

Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica

malgas

OPORTUNIDADES EMPRESARIALES ALREDEDOR DE LAS MICROALGAS EN EL LITORAL CANTÁBRICO

Acción gratuita cofinanciada por el FSE



Edición: AST Ingeniería S.L.

Parque Científico y Tecnológico de Gijón

C/ Los Prados 166, Ofics. 5-14

Cabueñes, 33203 Gijón, Asturias

Tlf.: (34) 985 09 92 11 Fax: (34) 985 09 12 13

www.ast-ingenieria.com

Diciembre 2013



Aplicaciones de las Microalgas. Estado de la Técnica por AST Ingeniería S.L. se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica



OPORTUNIDADES EMPRESARIALES ALREDEDOR
DE LAS MICROALGAS EN EL LITORAL CANTÁBRICO

Índice de contenidos:

1. Introducción y consideraciones generales.

2. Sistemas de cultivo de microalgas.

2.1 Factores para el crecimiento de microalgas

2.1.1 Luz

2.1.2 Nutrientes

2.1.3 Salinidad

2.1.4 pH

2.1.5 Oxígeno

2.1.6 Agitación

2.1.7 Temperatura

2.2 Principales sistemas de cultivo de microalgas

2.2.1. *Tecnología de cultivo de algas de primera generación: Sistemas abiertos*

2.2.2. *Tecnología de cultivo de algas de segunda generación: Sistemas cerrados*

2.2.2.1 *Cámaras de algas*

2.2.2.2 *Fotobioreactores*

2.2.2.3 *Sistemas de cultivo híbridos*

2.2.2.4 *Sistemas de cultivo heterotróficos*

2.3 Parámetros de diseño de los fotobioreactores

2.4 ¿Cómo se maximiza el cultivo de algas?

2.5 Separación y post-tratamiento de las algas producidas

2.5.1 *Separación*

2.5.2 *Post-tratamiento*

3. Depuración de aguas mediante microalgas.

3.1 Conceptos generales

3.2 Sistemas de depuración de aguas mediante algas

3.2.1 *Sistemas abiertos*

3.2.2 *Sistemas cerrados*

3.3 Principales especies de cultivo utilizadas en la depuración de aguas residuales

3.3.1 *Microalgas para la depuración de aguas residuales urbanas*

3.3.2 *Microalgas para la depuración de aguas residuales industriales*

3.3.3 *Microalgas para la depuración de aguas residuales de explotaciones ganaderas y agrícolas*

4. Biofijación de CO₂.

- 4.1 Efecto invernadero y cambio climático
- 4.2 El dióxido de carbono (CO₂) y su ciclo
- 4.3 Efectos ambientales del CO₂
- 4.4 El Protocolo de Kioto
- 4.5 Rol de las microalgas en el control del cambio climático global.
- 4.6 Estado del arte de la biofijación de CO₂ con microalgas: pasado, presente y futuro

5. Producción de biocarburantes a partir de microalgas.

- 5.1 Consideraciones generales
- 5.2 Microalgas como fuente de biodiesel
- 5.3 Retos y oportunidades en la producción de biodiesel con microalgas
 - 5.3.1 Selección de la especie de microalgas con mejores atributos
 - 5.3.2 Inducción del aumento de la productividad de lípidos
 - 5.3.3 Selección del tipo de reactor más adecuado para el cultivo de microalgas oleaginosas
 - 5.3.4 Recolección de biomasa celular y extracción de lípidos

6. Resumen y conclusiones.

1. INTRODUCCIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES

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

Las microalgas son generalmente organismos fotoautótrofos, es decir, organismos que obtienen la energía de la luz proveniente del Sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies de microalgas son capaces de crecer empleando la 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 los compuestos inorgánicos (sales).
- **Fotoheterótrofa:** las algas 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 lo tanto, de compuestos orgánicos y del CO₂. Algunas de estas algas son la especie *Spirulina platensis* o la especie *Chlamydomonas reinhardtii*.
- **Heterótrofa:** los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono de estas algas. Por lo tanto, existen algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, como por ejemplo la especie *Chlorella protothecoides*.

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

Las microalgas son las plantas con mayor crecimiento de la tierra (100 veces más rápido que los árboles) y pueden crecer en distintos ambientes tanto de pH como de temperatura.

