el fósforo orgánico son convertidos a ortofosfatos. La determinación de fosfatos se realiza como ya se ha explicado en el análisis de nutrientes.

- **Determinación de clorofila**

La concentración de pigmentos fotosintéticos es un parámetro extensamente empleado para la cuantificación de fitoplancton fotosintéticamente activo. Todas las plantas verdes contienen clorofila a. En el caso de las algas fitoplanctónicas ésta constituye entre un 1 y 2% de su masa en peso seco. Por tanto, la medida de clorofila a en un cultivo proporciona una idea razonablemente buena sobre la cantidad de biomasa presente en él. Sin embargo, existen algunos motivos por los que no es posible correlacionar inequívocamente un valor de concentración de clorofila con un valor de concentración de microalgas. Por un lado, no se trata en este caso de un monocultivo, y la cantidad de clorofila a presente en las células varía de una especie a

otra. Por otro lado, la cuota celular de clorofila es además variable intra-específicamente, es decir, presenta variaciones dentro de una misma especie, dependiendo de su etapa en el crecimiento celular y de las condiciones a las que las microalgas estén sometidas. Es lo que se llama fotoaclimatación: las microalgas son capaces de ajustar el contenido celular en clorofila antes cambios ambientales en el espacio y el tiempo. Así, un aumento de la concentración de clorofila significará que la cantidad de microalgas aumenta, que ha tenido lugar una resuspensión de células algales sedimentadas, o que ha aumentado la fotosíntesis al disminuir la turbidez o aumentar la radiación recibida. Una disminución de concentración de clorofila indica que la cantidad de fitoplancton del medio ha disminuido, que la turbidez ha aumentado o que hay menos nutrientes disponibles en el medio.

Por otro lado, cabe tener en cuenta que los métodos ópticos de determinación de clorofila a pueden sobre o infravalorar su concentración, ya que las bandas de absorción o fluorescencia se solapan con aquellas de otros pigmentos (como se ha explicado, otros pigmentos que se encuentran en el fitoplancton son la clorofila b y c, ficobilinas y carotenoides) o de productos de degradación de la clorofila (clorofilidas, feofitinas y feofórbidas).

El método empleado para la determinación de clorofila ha sido el tricromático basado en espectroscopía visible.

Para ello, se ha empleado el siguiente material:

- Filtro de acetato de celulosa (47mm) de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.
- Bomba de vacío.
- Quitasato y embudo de filtración.
- Centrífuga Eppendorf 5804.
- Tubos Falcon.
- Acetona para la extracción: se ha preparado una mezcla de acetona de grado reactivo al 90% con agua destilada que contiene una concentración de  $\text{CaCO}_3$  del 10% en peso, cuyo objetivo es basificar la acetona.
- Espectrofotómetro de UV/VIS: Spectroquant® Pharo 300 con un rango de longitudes de onda 190-1100, lámpara de Xenon y  $\pm 1$  nm de precisión.

El procedimiento se describe a continuación:

- Un volumen conocido de muestra (en nuestro caso 30 mL) se filtra a través de un filtro de acetato de celulosa.
- El filtro se congela en un tubo a una temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ , con objeto de romper las células que contienen la clorofila.
- Pasadas 24 horas se añade al tubo que contiene el filtro con la biomasa congelada un volumen conocido de acetona al 90%. En nuestro caso este volumen es de 18-16 mL.
- Pasadas 24 horas la acetona ha extraído la clorofila, que se encuentra disuelta en ella. Los tubos se centrifugan a 3500 rpm durante 5 minutos.
- El sobrenadante se separa y se lleva al espectrofotómetro, donde se mide su absorbancia a las siguientes longitudes de onda (nm): 630, 647, 664 y 750, donde ésta última se emplea como corrección por turbidez. Las medidas de

absorbancia deben realizarse con diligencia y tapando la cubeta mientras está en el espectrofotómetro, ya que la acetona es un disolvente muy volátil y su evaporación cambia la concentración de clorofila en la muestra.

- Se comprueba que la absorbancia a 664nm queda comprendida entre 0,1 y 1. Si no es así se procede a su dilución o se toma nota para realizar una próxima extracción menos diluida (filtrado de un mayor volumen, o extracto de menor volumen de acetona).
- Se aplica la ecuación de Jeffrey y Humprey para conocer la concentración de clorofila en el extracto:

$$chl a = 11,85 \cdot (A_{664} - A_{750}) - 1,54 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 0,08 \cdot (A_{630} - A_{750})$$

Donde  $A_i$  representa la absorbancia en la longitud de onda  $i$ .

- Por último, solo queda calcular la concentración real de clorofila  $a$  en la muestra, conociendo su volumen y el volumen del extracto:

$$Chl a \left( \frac{mg}{m^3} \right) = \frac{chl a \cdot V \text{ extracto } (L)}{V \text{ filtrado } (m^3)}$$

Una comprobación que puede hacerse es medir la absorbancia a 665nm tras haber acidificado la muestra (con HCl hasta no más de 0,003M), para determinar si existe feofitina: muestras con una relación entre la absorbancia a 664nm antes de acidificar y la absorbancia a 665nm después de acidificar de 1,7 no contienen feofitina y están en buenas condiciones fisiológicas. Si la relación es menor, hay feofitina, un compuesto de alteración de la clorofila por pérdida del átomo de magnesio.

#### ○ **Determinación de las comunidades fitoplanctónicas**

Para la identificación y el recuento de los principales grupos taxonómicos de microalgas se emplea la microscopía de epifluorescencia empleando 1000 aumentos y contando al menos 300 células y 100 de la especie o género más abundante para obtener un error menor al 20%. El procedimiento es el siguiente:

- La muestra se fija con glutaraldehído hasta una concentración final del 2%.
- Se filtra un volumen conocido a través de un filtro de policarbonato de 0,2  $\mu m$  de tamaño de poro (25mm).
- Se eliminan las sales con agua destilada.
- Se lava la muestra filtrada con etanol acuoso al 50, 80, 90 y 100% sucesivamente.
- Se seca el filtro y se prepara con aceite de inmersión para su observación microscópica.

El microscopio empleado es Leica DM2500 con una cámara de color y de ultra alta resolución (12MPíxeles) acoplada, con técnica de múltiples disparos, con el objetivo de



inmersión 100x y como se ha explicado, a 1000 aumentos. Con los conteos se calcula la densidad celular (cel/L) de cada grupo taxonómico y su porcentaje en abundancia.

Esta determinación ha sido llevada a cabo por personal del IIAMA (Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente) de la Universidad Politécnica de Valencia.

○ **Identificación de las poblaciones microbianas**

La técnica empleada para la identificación de las bacterias nitrificantes y metanotróficas ha sido el método FISH, o de hibridación fluorescente *in situ*.

El método se describe en Borrás (2008). Se utilizaron sondas generales para la identificación y seguimiento microbiológico de las bacterias. En la Tabla 6 se presentan el nombre de la sonda, la secuencia de nucleótidos de la sonda, la bacteria señal y la referencia donde ha sido descrita la sonda.

Sonda	Secuencia (5'-3')	Organismo	Referencia
EUB 338-I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Eubacteria</i>	Amman et al., 1990
NSO1225LNA	CGCCA†TGTA†TACG†GTGA	Bacterias amoniooxidantes (Betaproteobacteria)	
Ma464	TTATCCAGGTACCGTCATTA	Metanotróficas tipo II. <i>Methylocystaceae</i> (α-proteobacteria)	Eller et al. 2001
Mg84	CCACTCGTCAGCGCCCGA	Metanotróficas tipo I. <i>Methylococcaceae</i> (γ-proteobacteria)	Eller et al. 2001

Tabla 6: Sondas generales para identificación de bacterias nitrificantes y metanotróficas

Los reactivos y procedimiento se detallan a continuación:

• **Reactivos:**

- Tampón fosfato salino (PBS)

22.8 g de NaCl  
 3 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 2.88 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 1000 mL de agua destilada  
 Ajustar a pH 7,4  
 Primero disolver los fosfatos, y luego el cloruro sódico.  
 Esterilizar por filtración con 0,45 μm o 0,2 μm.  
 Conservar a 4°C.

- Paraformaldehído (para la fijación)
  - Calentar 65 mL de agua bidestilada hasta 60°C.
  - Añadir 4 g de paraformaldehído (PFA).
  - Añadir 1 gota de solución de NaOH 2M y agitar rápidamente hasta que la solución se haya clarificado.
  - Quitar de la fuente de calor y añadir 33 ml de PBS 3X.
  - Ajustar el pH a 7,2 con HCl.
  - Eliminar cualquier resto de cristales por filtración a través de 0.2 µm.
  - Enfriar rápidamente a 4°C y conservar a esa temperatura.
  
- Solución de gelatina (para la preparación del portaobjetos):
  - 100 mg de gelatina al 0.1 %
  - 10 mg de sulfato potásico cromato al 0,01 %
  - Calentar agua destilada a 60°C.
  - Fundir en 100 mL de agua destilada.
  - Enfriar a 50°C para sumergir los portas.
  
- Etanol 100% (para la fijación y el lavado):
  - Reactivo etanol absoluto grado PRS.
  - Guardar a temperatura ambiente para lavados.
  - Guardar en congelador para fijación.
  
- Etanol 80% (para el lavado)
  - 160 mL de etanol absoluto.
  - 40 mL de agua destilada.
  - Guardar a temperatura ambiente.
  
- Etanol 50% (para el lavado)
  - 100 mL de etanol absoluto.
  - 100 mL de agua destilada.
  - Guardar a temperatura ambiente.
  
- Cloruro Sódico 5M (tampón de hibridación y tampón de lavado)
  - 292,2 g de cloruro sódico
  - 1000 mL de agua destilada.
  - Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar volumen hasta 1L
  - Distribuir en alícuotas.
  - Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración.
  
- EDTA 0,5M (cuando la concentración de formamida es  $\geq 20\%$ )
  - Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración.
  
- Tris-HCl 1M pH 8,0 (tampón de hibridación y tampón de lavado)
  - Pesar 121,1 g de tris base.
  - Añadir a 800 ml de agua destilada.

Añadir 42 mL de HCl concentrado.  
 Llevar a 1 L con agua destilada.  
 Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración.

- Agua Mili-Q (tampón de hibridación y tampón de lavado)  
 200 ml de agua Mili-Q  
 Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración
- SDS 10% (tampón de hibridación y tampón de lavado)  
 10 g de SDS.  
 Llevar a 100 mL con agua destilada.  
 Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y por filtración.
- Formamida (tampón de hibridación y tampón de lavado)  
 Volúmenes de formamida y porcentaje en función de la sonda.  
 Guardar a temperatura ambiente.
- Tampón de hibridación  
 Preparar en un tubo de microcentrífuga de 2 mL:  
 360 µL NaCl 5M  
 40 µL HCl-Tris 1M  
 Formamida  
 Agua Mili-Q  
 2 µL SDS 10%

donde las cantidades de formamida y agua mili-Q dependen de la concentración final que se desee, determinada por la sonda. En nuestro caso se han empleado concentraciones de 45% y 20% de formamida, por lo que las cantidades necesarias para los 2 mL han sido:

% Formamida	µL Formamida	µL Agua Mili-Q
20	400	1198
45	900	698

*Tabla 7: Volúmenes necesarios de formamida y agua mili-Q*

- Tampón de lavado  
 Preparar fresco en un tubo de 50 mL:  
 NaCl 5M: 2150 µL para 20% de FA y 300 para 45% de FA  
 500 µL EDTA  
 1000 µL HCl-Tris 1M  
 Enrasar a 50 mL con agua mili-Q
- Sondas marcadas  
 Concentración de sonda stock y trabajo.  
 Rango de concentración de trabajo entre 25 y 50 ng.