El cultivo de microalgas no es una actividad nueva. Más de sesenta años de investigación en ficología aplicada avalan un conocimiento actual sobre producción masiva de microalgas que ha permitido su uso como alimento en la acuicultura de especies marinas, la depuración de aguas residuales y la producción de compuestos para sectores como la dietética y la cosmética. Se trata de productos cuyo valor de mercado permite llevar a cabo de forma rentable este tipo de actividad económica.

La producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra Mundial, para la producción de lípidos.

El empleo de las microalgas para la depuración de las aguas residuales ha sido promovido desde finales de los años cincuenta por Oswald (1957). Así mismo, en los años 70 se desarrollaron en los EEUU sistemas abiertos de

cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales en los que se transformaba la biomasa obtenida en metano (Ugwu, 2008). Sin embargo, este sistema de tratamiento se ha visto frenado debido a la gran superficie de terreno que necesita y a la utilización de otros sistemas de tratamiento como el de fangos activados.

No obstante, las algas son empleadas hoy en día en numerosas partes del mundo para el tratamiento de aguas residuales, pero a pequeña escala. La capacidad de las algas de eliminar del agua tanto nitrógeno como fósforo, entre otros, las convierte sin embargo en una posibilidad real para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales, demostrándose 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. Diversos autores han estudiado el consorcio algas-bacterias para la depuración de aguas residuales, en el 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.

En los últimos años, la Unión Europea ha apostado firmemente por la obtención de nuevas fuentes de energía limpia, como los biocombustibles. El objetivo es que en el año 2020 un 20% de la energía producida en Europa provenga de energías renovables. La motivación para este cambio de postura es no solamente la necesidad de reducir el uso de derivados de petróleo y, consecuentemente, la dependencia de los países exportadores, sino también el reducir las emisiones de los gases de efecto invernadero (Wackett, 2008).

El término biocombustible se refiere a los combustibles líquidos o gaseosos para el sector transporte, que son predominantemente producidos por la biomasa (Demirbas, 2008). Una clasificación actual incluye los términos biocombustibles de Primera, Segunda y Tercera generación:

- Los “Biocombustibles de Primera generación”, es decir el etanol y el biodiesel, son producidos de una parte específica, normalmente comestible, de plantas tradicionales como la caña-de-azúcar, la soja, el trigo, el maíz o la palma aceitera.
- Los “Biocombustibles de Segunda generación”, también denominados los biocombustibles celulósicos, son producidos de materias primas no alimentarias como son los residuos agroindustriales y las gramíneas forrajeras de alta producción de biomasa.
- Los “Biocombustibles de Tercera generación” son los producidos a partir de la materia prima modificada genéticamente. Los agentes de conversión, es decir, microorganismos y algas, también son modificados genéticamente para que el proceso sea más eficiente.

Al contrario que los biocombustibles de primera generación, las algas se pueden cultivar en cualquier lugar del mundo, no compitiendo en ocupar hectáreas con los cultivos alimentarios y suponiendo, además, un valor añadido en la cadena alimentaria.

Así mismo, tienen un rendimiento productivo mucho mayor que cualquier otro cultivo de biocombustibles, con muy alto contenido de BTU de combustión (3 veces más alta que la madera), proporcionando así un valor calorífico mayor a su energía y con cero contenido de emisión en azufre en su combustión, cumpliendo, por tanto, con los requerimientos más estrictos de emisiones para combustibles de transporte y ayudando así a los gobiernos europeos a alcanzar su objetivo de aumento del uso de biocombustibles en el transporte para el año 2020. Además, no existe impacto medioambiental en caso de vertido de algas accidental.

La idea de utilizar las microalgas con fines energéticos no ha surgido ahora, ya que existen estudios publicados hace más de treinta años en los que ya se hacía referencia. Recientemente, ha proliferado la idea de utilizar la biomasa de las microalgas cultivadas para la obtención de nuevas fuentes de biocombustibles, creando numerosas expectativas y confianza en una solución a corto plazo para los problemas asociados al uso de los combustibles fósiles.