- Vectashield  
Reactivo para evitar pérdida de fluorescencia
- **Fijación de las muestras GRAM negativas con paraformaldehído (PFA) y lavado**  
Centrifugar 1mL de muestra (5000 rpm durante 3min).  
Reemplazar 750  $\mu$ L de sobrenadante por PFA.  
Mantener a 4°C durante 1 – 3 h.  
Centrifugar (5000 rpm durante 3 minutos) y reemplazar el sobrenadante por PBS.  
Resuspender y repetir el paso anterior.  
Resuspender, centrifugar y reemplazar el sobrenadante por una solución etanol – PBS al 50%.  
Guardar a –20°C (se pueden conservar varios meses).
- **Fijación de las muestras GRAM positivas con paraformaldehído (PFA) y lavado**  
Centrifugar 1ml de muestra (5000 rpm durante 3min).  
Reemplazar 500  $\mu$ L de sobrenadante por etanol.  
Mantener a 4°C durante 4 – 16 h.  
Centrifugar (5000 rpm durante 3 minutos) y reemplazar el sobrenadante por PBS.  
Resuspender, centrifugar y reemplazar el sobrenadante por una solución etanol – PBS al 50%.  
Guardar a –20°C (se pueden conservar varios meses).
- **Aplicación de las muestras a los portaobjetos FISH**  
Poner un volumen de 6-8  $\mu$ L de muestra fijada en el portaobjetos.  
Secar unos minutos en estufa 48°C.  
Deshidratar en etanol al 50% durante 3 minutos (por inmersión).  
Deshidratar en etanol al 80% durante 3 minutos (por inmersión).  
Deshidratar en etanol absoluto durante 3min (por inmersión).  
Secado al aire.  
Los portas pueden ser conservados deshidratados.
- **Hibridación in situ**  
Preparar la solución de hibridación con formamida en un Eppendorf de 2mL.  
Colocar 8  $\mu$ L de solución de hibridación en cada pocillo de un porta.  
El resto de la solución de hibridación se emplea para empapar un papel en el interior de un tubo Falcon, que será empleado como cámara de hibridación.  
Colocar 1  $\mu$ L de sonda en cada pocillo, preservando de la luz. Se pueden colocar más de una sonda en cada pocillo.  
A partir de ahora el porta ha de ser preservado de la luz.  
Introducir el porta en la cámara de hibridación en posición horizontal.  
Manteniendo la posición horizontal, incubar a 48°C entre 1 y 2 h.

Preparar 50 mL de la solución de lavado en un tubo Falcon y atemperar a 48°C en un baño.

Transferir el porta desde la cámara de hibridación en la estufa al interior de la solución de lavado atemperada a 48°C, lavándolo previamente con la solución.

Lavar con agua mili-Q fría.

Secar al aire en posición horizontal.

Guardar a -20°C.

- **Observación**

Los portaobjetos se examinan utilizando un microscopio óptico con fluorescencia Leica DM2500, empleando los filtros adecuados según los fluorocromos utilizados. El microscopio está dotado de una cámara digital Leica DFC420C con la que se han tomado las imágenes.

## 4. Procedimiento experimental

### 4.1. Toma de muestras para la obtención de microalgas (I)

En primera instancia se ha realizado una toma de muestra de agua superficial en dos puntos de muestreo en la Comunidad Valenciana. El primer punto corresponde al río Júcar, inmediatamente aguas arriba del Azud de la Marquesa (término municipal de Cullera) y el segundo punto corresponde a la laguna de la Albufera, en el embarcadero en su orilla Este (Ctra. CV-500 km 10,5. Término Municipal de Valencia).

Se ha determinado la concentración de clorofila en las muestras y a continuación se ha realizado un recuento aproximado de microorganismos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Punto	Clorofila a (mg/m <sup>3</sup> )	Procariotas (cel/L)	Procariotas (mayoritarias)	Eucariotas (cel/L)	Eucariotas (mayoritarias)
Albufera	107	1,1·10 <sup>9</sup>	Cianobacterias filamentosas y coloniales	8,0·10 <sup>7</sup>	Diatomeas y Clorofíceas ( <i>Monoraphidium</i> , <i>Pediastrum</i> y <i>Scenedesmus</i> )
Azud	23,33	1,2·10 <sup>7</sup>		1,3·10 <sup>7</sup>	Criptofíceas y Diatomeas

Tabla 8: Toma de muestras inicial. Recuento aproximado de microorganismos

Se observa que tanto la concentración de clorofila como el conteo de microorganismos es mayor en el agua proveniente de la Albufera. Se decide por tanto poner en marcha el cultivo a partir de dicha muestra tomada en la Albufera, a la que se le realiza un recuento exhaustivo:

<b>Microalgas</b>	<b>células/L</b>	<b>% eucariotas</b>
Diatomeas	34.025.962	43,2
Clorofíceas	33.164.545	42,1
Prasinofíceas	3.876.375	4,9
Criptofíceas	3.661.021	4,6
Dinoflagelados	430.708	0,5
Primnesiales	861.417	1,1
Otras	2.799.604	-
Cianobacterias	1.092.600.461	-
Picocianobacterias	15.074.793	-
Eucariota total	78.819.634	-
Relación procariotas/eucariotas	14,1	

*Tabla 9: Toma de muestras inicial. Recuento exhaustivo de microorganismos del agua de la Albufera*

Se observa que predominan las algas diatomeas y clorofíceas, así como que la cantidad de microorganismos procariotas es mayor que la de eucariotas, con un factor algo mayor que 14. Estos microorganismos procariotas son principalmente cianobacterias, que como se ha visto, presentan actividad fotosintética.

## **4.2. Puesta en marcha del cultivo en el laboratorio (I)**

En una primera fase se pretende empezar el cultivo en el laboratorio a partir del agua tomada de la Albufera directamente. Se añaden al reactor 6L de dicha agua y 1L de una dilución 1:10 del efluente de la planta anaerobia. Se mantiene la agitación en marcha y el sistema de iluminación en funcionamiento 24 h al día. La concentración inicial del cultivo se anota como t=0 (Tabla 10). El reactor se analiza a las 66 horas (t=66), cuando se comprueba que el amonio ha sido nitrificado. El pH en este período oscila alrededor de 9.

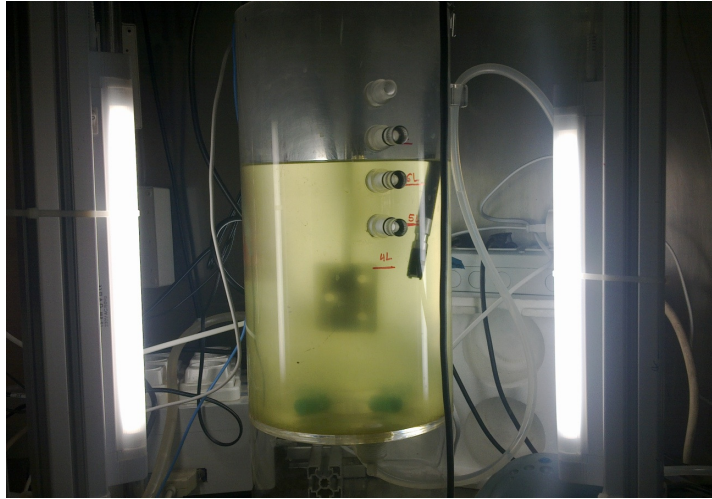


Fig. 24: Cultivo de la muestra tomada

A las 73 horas se adicionan de nuevo 100 mL de salida puntual de la planta de tratamiento anaerobia (SP73), y a las 98 horas se añaden 1300 mL (SP98). De este modo se pretende adaptar los microorganismos presentes a las características del agua efluente del AnBRM. La adición de 1300 mL hace disminuir el pH a 7,7, ya que la salida de la planta anaerobia tiene un pH menor que el cultivo. A su vez, el oxígeno disminuye hasta condiciones anaerobias, presumiblemente consumido por las bacterias que haya presentes en el reactor, que lo emplean para degradar rápidamente los ácidos grasos volátiles que han entrado con el alimento. En la Fig. 25 se muestra dicha disminución de oxígeno disuelto (OD, eje izquierdo) y pH (eje derecho), que se irá repitiendo, conforme veremos, tras las alimentaciones al tanque a lo largo del cultivo.

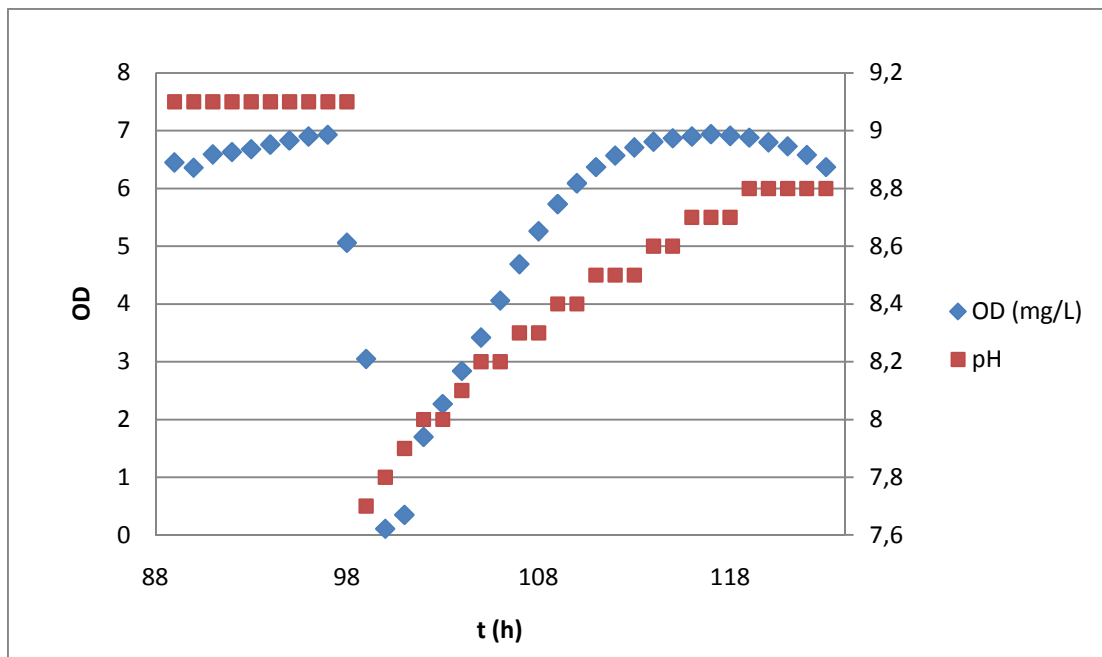


Fig. 25: Seguimiento del OD y pH tras alimentar 1300 mL

Se continúa analizando el agua del reactor durante un período de 4 días (t=98, t=141, t=170 y t=194) y se comprueba que las concentraciones de nutrientes no disminuyen. Concluyendo que la concentración de microorganismos es insuficiente para poner en marcha un cultivo de alta densidad en condiciones razonables, se decide realizar una segunda toma de muestra de agua de la Albufera y concentrarla previamente, consiguiendo una concentración inicial de microorganismos mayor.

	<b>N-NH<sub>4</sub> (mg/L)</b>	<b>N-NO<sub>3</sub> (mg/L)</b>	<b>N-NO<sub>2</sub> (mg/L)</b>	<b>P-PO<sub>4</sub> (mg/L)</b>
t=0	0,91	1,46	0,00	0,21
t=66	0,00	2,12	0,00	0,23
SP73	64,67	-	-	8,98
t=73	0,92	2,08	0,00	0,35
t=91	0,23	1,77	0,11	0,23
SP98	61,35	-	-	8,77
t=98	8,96	1,51	0,09	1,45
t=141	8,83	0,86	0,47	1,18
t=170	9,00	0,77	0,56	1,15
t=194	9,92	1,00	0,46	1,64

*Tabla 10: Concentraciones de nutrientes en el reactor a t=ti y en la salida puntual empleada como alimento SPi, siendo i las horas desde el inicio del cultivo*

### 4.3. Toma de muestras (II)

Se realiza una segunda toma de muestra de agua en la laguna de la Albufera, en el embarcadero en su orilla Este (Ctra.CV-500 km 10,5. Término Municipal de Valencia).

Se determina la concentración de clorofila en las muestras (clorofila a = 116,16 mg/m<sup>3</sup>) y a continuación se realiza un recuento exhaustivo de microorganismos. Los resultados obtenidos, en los que de nuevo se comprueba que predominan las diatomeas y clorofíceas, se muestran en la Tabla 11. Llama la atención el hecho de la menor presencia de cianobacterias respecto a la toma de muestra anterior, lo que disminuye considerablemente la proporción procariotas/eucariotas.



<b>Microalgas</b>	<b>células/L</b>	<b>% eucariotas</b>
Diatomeas	27.888.368	37,0
Clorofíceas	43.465.654	57,7
Cryptofíceas	2.261.219	3,0
Dinoflagelados	502.493	0,7
Prasinofíceas	251.247	0,3
Primnesiales	< L.D.	-
Otras	1.004.986	-
Cianobacterias	163.561.508	-
Picocianobacterias	753.740	-
Eucariota total	75.373.967	-
relación procariotas/eucariotas	2,18	

*Tabla 11: Toma de muestras II. Recuento exhaustivo de microorganismos del agua de la Albufera*

#### **4.4. Concentración de las microalgas mediante filtración**

Mediante el montaje explicado en el apartado 2.1 de esta sección, se procede a la concentración mediante filtración de 70 L de muestra tomada. El flujo tangencial sobre la membrana es de 1,8 L/h, lo que equivale a  $72 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$ .