Otras aplicaciones del cultivo de microalgas es su uso en plantas de carbón y en otras plantas industriales altamente contaminantes para facilitar el control de las emisiones de carbono, mediante la absorción y biofijación de grandes cantidades de CO₂ durante su cultivo. En dichos procesos de fijación de carbono, se generan créditos de carbono que suponen una tercera fuente de ingresos además de los derivados de la producción de aceite y de la biomasa. La biomasa algal también es utilizada en la fabricación de biogás que a su vez es una fuente de electricidad limpia.

La producción a escala industrial de algas para usos no energéticos comenzó en los años sesenta en Japón con el cultivo de la microalga *Chlorella* para su uso como aditivo en alimentación, extendiéndose su producción a países como los EEUU, Israel, India o Australia. Sin embargo, el consumo de microalgas para alimentación está restringido a unas pocas especies debido a la estricta legislación alimentaria. Las especies predominantes en forma de comprimidos o en polvo son *Chlorella*, *Dunaliella* y *Spirulina*, si bien 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 reducir principalmente el riesgo de enfermedades cardiovasculares. La fuente principal de estos ácidos grasos son los aceites de pescado, si bien, actualmente existe comercialmente el ácido docosahexaenoico (DHA) producido a partir de microalgas.

De las microalgas, sobretodo de la especie *Dunaliella salina*, se obtiene también β -caroteno, que tiene un amplio rango de aplicaciones como por ejemplo aditivo en cosméticos, como colorante y como fuente de provitamina A. Además, de la microalga *Haematococcus pluvialis* se obtiene astaxantina, que se emplea en la industria cosmética y nutracéutica, como colorante y en alimentación.

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

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

Así mismo, el carbón vegetal resultante de la pirólisis se emplea como fertilizante y se ha propuesto como un biocombustible que fija CO₂, aunque se encuentra aún en fase de estudio (Brennan 2010).

A pesar del potencial de las microalgas para su aprovechamiento en los sectores de la energía, la depuración y la fabricación de productos de alto valor añadido, su producción tanto a nivel industrial como semiindustrial se ha visto impedida principalmente por falta de rentabilidad económica. Los principales motivos, que a su vez constituyen posibles campos de mejora, son los siguientes:

- La selección de especies debe permitir tanto la producción de biodiesel como la producción de otros productos de valor añadido.
- Los sistemas de producción necesitan un mayor grado de desarrollo que permita alcanzar eficiencias fotosintéticas más altas.
- El mantenimiento de monocultivos, evitando la contaminación, es un problema a solventar en determinados sistemas de cultivo.
- Se deben reducir tanto la evaporación como las pérdidas de difusión de CO_2 .
- La energía consumida en el proceso debe ser minimizada, ya que en ocasiones el gasto energético total (por bombeo, transferencia de CO_2 , separación, secado, extracción, etc.) es superior a la energía obtenida.
- La existencia de pocas plantas industriales en funcionamiento, y el recelo de sus propietarios a compartir y difundir información, hace difícil la recolección de datos para realizar balances completos y la optimización de los sistemas productivos.

En consecuencia, la investigación actual en el campo de la producción y el cultivo de microalgas se desarrolla en varios frentes, como el de la ingeniería: diseño de fotobioreactores que aprovechen óptimamente la luz, la simulación de dinámica de fluidos para estudiar el efecto en la productividad de las condiciones hidrodinámicas y de la agitación, el estudio del empleo de membranas para inyectar el CO_2 en el cultivo, la modelación de los procesos de toma de nutrientes, etc, estudios orientados en definitiva a maximizar la productividad y disminuir el consumo energético.

Además del campo de la ingeniería, en biotecnología se están realizando por ejemplo estudios microbiológicos que pretenden reducir la energía requerida en un reactor para la fotosíntesis, reduciendo en los sistemas fotosintéticos de las microalgas el tamaño de la antena que recoge la luz, de tal forma que se permite que cada uno de ellos tome sólo la luz que necesita. 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 aumentando la eficiencia general (Stephens 2010). De esta forma se puede también disminuir la energía de agitación.