*Fig. 26: Reactor tras la concentración por filtración y aclimatación*

## 4.5. Cultivo de microalgas. Batch y semicontinuo

Tras un período de *aclimatación* en que las algas son alimentadas mediante un único batch (184 h) se procede a trabajar de modo semicontinuo, tal que se alimenta el reactor diariamente con 600, 800, 1000 y 1500 mL durante 4 semanas sucesivas.

	<b>Desde</b>	<b>Hasta</b>	<b>V alimentado</b>
<b>Batch</b>	09/02/2011	18/02/2011	700 mL x 1
<b>Semicontinuo</b>	22/02/2011	25/02/2011	600 mL/d
	28/02/2011	04/03/2011	800 mL/d
	07/03/2011	10/03/2011	1000 mL/d
	11/03/2011	11/03/2011	1500 mL/d
	14/03/2011	17/03/2011	1500 mL/d

Tabla 12: Planificación del cultivo

### ○ Seguimiento

En el alimento se analiza diariamente la concentración de nitrógeno amoniacal y ortofosfatos (la concentración de nitratos y nitritos es cero), así como los ácidos grasos volátiles y alcalinidad. Una vez semanalmente se analiza la DQO.

En el reactor se analiza diariamente la concentración de nitrógeno amoniacal, nitrógeno en forma de nitrato, nitrógeno en forma de nitrito y ortofosfatos. En días alternos se determinan la clorofila y fósforo total. Se determinan asimismo los sólidos suspendidos totales y volátiles, la concentración en ácidos grasos y la alcalinidad. El seguimiento de oxígeno disuelto, pH, conductividad y potencial redox es continuo, con una calibración semanal de las sondas empleadas.

## 5. Resultados obtenidos

### 5.1. Batch

Durante el primer batch, de 184 h de duración, se obtuvieron los siguientes valores para las concentraciones de amonio, nitrito, nitrato y fosfato en el reactor:

t (h)	N-NH <sub>4</sub> (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	N-NO <sub>2</sub> (mg/L)	N total (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> (mg/L)
	0,86	1,70	0,18	2,74	0,00
0	6,31	1,70	1,60	9,61	0,76
18	4,34	0,49	0,76	5,59	0,41
42	4,05	0,85	0,65	5,55	0,52
112	3,60	0,79	0,61	5,00	0,67
136	2,45	1,52	0,09	4,05	0,51
184	0,03	0,89	1,55	2,47	0,41

Tabla 13: Seguimiento de la concentración de nutrientes durante el cultivo batch

Se observa que la concentración de amonio disminuye a lo largo del batch, mientras que las de nitrito y nitrato no presentan una tendencia clara. La concentración total de nitrógeno en todas sus formas disminuye, de modo que la total final supone el 25,7% de la concentración inicial, por lo que se puede concluir que se ha eliminado el 74,3% de nitrógeno. Del mismo modo se puede observar que se elimina finalmente el 46% del fosfato presente.

En la Fig. 27 se han representado las concentraciones de nutrientes a lo largo del batch.

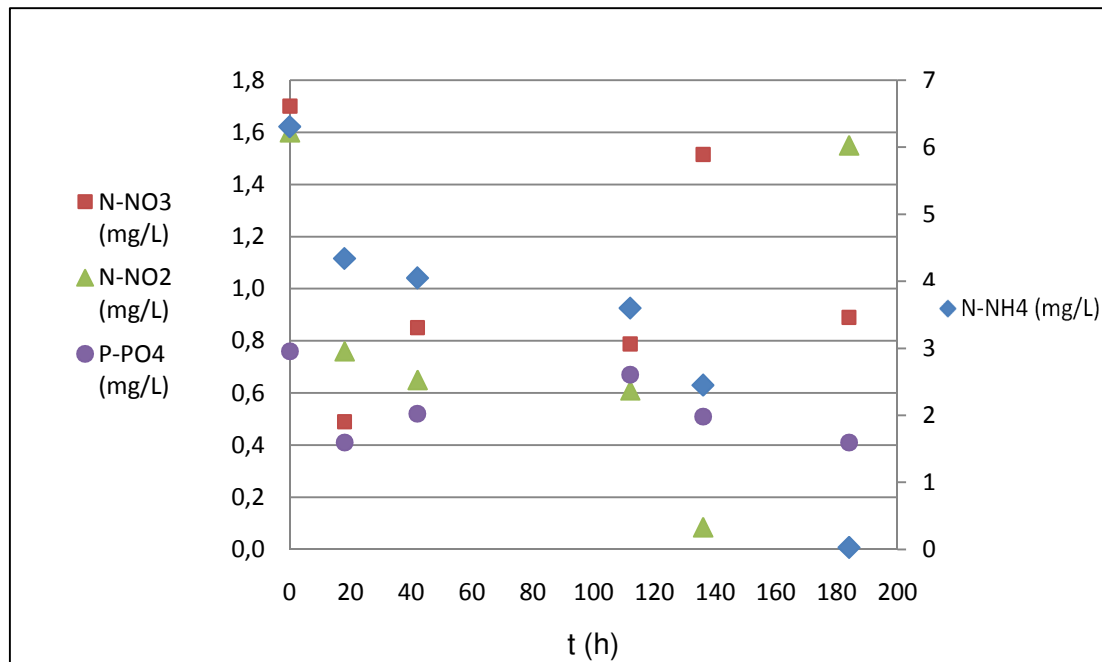


Fig. 27: Concentración de nutrientes en el reactor durante el primer batch de 184 h de duración

En la Fig. 28 se ha representado la concentración de oxígeno disuelto y el valor de pH para dicho período. Se observa una primera bajada de pH que correspondería a la rápida nitrificación por parte de las bacterias amonioxidantes presentes en el reactor. A continuación el valor de pH fue aumentando, de modo que se puede aventurar que parte de esta subida es debida a la desnitrificación por parte de la población bacteriana mientras que parte del aumento podría ser debido a la actividad fotosintética de las microalgas presentes. De hecho, el pH final que alcanza el cultivo es mayor al pH inicial anterior a la alimentación, lo que indicaría dicha actividad fotosintética. El oxígeno es de nuevo presumiblemente tomado por las bacterias heterótrofas que consumen la materia fácilmente biodegradable y se genera probablemente mediante los procesos de fotosíntesis, que disminuyen conforme disminuyen los nutrientes disponibles.

Por su parte, las concentraciones de clorofila se mantienen relativamente constantes, como se aprecia en la Fig. 29.

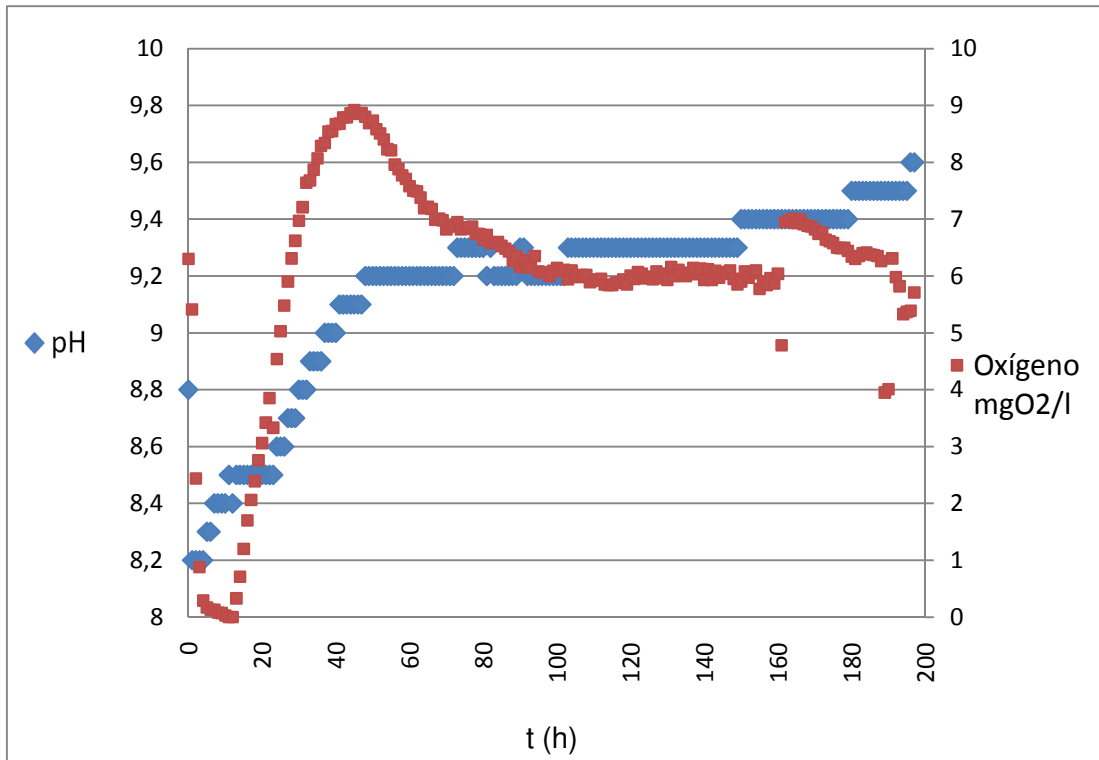


Fig. 28: pH y oxígeno disuelto en el reactor durante el primer batch de 184 h de duración

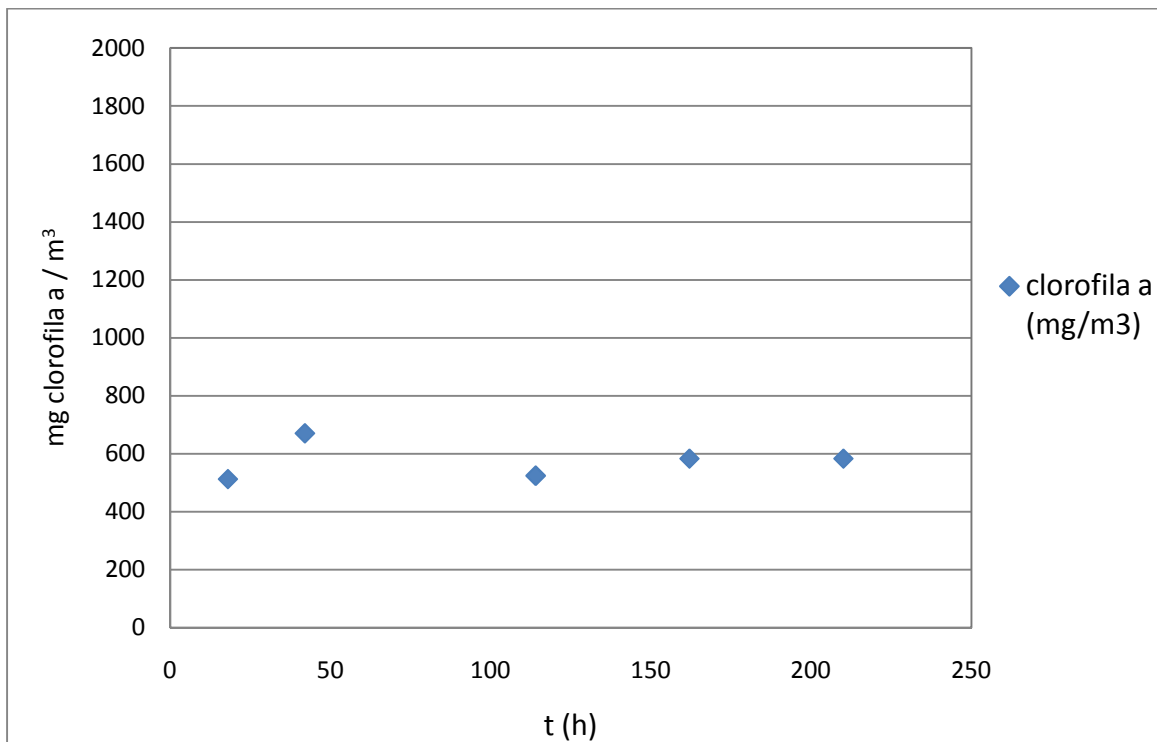


Fig. 29: Concentración de clorofila durante el primer batch de 184 h de duración

## 5.2. Operación en semicontinuo

Durante el período comprendido entre el 22/02/2011 y 17/03/2011 se opera el fotobiorreactor en modo semicontinuo, de modo que la primera semana se adicionan al reactor 600 mL/d de agua efluente del AnBRM. La segunda semana se adicionan 800 mL/d, la tercera 1000 mL/d y la cuarta son alimentados 1500mL/d.

Las características del **agua de entrada** se presentan a continuación:

Fecha	mg N-NH <sub>4</sub> /L	mg P-PO <sub>4</sub> /L	AGV mg HAc/L	Alcalinidad mg CaCO <sub>3</sub> /L
22/02/2011 16:00	56,50	7,18	82	526
23/02/2011 16:00	51,93	6,68	69	607
24/02/2011 16:00	51,93	6,68	69	607
25/02/2011 12:00	49,96	7,46	89	607
28/02/2011 16:00	47,61	6,12	68	590
01/03/2011 11:00	44,11	5,76	59	584
02/03/2011 12:00	44,07	5,40	39	600
03/03/2011 16:00	35,27	4,50	9	461
04/03/2011 11:30	37,95	4,89	25	540
07/03/2011 12:00	44,61	5,88	68	565
08/03/2011 12:00	44,31	6,95	77	558
09/03/2011 12:00	46,15	5,79	56	493
10/03/2011 12:00	37,48	4,79	6	559
11/03/2011 12:30	42,50	4,90	12	602
14/03/2011 12:00	37,92	6,61	106	433
15/03/2011 11:00	49,10	6,00	74	453
16/03/2011 13:30	38,64	5,29	14	545
17/03/2011 15:00	45,36	4,94	n.d.	n.d.

Tabla 14: Características del agua influente al cultivo de microalgas

Mientras que el agua **efluente** del reactor presenta las siguientes características:

Fecha	mg N-NH <sub>4</sub> /L	mg N-NO <sub>3</sub> /L	mg N-NO <sub>2</sub> /L	mg N/L	mg P-PO <sub>4</sub> /L
22/02/2011	0,09	1,07	4,18	5,34	0,42
23/02/2011	3,05	1,58	3,72	8,35	0,48
24/02/2011	3,88	1,22	4,68	9,78	0,54
25/02/2011	5,91	1,7	4,28	11,89	0,73
28/02/2011	0,00	3,55	10,25	13,80	0,25
01/03/2011	2,95	5,63	8,82	17,40	0,10
02/03/2011	5,63	3,03	8,61	17,27	0,48
03/03/2011	6,27	3,12	8,88	18,27	0,35
04/03/2011	7,33	0,00	8,68	16,01	0,53
07/03/2011	0,00	1,65	16,45	18,10	0,17
08/03/2011	2,77	5,29	11,46	19,52	0,00
09/03/2011	7,60	1,70	10,85	20,15	0,86
10/03/2011	10,21	1,52	9,33	21,06	1,31
11/03/2011	10,70	1,39	9,95	22,04	1,56
14/03/2011	4,72	1,86	13,59	20,17	1,80
15/03/2011	16,82	0,72	2,90	20,44	2,53
16/03/2011	18,67	0,47	0,60	19,74	4,21
17/03/2011	13,50	0,00	0,00	13,50	2,65

*Tabla 15: Características del agua efluente del cultivo de microalgas*

○ **Eliminación de nutrientes**

Conocidas las concentraciones de entrada y de salida del reactor, se han calculado para cada día los mg/L eliminados, tanto del total de nitrógeno soluble como de ortofosfatos, así como la cantidad horaria eliminada y el porcentaje respecto a la concentración en el influente. Los datos se muestran en la Tabla 16, donde se observan altos porcentajes de eliminación al inicio, que van disminuyendo conforme avanza el cultivo.

Fecha	N (mg/L)	N (mg/L·h)	N (%)	P-PO <sub>4</sub> (mg/L)	P (mg/L·h)	PO <sub>4</sub> (%)
22/02/2011	48,2	2,5	85,20%	6,7	0,4	93,30%
23/02/2011	42,2	1,8	81,20%	6,1	0,3	91,90%
24/02/2011	40,0	2,1	77,10%	6,0	0,3	89,10%
25/02/2011	36,2	0,5	72,40%	7,2	0,1	96,60%
28/02/2011	30,2	1,6	63,50%	6,0	0,3	98,40%
01/03/2011	26,8	1,1	60,80%	5,3	0,2	91,70%
02/03/2011	25,8	1,1	58,50%	5,1	0,2	93,50%
03/03/2011	19,4	1,1	54,90%	4,0	0,2	88,20%
04/03/2011	19,8	0,3	52,30%	4,7	0,1	96,50%
07/03/2011	25,1	1,1	56,20%	5,9	0,3	100,00%
08/03/2011	24,2	1,1	54,50%	6,1	0,3	87,60%
09/03/2011	25,1	1,1	54,40%	4,5	0,2	77,40%
10/03/2011	15,4	0,7	41,20%	3,2	0,1	67,40%
11/03/2011	22,3	0,3	52,50%	3,1	0,0	63,30%
14/03/2011	17,5	0,8	46,10%	4,1	0,2	61,70%
15/03/2011	29,4	1,2	59,79%	1,8	0,1	29,80%
16/03/2011	25,1	1,0	65,06%	2,6	0,1	49,90%
17/03/2011	17,5	0,2	38,62%	1,0	0,0	20,20%
<b>Media</b>	27,2	1,1	59,69%	4,6	0,2	77,59%

Tabla 16: Nutrientes eliminados

La eliminación media diaria de **nitrógeno** es de un 59,7%. Parte de este nitrógeno es probablemente eliminado, como se ha comentado, gracias a la acción de las bacterias autótrofas que llevan a cabo procesos de nitrificación y desnitrificación. Destaca (*Tabla 15*) el consumo de amonio, siendo observable que la disminución de éste va asociada a un aumento de iones nitrito y nitrato en el reactor. Así, por ejemplo, se puede observar especialmente durante los períodos 25-28/02 y 04-07/03, en los cuales no se alimenta el reactor, que el amonio es consumido en su totalidad.

Respecto a la eliminación de **fósforo**, puede aventurarse que, junto al consumo asociado al crecimiento de las microalgas y bacterias, se produce eliminación por precipitación, ya sea fosfato cálcico (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), hidroxiapatita (fosfato de calcio cristalino: Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) o estruvita, un cristal de magnesio, amonio y fosfato



( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Esta precipitación de fosfato vendría asociada o determinada por el pH del medio, de modo que a pH mayores (es decir, al inicio), la eliminación por precipitación es mayor. Conforme el volumen alimentado al reactor va creciendo, el pH del cultivo va disminuyendo para aproximarse al pH de la salida de la planta piloto de biomembranas anaerobia (7-7,5) y la precipitación de sales de fosfato no es tan probable. De hecho, podría suponerse que, al bajar el pH, tanto el fosfato cálcico no cristalino como la estruvita pueden redisolverse en el medio, aumentando la concentración de fosfatos o compensando la que sí es eliminada biológicamente por las algas y bacterias. La hidroxiapatita, por otro lado, si se hubiera formado, no se redisolvería.

En la Tabla 17 se presentan los resultados del análisis de fósforo total y, por diferencia con la concentración de ortofosfatos, el fósforo suspendido. En la tercera columna se muestra el fósforo suspendido acumulado. Se ha añadido también el valor máximo de pH que alcanza el cultivo cada día, de modo que se observa que al disminuir el pH el fósforo suspendido da valores negativos de acumulación (es decir, se elimina), lo que podría explicarse por la resolución de dicho fósforo en forma de ión ortofosfato. Paralelamente, la eliminación de ortofosfatos es menor para los días en que se alcanza menor pH, lo que estaría en concordancia con este supuesto.

En la Fig. 30 se han representado los valores de pH, fósforo suspendido y fosfato eliminado. Puede apreciarse una bajada de fósforo suspendido a partir de cierto valor de pH, a la vez que los mg/L de ortofosfatos eliminados disminuyen.

	<b>P total (mgP-PO<sub>4</sub>/L)</b>	<b>P suspendido (mg/L)</b>	<b>P suspendido acumulado (mg/L)</b>	<b>P-PO<sub>4</sub> eliminado (mg/L)</b>	<b>PO<sub>4</sub> eliminado (%)</b>	<b>pH máximo</b>
22/02/2011	-	-	-	6,70	93%	9,2
23/02/2011	1,60	1,12	0,56	6,14	92%	9,2
24/02/2011	-	-	-	5,95	89%	9,1
25/02/2011	2,41	1,68	1,05	7,21	97%	9,1
28/02/2011	2,98	2,73	0,78	6,02	98%	9,6
01/03/2011	-	-	-	5,28	92%	8,4
02/03/2011	3,98	3,50	0,25	5,05	94%	8,3
03/03/2011	-	-	-	3,97	88%	8,3
04/03/2011	4,28	3,75	0,64	4,72	97%	8,4
07/03/2011	4,56	4,39	0,18	5,88	100%	8,6
08/03/2011	-	-	-	6,09	88%	7,9

	P total (mgP-PO <sub>4</sub> /L)	P suspendido (mg/L)	P suspendido acumulado (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> eliminado (mg/L)	PO <sub>4</sub> eliminado (%)	pH máximo
09/03/2011	5,42	4,56	0,79	4,48	77%	8,0
10/03/2011	-	-	-	3,23	67%	8,1
11/03/2011	6,91	5,35	-0,95	3,10	63%	8,0
14/03/2011	6,20	4,40	0,27	4,08	62%	7,8
15/03/2011	-	-	-	1,79	30%	7,9
16/03/2011	8,88	4,67	-1,79	2,64	50%	8,0
17/03/2011	-	-	-	1,00	20%	7,9

Tabla 17: Fósforo suspendido y soluble eliminados. pH del cultivo

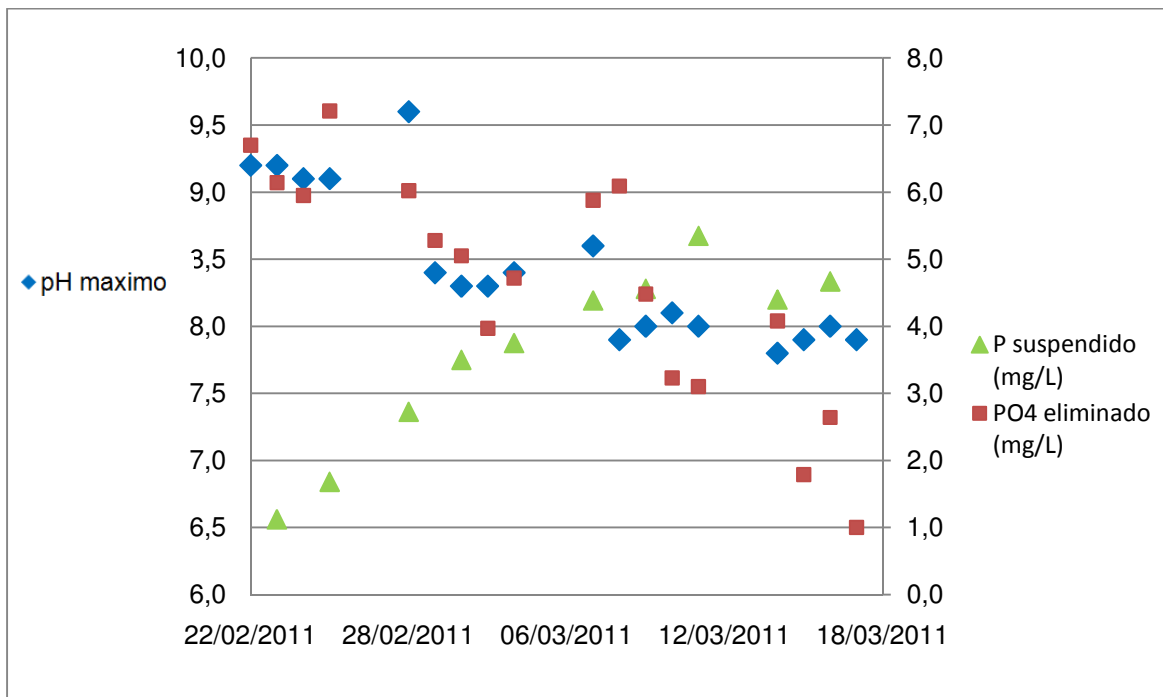


Fig. 30: Fósforo suspendido, fosfato eliminado y pH máximo en el cultivo

Por otro lado, resultados de la primera y cuarta semanas de operación (25/02/2011 y 15/03/2011) indican una concentración de **carbono inorgánico** a la salida del reactor de 81 y 89 mgCl/L, respectivamente, así como una alcalinidad promedio de 306 mg CaCO<sub>3</sub>/L, lo que indica que el cultivo consume alcalinidad aportada por el afluente y que no existe de momento limitación por carbono inorgánico en el crecimiento de las microalgas.