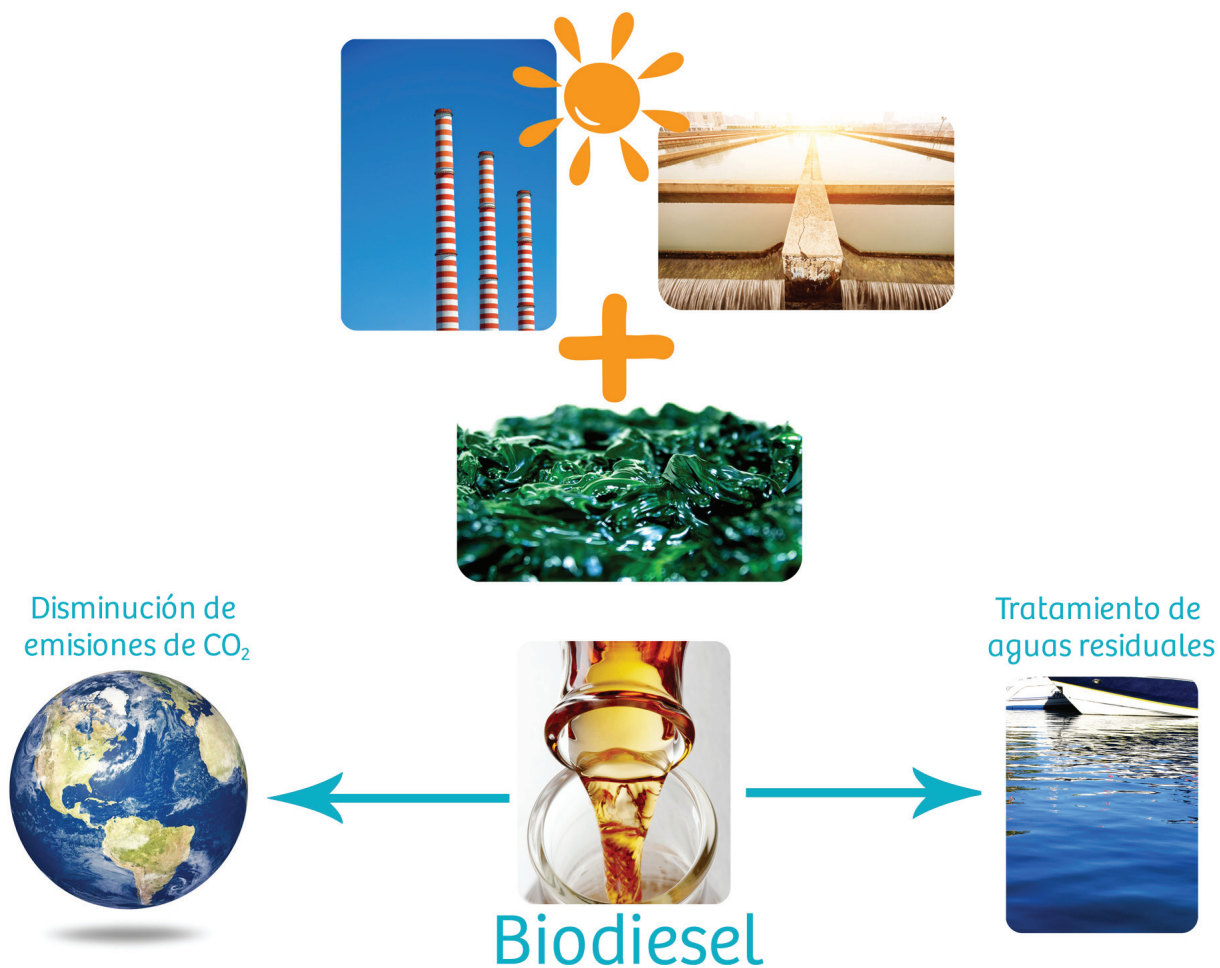
Por otro lado, las colecciones de algas existentes contienen infinidad de especies y cepas que, junto con los recientes avances en ingeniería genética, suponen una base importante sobre la que desarrollar procesos y sistemas de producción de microalgas que sean capaces tanto de aumentar las productividades de los procesos actuales como de producir nuevas sustancias de alto valor.