- **Seguimiento de pH y oxígeno disuelto**

A continuación se muestran, para cada período, las gráficas de seguimiento de pH y oxígeno disuelto (OD) en el reactor. Como se ha visto hasta ahora, el oxígeno disminuye en el momento que se alimenta el reactor con el efluente de la planta piloto AnBRM, debido al consumo rápido de ácidos grasos volátiles, y a procesos de nitrificación. Esto hace también disminuir el pH, que seguidamente se recupera probablemente debido a la desnitrificación y a la fotosíntesis (ya que aumenta por encima del valor inicial). A su vez, el oxígeno aumenta de nuevo ya que es aportado al medio por los microorganismos fotosintéticos, y empieza a disminuir de nuevo si el período de tiempo hasta la siguiente alimentación es suficientemente prolongado, por agotamiento de nutrientes.

El momento de la entrada al reactor del efluente de la planta piloto de AnBRM se indica con una flecha. En el primer período (Fig. 31) se observan largos tramos de concentración nula de oxígeno, mientras que en los demás se aprecia la tendencia explicada:

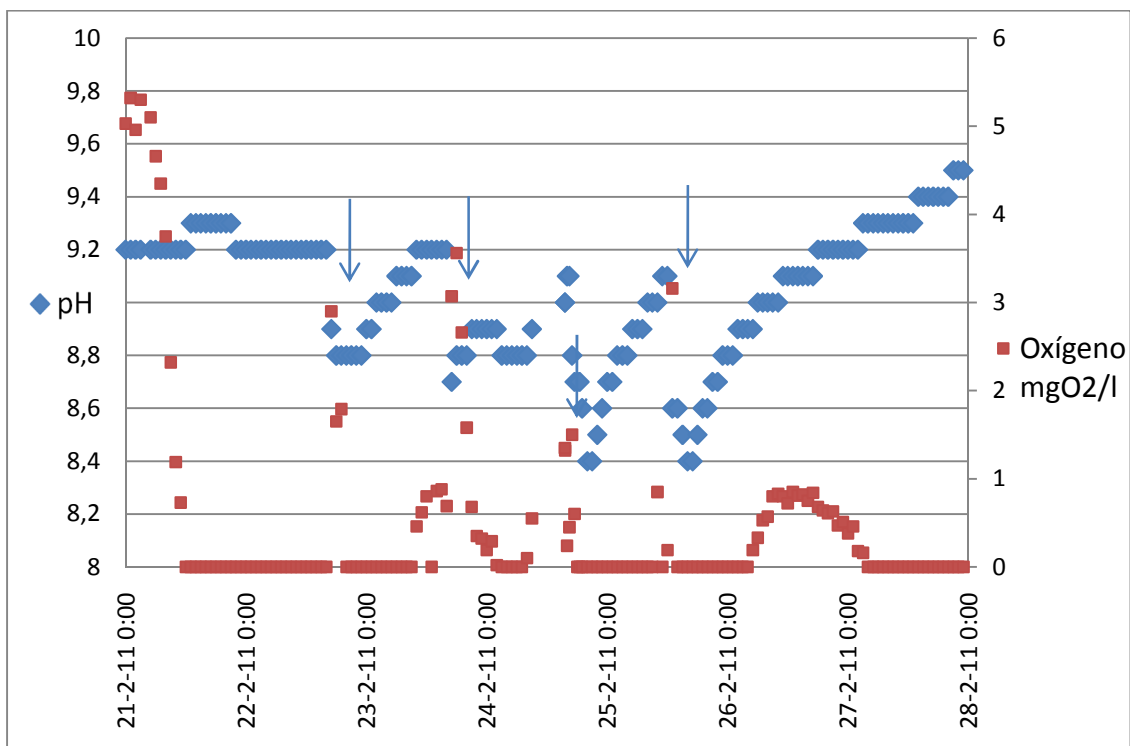


Fig. 31: Seguimiento de pH y OD en el reactor. Semana con alimentación 600mL/d

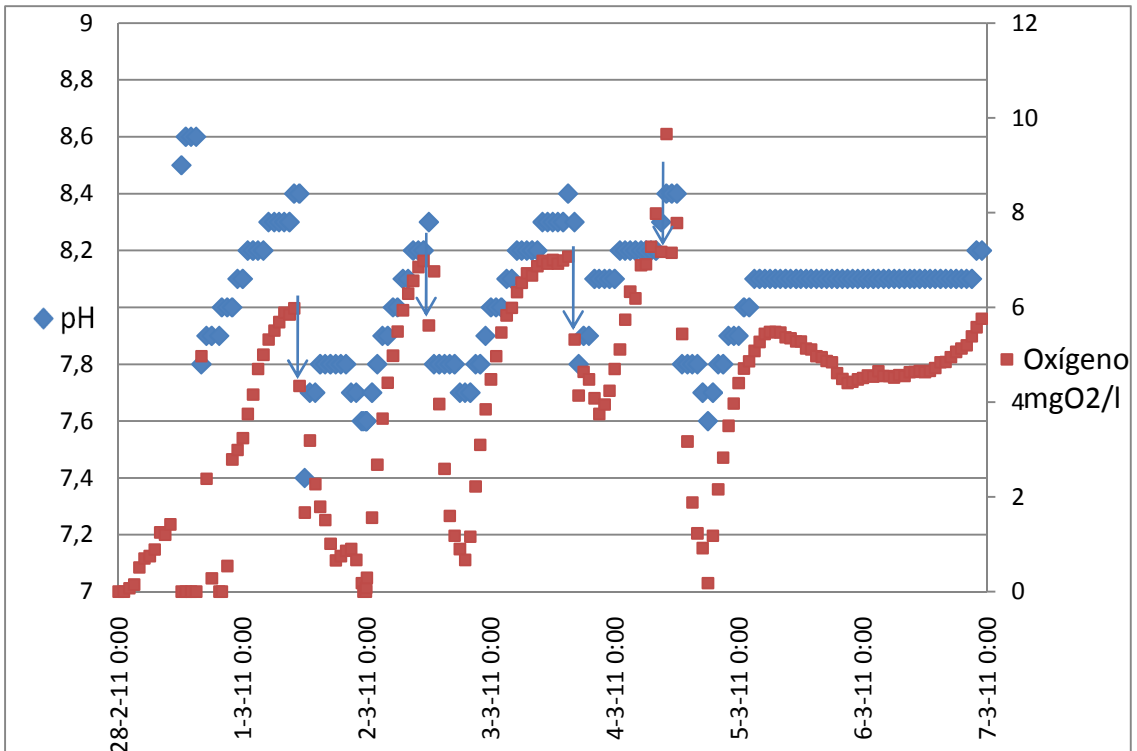


Fig. 32: Seguimiento de pH y OD en el reactor. Semana con alimentación 800mL/d

Cabe indicar que el primer tramo de bajada en la concentración de oxígeno disuelto es debido adicionalmente al hecho que durante el empleo de la membrana la agitación se detiene.

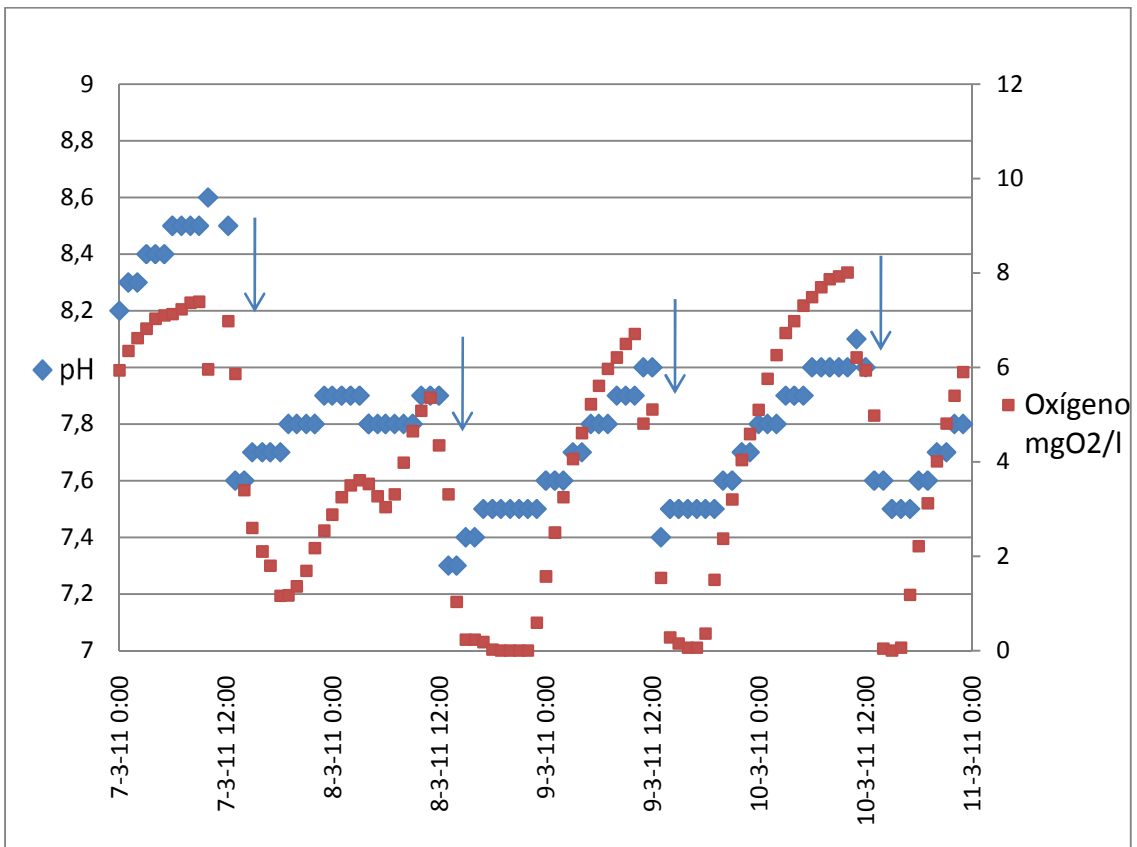


Fig. 33: Seguimiento de pH y OD en el reactor. Semana con alimentación 1000mL/d

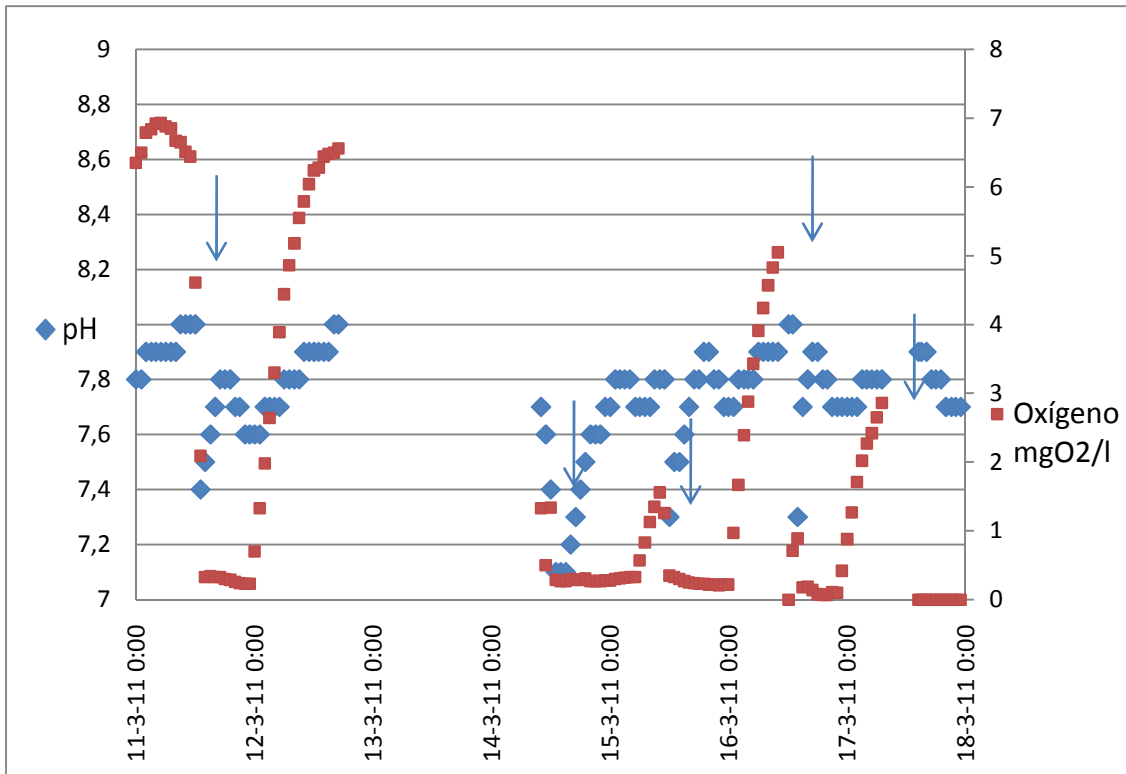


Fig. 34: Seguimiento de pH y OD en el reactor. Semana con alimentación 1500mL/d (Los datos no están disponibles debido a cortes de suministro eléctrico)

○ **Crecimiento de los microorganismos fotosintéticos**

El contenido en **clorofila a** aumenta conforme avanza el cultivo, alcanzando valores de más de 3000 mg/m<sup>3</sup>. En la Tabla 18 se muestran dichos valores, que han sido representados en la Fig. 35:

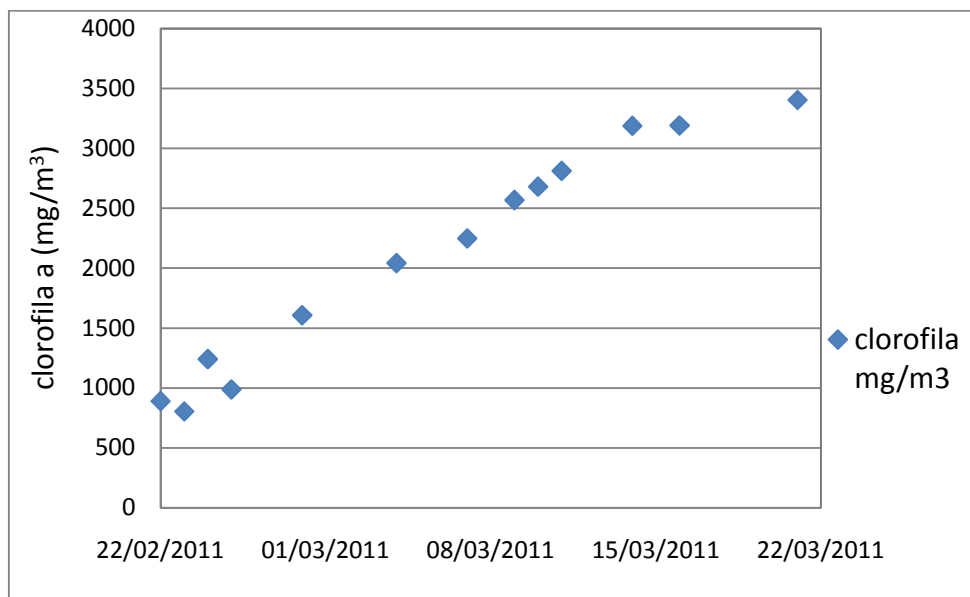


Fig. 35: Evolución de la clorofila durante el cultivo en semicontinuo

Fecha	clorofila a (mg/m <sup>3</sup> )
22/02/2011	889,16
23/02/2011	803,02
24/02/2011	1.239,66
25/02/2011	986,49
28/02/2011	1.605,89
04/03/2011	2.042,12
07/03/2011	2.247,85
09/03/2011	2.568,30
10/03/2011	2680,62
11/03/2011	2.811,94
14/03/2011	3.188,34
16/03/2011	3.191,85
21/03/2011	3.403,94

Tabla 18: Valores de clorofila medidos en el cultivo

Se observa un aumento lineal de la concentración de clorofila. Esto se puede relacionar con un aumento de la biomasa fotosintéticamente activa. No obstante, como se ha comentado, no es posible relacionarlo inequívocamente de forma cuantitativa ya que el contenido en clorofila de las células puede variar en función del medio y las especies predominantes.

Respecto a los **sólidos suspendidos**, se han obtenido los valores presentados en la Tabla 19:

	SST (mg/L)	SSV (mg/L)	SSNV (mg/L)	SSV (%)
14/02/2011	105,41	97,30	8,11	92,31%
25/02/2011	140,00	106,67	33,33	76,19%
03/03/2011	326,67	200,00	126,67	61,22%
10/03/2011	375,00	265,00	110,00	70,67%

Tabla 19: Sólidos suspendidos totales y volátiles

Como era previsible, a medida que avanza el cultivo los sólidos suspendidos aumentan, ya que así lo hace la biomasa del sistema. Llama la atención el hecho de que el porcentaje de sólidos volátiles disminuya para las tres primeras determinaciones. El agua afluyente al sistema no presenta sólidos suspendidos, ya que proviene de un tratamiento donde la última operación es una separación por membranas. El aumento de sólidos no volátiles en el reactor se explica por tanto únicamente por la precipitación química que presumiblemente está sufriendo el contenido en ortofosfatos en forma de fosfato cálcico, hidroxiapatita o estruvita. Como se ha comentado anteriormente, esta precipitación perdería importancia conforme el pH del cultivo disminuye, para el último período, lo que sería corroborado por la disminución que en la última medida se observa en los sólidos suspendidos no volátiles.

Se puede calcular ahora la cantidad de clorofila que existe en el reactor en relación al peso seco en biomasa presente. Si bien es cierto que no toda la biomasa es fotosintética, y por tanto no toda la biomasa contiene clorofila, el valor puede ser orientativo:

	mg Clorofila/mg SSV
14/02/2011	0,57
25/02/2011	1,29
03/03/2011	3,34
10/03/2011	3,79

Tabla 20: Contenido en clorofila de la biomasa

A los 21 días del inicio del proceso semicontinuo, a fecha por tanto 15/03/2011 y tras 34 días de cultivo, se realiza un **recuento** en una muestra tomada del reactor. El máximo volumen filtrado que permite el recuento es de 0,5 mL. Volúmenes mayores no permiten distinguir los microorganismos porque se superponen unos con otros. En la muestra se observan tanto diatomeas pennadas como dinoflagelados, pero no en los campos contados para estimar la abundancia. Esto significa que estos grupos existen en la muestra pero con valores de abundancia inferiores al límite de detección que es de  $3,8 \cdot 10^6$  cel/L.

La mayoría de grupos encontrados pertenecen a la clase de las Clorofíceas. Dentro de ésta hay géneros como *Scenedesmus* y *Monoraphidium*. También se han visto clorococales pequeñas. Los resultados del recuento exhaustivo se muestran en la Tabla 21.

<b>Microalgas</b>	<b>Células/L</b>
<i>Scenedesmus</i>	282.700.819
<i>Scenedesmus solitarios</i>	313.263.069
<i>Monoraphidium</i>	84.046.189
Clorococales	913.047.239
Otras	3.820.281
Eucariota total	1.596.877.597

Tabla 21: Recuento exhaustivo de microorganismos en el cultivo tras 34 días

Cabe destacar la “especialización” del cultivo, en el sentido que ha tenido lugar una selección natural de las especies de microalgas presentes, lo que demuestra que la comunidad se adapta y varía en función de las condiciones del medio. Así, no ha sido necesario realizar un aislamiento de una especie específica sino que el cultivo ha proporcionado un buen nicho ecológico para las algas clorofíceas, que son las que han sobrevivido indicando ser adecuadas para el tratamiento.

Durante el cultivo se ha realizado un seguimiento de los microorganismos presentes en el fotobiorreactor mediante observación con **microscopía de contraste de fases**. Esto permite mostrar gráficamente dicha selección de especies.

Así, en las Fig. 36 y Fig. 37 se observa una mayor variedad de microalgas, mientras que en las posteriores se encuentra mayor cantidad de clorofíceas clorococales, abundando por ejemplo las del género *Scenedesmus*.

Conforme avanza el proceso semicontinuo se aprecia una mayor homogeneidad en los campos observados. En alguna ocasión se encuentran flóculos (por ejemplo Fig. 38) o acumulaciones de microorganismos, y en muchos casos éstos se encuentran aislados.



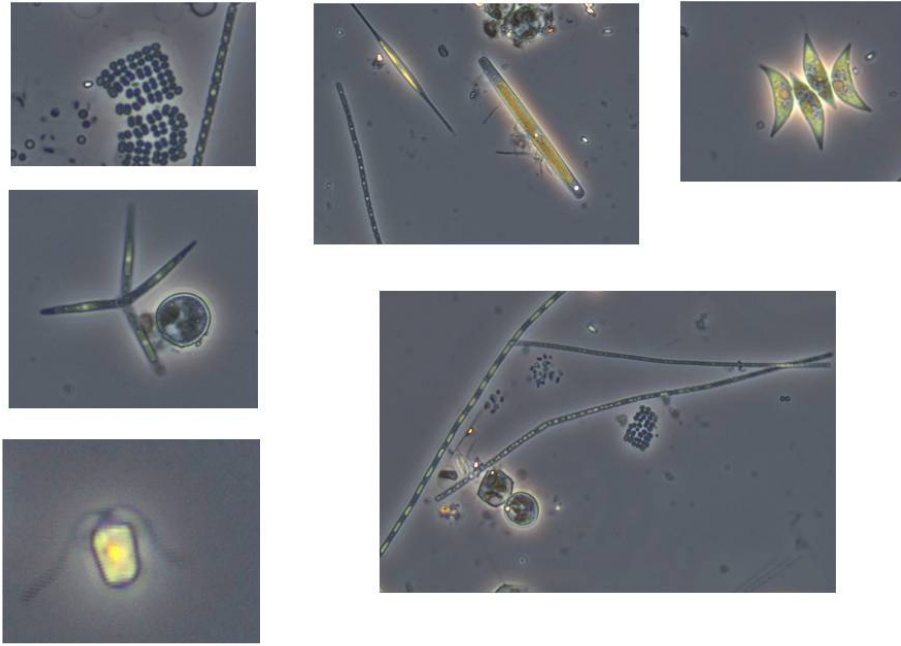


Fig. 36: 07/02/2011. Muestra de la Albufera concentrada  
De izquierda a derecha y de arriba abajo: Merismopedia (cianobacteria), Diatomea, Scenedesmus, Actinastrum, Cianobacterias y Clorofícea volvocal