Además, se buscan microalgas que sean capaces por un lado de tratar aguas residuales de diferentes características y carga contaminante de modo estable y eficiente, y por otro que no presenten inhibición ante gases de escape que ahora son tóxicos. En este sentido se están desarrollando técnicas como la lipidómica, genómica y metabolómica que trabajan en la búsqueda y desarrollo de microalgas con gran capacidad de crecimiento, adaptabilidad al medio, tolerancia a contaminantes y habilidad de producir productos de alto valor añadido.

Así mismo, existe un gran potencial en la combinación de procesos en los que participan microalgas, como la obtención de biodiesel a partir de microalgas que a su vez fijan gases de escape o depuran aguas residuales, o la digestión anaerobia para obtención de metano de las microalgas una vez se les ha extraído los lípidos u otras sustancias de interés. Combinando la producción de microalgas y el tratamiento de aguas se produce un importante ahorro en el consumo de nutrientes, ya que éstos provienen de un agua residual que, a su vez,

ha de ser tratada. La combinación de varios procesos mejora por tanto la viabilidad tanto económica como medioambiental.

Reducción de la dependencia de los combustibles fósiles



Uso de algas como filtradoras de efluentes de piscifactorías y fuente de recursos de sustancias de interés energético, agronómico, piscícola y biomédico-farmacológico

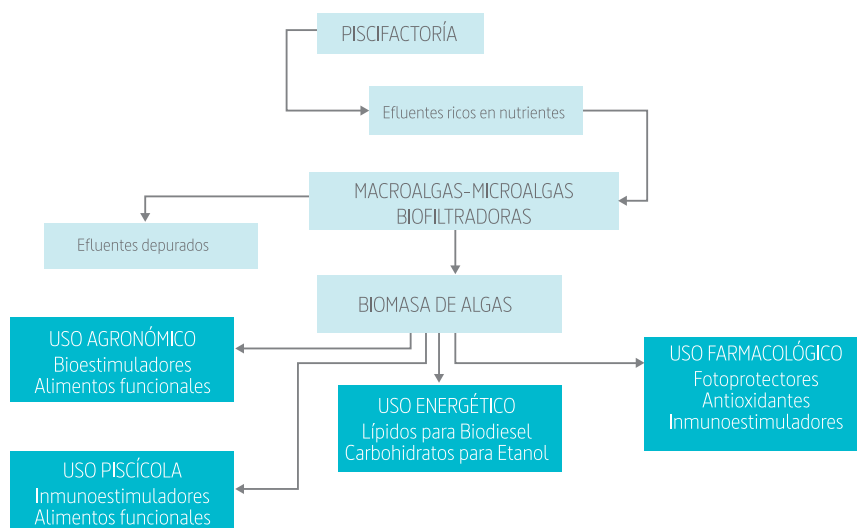


Gráfico adaptado. Fuente: "Acien G. et al. Energía de las algas, presente y futuro. Ed. BIOPLAT.

2. SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

2.1 Factores para el crecimiento de microalgas

Los factores influyentes en el crecimiento de las microalgas son comunes, sin embargo, cada especie y subespecie de microalga presenta sus características propias respecto a las condiciones óptimas de crecimiento, así como unas productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de sistemas de cultivo.

La productividad de las microalgas está determinada, principalmente, por el pH del medio, la salinidad, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y el tipo de luz, la densidad celular del cultivo, la temperatura y la contaminación o la depredación por otros organismos.

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).

2.1.1 Luz

La disponibilidad de luz es el principal factor limitante de los cultivos fotoautótrofos de microalgas. Los nutrientes inorgánicos e incluso el CO_2 pueden ser incorporados al medio de cultivo en exceso, de forma que nunca sean limitantes al crecimiento. Por el contrario, la luz debe ser continuamente suministrada al cultivo, ya que la energía radiante no se puede acumular (*Molina-Grima et al., 1996*).

El problema del control de la luz como factor de vital influencia en el crecimiento de las microalgas radica en la imposibilidad de definirlo mediante un único parámetro, ya que entran en juego intensidades, frecuencia de los cambios luz-oscuridad, duración de los ciclos, configuración del reactor o estanque, hidrodinámica etc.