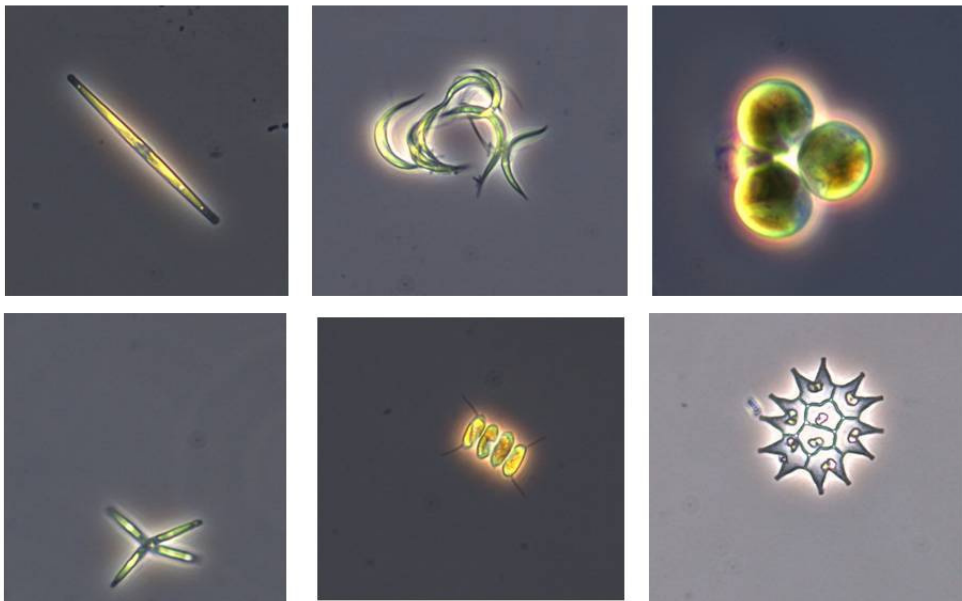
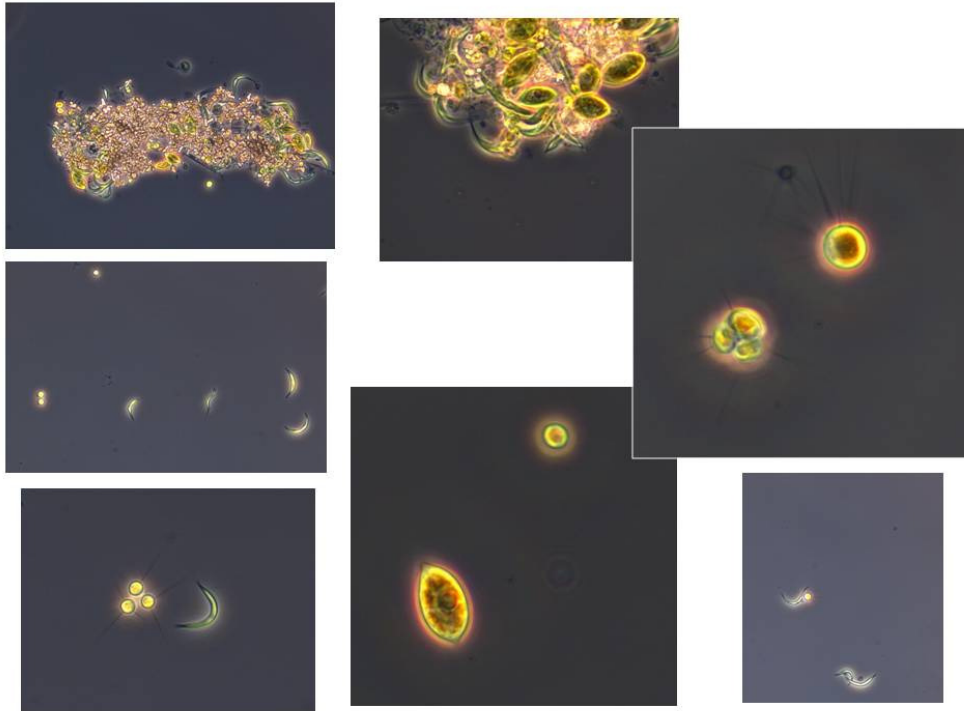
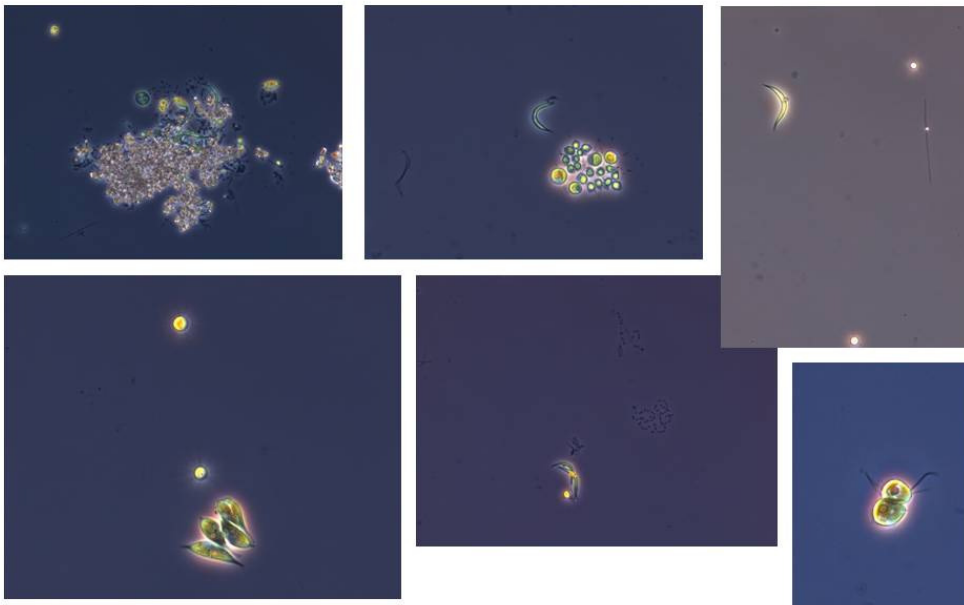


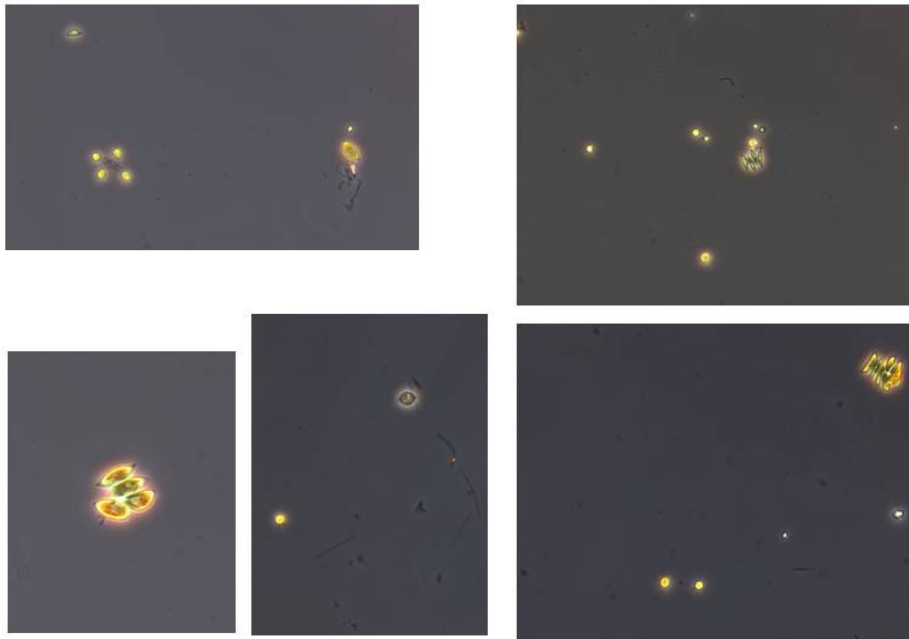
Fig. 37: Muestra del fotobiorreactor durante el primer batch  
De izquierda a derecha y de arriba abajo: Diatomea, Ankistrodesmus, Clorofícea clorococal, Actinastrum, Scenedesmus, Pediatrum



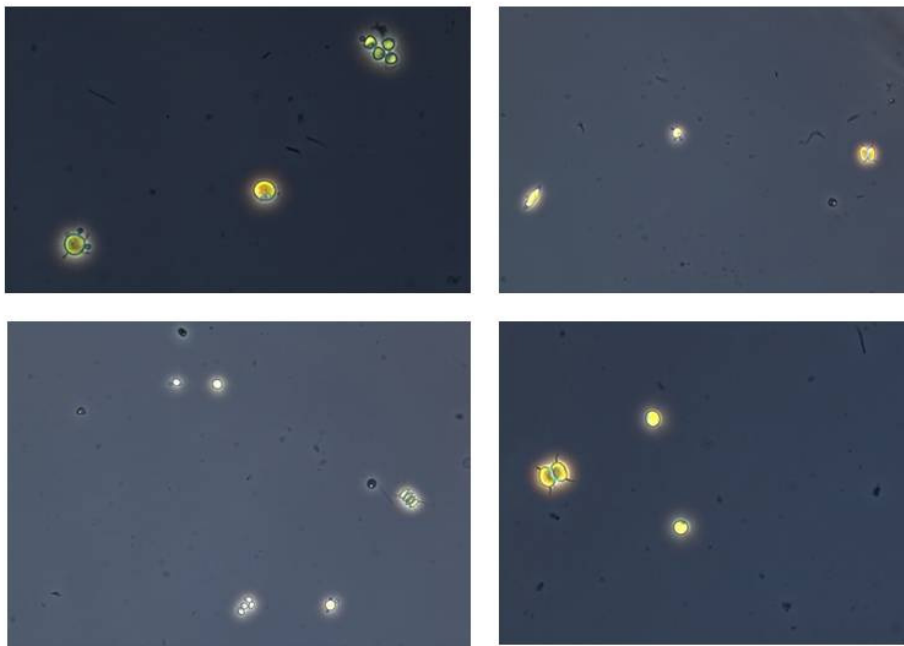
*Fig. 38: Muestra del fotobioreactor durante proceso semicontinuo. 01/03/2011  
Predominan las clorofíceas clorococales*



*Fig. 39: Muestra del fotobioreactor durante proceso semicontinuo. 04/03/2011*



*Fig. 40: Muestra del fotobioreactor durante proceso semicontinuo. 11/03/2011*



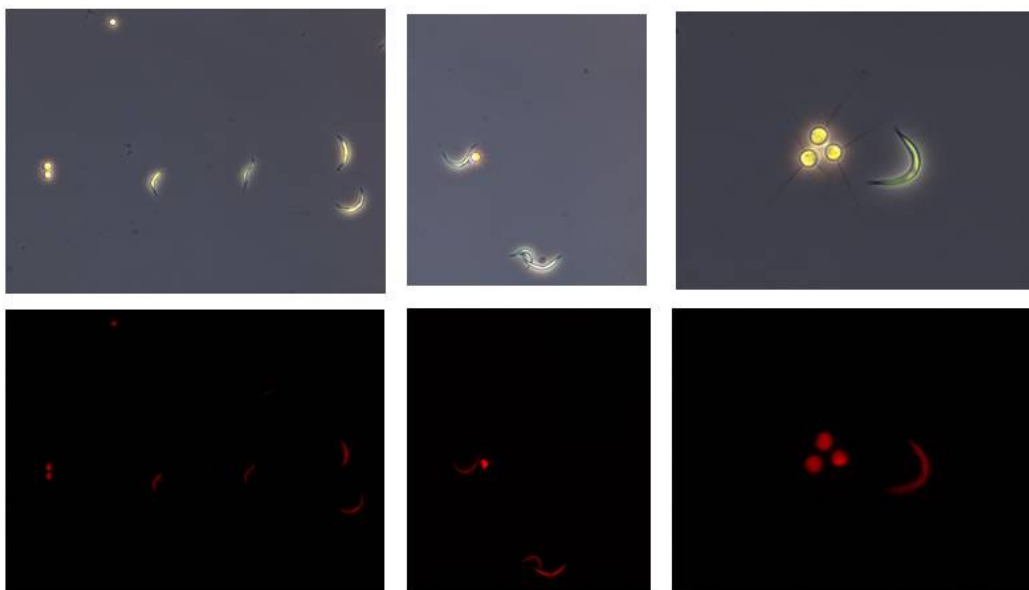
*Fig. 41: Muestra del fotobioreactor durante proceso semicontinuo. 21/03/2011*

Se han realizado dos hibridaciones FISH para comprobar tanto la aplicabilidad de la técnica en cultivos con microalgas como para determinar si existen bacterias amonioxidantes y metanotróficas en el reactor.

Las muestras fijadas e hibridadas han sido tres, correspondientes todas al período de funcionamiento en semicontinuo. Así, las muestras de fecha 23/02/2011 y 01/03/2011, correspondientes a la primera y segunda semana de dicho período, han sido hibridadas con EUB 338-I, NSO1225LNA, Ma464 y Mg84 (véase Tabla 6: Sondas

generales para identificación de bacterias nitrificantes y metanotróficas), mientras que la muestra fijada a fecha 14/03/2011 ha sido hibridada con EUB 338-I, Ma464 y Mg84.

Los resultados, por un lado, han demostrado capacidad cualitativa de la técnica para determinación de bacterias, pero no cuantitativa, ya que las microalgas resultan ser emisoras de fluorescencia, incluso en muestras sin hibridar. Este hecho hace que un recuento automático sea imposible, y que la determinación visual se vea entorpecida por la interferencia de las microalgas. En la Fig. 42 se muestra un ejemplo de ello, donde una muestra sin hibridar se observa en el microscopio de epifluorescencia, emitiendo luz en la franja roja del espectro, donde emiten muchos fluorocromos.



*Fig. 42: Imagen en contraste de fases y en epifluorescencia de muestras sin hibridar*

En las muestras hibridadas para determinar la presencia de bacterias amoniooxidantes se han encontrado positivos. En general, la presencia de microalgas es mayor que la de bacterias. A continuación se muestran algunas imágenes donde en verde se aprecian todas las bacterias (hibridadas con EUB) y en rojo aquellas hibridadas con NSO1225LNA que por tanto son amoniooxidantes. Llama la atención la interferencia causada por las microalgas, también en rojo.

No en todas las muestras hibridadas para determinar la presencia de metanotróficas se han encontrado positivos. Así, tan solo en la muestra fijada a fecha de 01/03/2011 se han detectado algunas bacterias, casi aisladas, que podrían tomar el metano disuelto en el efluente de la planta piloto anaerobia de biomembranas como sustrato para su crecimiento. En la Fig. 45 se muestran dos de estos positivos.

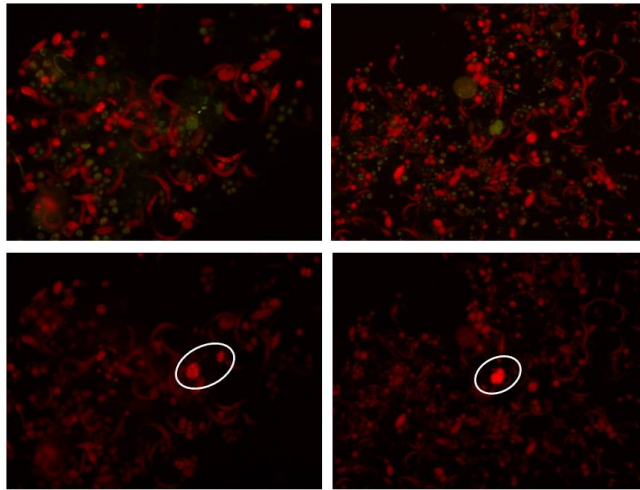


Fig. 43: Positivos para amoniooxidantes Gramm -, muestra del 01/03/2011

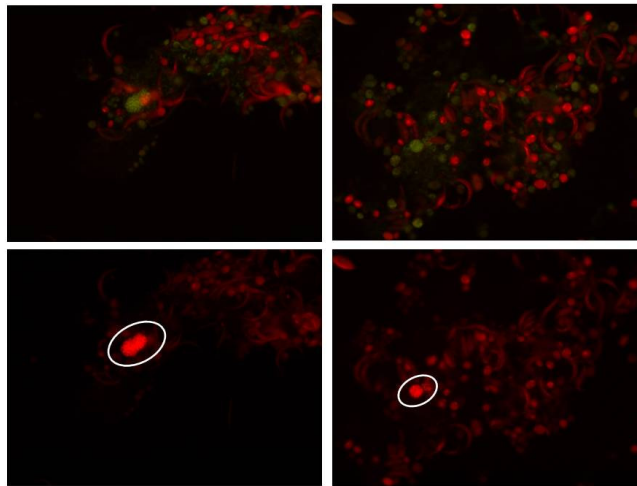


Fig. 44: Positivos para amoniooxidantes Gramm -, muestra del 01/03/2011

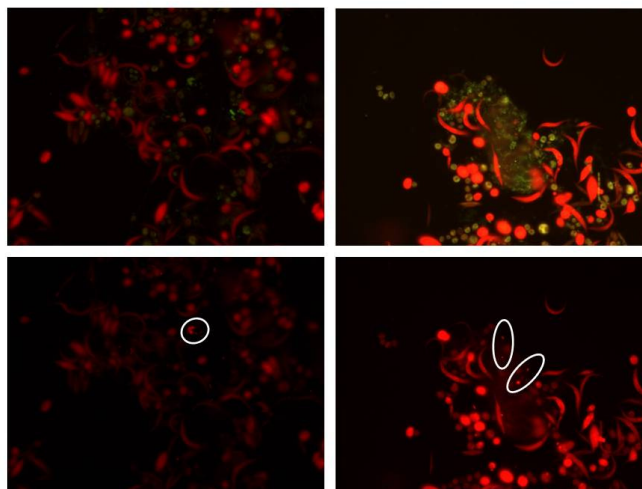


Fig. 45: Positivos para metanotróficas, Gramm -, muestra del 01/03/2011

## 6. Conclusiones

Tras la experimentación a escala de laboratorio con un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas autóctonas con agua residual tratada anaeróbicamente, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

La muestra tomada del medio natural es apta para su cultivo en laboratorio bajo condiciones controladas de luz y temperatura. No todas las especies presentes en la muestra inicial sobreviven durante el período de cultivo debido a la variación en las características del medio; sin embargo, el ecosistema presente es capaz de adaptarse a las condiciones impuestas y evolucionar hacia una mayor o menor abundancia de individuos de diferentes especies en función de dichas condiciones. Esto demuestra una de las ventajas de no desarrollar un monocultivo.

El crecimiento de las microalgas puede ser evaluado con diversos métodos, las características de algunos de los cuales han sido expuestas en este trabajo. Estos métodos expuestos son la determinación de clorofila, la determinación de sólidos suspendidos, la observación microscópica y las técnicas de hibridación con fluorescencia FISH.

En el cultivo llevado a cabo los microorganismos fotosintéticos conviven tanto con bacterias como con protozoos y otros microorganismos, que durante su desarrollo interactúan con el medio y con las microalgas, ya sea mediante relaciones de depredación, de toma de nutrientes o transformación de ellos. Por otro lado, las condiciones cambiantes de pH y oxígeno disuelto, resultantes del desarrollo de los procesos fotosintéticos y bacterianos, ejercen una influencia en el medio.

Con todo ello en cuenta, se ha observado eliminación tanto de fosfatos como de amonio en el medio. Los procesos responsables de ello son, por lo expuesto anteriormente, complejos. Por un lado, las algas toman indefectiblemente tanto amonio como fosfato y otros nutrientes (magnesio, etc) para su desarrollo, ya que así lo demuestra su composición. Por otro lado, las bacterias que hay presentes en el medio emplean igualmente dichos nutrientes como sustrato. El amonio, por ejemplo, es en parte nitrificado, de modo que hay a disposición de las microalgas tanto nitrito como nitrato. Se sospecha que existen también procesos de desnitrificación por acción de las bacterias autótrofas. Por su lado, el fosfato es, con seguridad, al menos en parte eliminado por precipitación química, debida al pH del cultivo y a la presencia de iones de calcio, magnesio y amonio.

Se puede concluir que el sistema propuesto permite por un lado el desarrollo de las microalgas, ya que éstas aumentan su población eliminando parte de los nutrientes que se pretenden recuperar del agua tratada anaeróbicamente. El sistema permite asimismo la acción conjunta de una serie de bacterias que han demostrado estar presentes en el cultivo, así como la eliminación, tanto biológica como por precipitación química, de fósforo.

La continuación de esta línea de investigación permitirá determinar el comportamiento del cultivo durante un período de tiempo más largo, así como bajo una carga mayor

(se disminuirán los tiempos de retención celular e hidráulico). Es previsible que el pH del medio disminuya, y con ello se observará la evolución de las concentraciones de fósforo tanto en el fotobiorreactor como en su efluente, estudiándose los equilibrios químicos y los procesos microbiológicos que tengan lugar. Se realizará para ello un seguimiento de los iones de calcio  $\text{Ca}^{+2}$  y magnesio  $\text{Mg}^{+2}$ , así como un recuento de microalgas a intervalos de tiempo regulares y menores que hasta ahora.

Una segunda etapa en esta investigación consistirá en ampliar a escala piloto el trabajo llevado a cabo hasta ahora en el laboratorio, de modo que se estudiará el comportamiento del sistema trabajando en continuo y en condiciones variables de luz y temperatura.





## VI. Bibliografía

Abe, K., Takahashi, E. (2008) Development of laboratory-scale photobioreactor for water purification by use of a biofilter composed of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* (Chlorophyta) *Journal of Applied Phycology* 20, 283-288.

An, J.Y., Sim, S-J. Hydrocarbon production from secondary treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Phycology* 15, 185-191.

APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington.

Araujo, G.S., Matos, L. (2011) Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology* 102, 5248-5250.

Aslan, S., Kapdan, I.K. (2006) Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28, 64-70.

Bordel, S., Guieysse, B., Muñoz, R. (2009) A mechanistic model for the reclamation of industrial wastewaters using algal-bacterial photobioreactors. *Environmental Science and Technology*. 43, 3200–3207.

Borowitzka, M. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70, 313 – 321.

Borras, L. (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.

Brenan, M., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557-577.

Carmelo R Thomas (1997) *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press.

Chen, C., Yeh, K. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102, 71-81.

Cheng-Wu, Z., Zmora, O. (2001) An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae). *Aquaculture* 195, 35-49.

Chinnasamy, S., Bhatnagar, A. (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology* 101, 3097-3105.

- Collet, P., Hélias, A. (2011) Life Cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology* 102, 207-214.
- Cormier, I., Prieto, A. A STELLA Model for Integrated Algal Biofuel Production and Wastewater Treatment. Proceedings of the Nutrient Recovery and Management Congress, 2011, Miami.
- De-Bashan, L., Bashan, Y. (2010) Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101, 1611-1627.
- Giménez García, J.B. (2010) Implantación de un sistema de bio-aumentación de la población de bacterias nitrificantes en una planta piloto con eliminación biológica de nutrientes. Efecto sobre el proceso de eliminación biológica de fósforo. Trabajo de investigación DEA, UV.
- Harun, R., Singh, M. (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1037-1047.
- Hernández, J.P., de-Bashan, L. (2006) Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella spp.* co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 190-198.
- Ho, S.H., Chen, C.Y. (2011) Perspectives on microalgal CO<sub>2</sub>-emission mitigation systems- A review. *Biotechnology Advances* 29, 189-198.
- Hoekema, S., Bijmans, M. (2002) A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas re-circulation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple non-sulfur bacterium. *International Journal of Hydrogen Energy* 27, 1331-1338.
- Hoffman, J.P. (1998) Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology* 34, 757-763.
- Hu, Q., Guterman, H. (1996) A Flat Inclined Modular Photobioreactor for Outdoor Mass Cultivation of Photoautotrophs. *Biotechnology and Bioengineering* 51, 51-60.
- Kommareddy, A., Anderson, G. (2003) Study of light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio-Reactor (PBR). ASAE Annual International Meeting Presentation, paper 034057. Las Vegas, USA.
- Kong, Q., Li, L. (2010) Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. *Applied Biochemical Biotechnology* 160, 9-18.
- Khazin-Goldberg, I., Cohen, Z. (2006) The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67, 696-701.
- Lim, S., Chu, W. (2010) Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology* 101, 7314-7322.
- Lodi, A., Binaghi, L. (2003) Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 656-660.

- Martínez, M.E., Sánchez, S. (2000) Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73, 263-272.
- Markou, G., Georgakakis, D. (2011) Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, *in press*.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20. 491-515.
- Moosbrugger, R.E.; Wentzel, M.C.; Ekama, G.A. y Marais, G.v.R. (1992). Simple titration procedures to determine H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> alkalinity and short-chain fatty acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acid/bases. Water Research Commission, Report No. TT 57/92. Research Report W 74, University of Cape Town, Pretoria, Republic of South Africa.
- Olguin, E.J. (2003) Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22 81-91.
- Oswald, W., Gotaas, H. (1957) Photosynthesis in sewage treatment. American Society of Civil Engineers, Paper No. 2849.
- Park, J., Jin, H. (2010) Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 8649-8657.
- Pittman, J. K., Dean, A. P. (2011) The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102, 17-25.
- Posten, C. (2009) Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* 9, 165-177.
- Pulz, O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 287-293.
- Pulz, O., Scheinbenbogan, K. (1998) Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 59,123-152.
- Quiang, H., Zarmi, Y., Richmond, A. (1998) Combined effect of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis*. *European Journal of Phycology* 33, 165-171.
- Ras, M., Lardon, L. (2011) Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 102, 200-206.
- Ramos de Ortega, A., Roux, J.C. (1986) Production of *Chlorella* biomass in different types of flat bioreactors in temperate zones. *Biomass* 10, 141-156.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R. (2010) Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, *in press*.

Richmond, A. (2000) Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *Journal of Applied Phycology* 12, 441-451.

Robles, A. (2010) Estudio en planta piloto de la aplicación de la tecnología de membranas para el tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas. Puesta en marcha, seguimiento y control del proceso.

Rodolfi, L., Zittelli, G. (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.

Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G. (2010) Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology* 101, 58-64.

Salerno, M., Nurdogan, Y. (2009) Biogas Production from Algae Biomass Harvested at Wastewater Treatment Ponds. Conference presentation at 2009 Bioenergy Engineering Conference Sponsored by ASABE. Seattle, Washington, October 2009.

Stephens, E., Ross, I. et al. (2010) Future prospects of microalgal biofuels production systems. *Trends in plant science* 15, 554-564.

Ugwu, C.U., Aoyagi, H., (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 99, 4021-4028.

Xin, L., Hong-yin, H. (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 5494-5500.

Yang, J., Li, X. (2011) Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella ellipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents. *Applied Energy*, *in press*.

Yuan, X., Kumar, A. (2011) Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology* 102, 3234-3239.

Wang, B., Lan, C. (2011) Biomass production and nitrogen and phosphorous removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresource Technology*, *in press*.

Wang, L., Min, M (2009) Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Applied Biochemical Biotechnology*.

Microscopía de la depuración biológica. SEAR,S.A. 1991.

Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente, Gobierno de España.