Los organismos fotosintéticos sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm, lo que supone un 40% de la radiación total del Sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de conversión de energía lumínica en biomasa de alrededor del 1%. Sin embargo, en el caso de las microalgas se han demostrado eficiencias de conversión luz-biomasa entre 1 y 4 % en sistemas abiertos como estanques y aún mayores en fotobioreactores 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. A partir de éste valor máximo, el crecimiento se ve fotolimitado ya que los sistemas fotosintéticos receptores se ven dañados y la fotosíntesis, por tanto, inhibida. En la mayoría de las microalgas la fotosíntesis se ve saturada a niveles lumínicos que representan sobre el 30% de la radiación total solar, lo que supone unos 1.700 a $2.000 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Las microalgas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila A de sus células, de modo que las microalgas adaptadas a bajos niveles de

luminosidad tienen una respuesta más rápida a cambios en la intensidad luminosa ya que tienen más clorofila que las que están adaptadas a intensidades de luz altas.

La producción de microalgas al aire libre está condicionada generalmente a la luz recibida como factor limitante (Pulz, 1998). Por otro lado, las microalgas deben adecuarse a los cambios en la biomasa a lo largo del día debido a que las concentraciones óptimas de biomasa son diferentes para diferentes niveles de irradiación solar.

Por tal motivo, la iluminación artificial puede contribuir a una producción continua, pero con un mayor coste tanto económico como energético. Es importante, por tanto, conocer el espectro de absorción de las microalgas cultivadas, antes de la elección de luz artificial. Dicho espectro depende de los pigmentos mayoritarios presentes en ellas. Kommareddy y Anderson (2003), realizaron un estudio en el que utilizaban lámparas fluorescentes, incandescentes, halógenas, y LEDs (emitiendo en 643 nm), determinando que los LEDs son la fuente más eficiente y económica, ya que emiten más del 98% de su luz entre 600 y 700 nm.

2.1.2 Nutrientes

En función de los nutrientes empleados, las microalgas se pueden clasificar en autótrofas, heterótrofas, o mixotróficas. Es importante destacar que un déficit de nutrientes provoca en las microalgas una acumulación de lípidos siempre que haya luz y CO_2 disponibles (Rodolfi 2009, Khozin-Goldberg 2006).

Los principales nutrientes minerales que las microalgas toman del medio y necesitan para su desarrollo son:

Carbono: Las microalgas autótrofas pueden emplear como fuente de carbono el CO_2 presente en la atmósfera o en gases de escape, así como los iones bicarbonato (HCO_3^-) mediante la enzima anhidrasa carbónica. Son capaces de tolerar hasta unas 150.000 ppmv de CO_2 en aire de media, aunque hay especies de microalgas como *Chlorella*, que han demostrado que toleran hasta 400.000 ppmv. Cuando se provee a las algas de carbonato, se hace generalmente en forma de Na_2CO_3 y NaHCO_3 .

Se puede calcular estequiométricamente la necesidad de carbono conociendo la composición de la biomasa, resultando un mínimo de 1,85 g CO_2 /g biomasa. Por otro lado, para asegurar que las microalgas pueden tomar dicho CO_2 , su presión parcial en el líquido ha de ser de 0,1-0,2 kPa.

Los compuestos orgánicos proporcionan para las microalgas heterótrofas tanto la energía como la fuente de carbono. Así mismo, las microalgas mixotróficas 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, obteniendo el carbono de compuestos orgánicos y del CO_2 .

Nitrógeno: es otro de los macronutrientes esenciales en el crecimiento de las microalgas. El contenido en nitrógeno de la biomasa algal puede suponer desde un 1% hasta más del 10%, en función de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. Las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio generalmente en forma de urea, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno (NO_x). En un estudio (Xin 2010) se demostró que la microalga *Scenedesmus sp.*, crece más rápidamente con amonio, seguido de urea y finalmente de nitrato, en cambio, la eliminación de fósforo y nitrógeno fue más completa en el cultivo donde el nitrógeno estaba presente en forma de nitrato y urea que en el cultivo realizado con amonio, puesto que 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 debido a que es normalmente tóxico para los organismos fotosintéticos, ya que desacopla el transporte electrónico en el fotosistema II y compite con el agua en las reacciones de oxidación que generan el O_2 libre. La tolerancia al amonio depende de la especie cultivada: por ejemplo, *Spirulina* se ve prácticamente inhibida ante concentraciones de $200 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ mientras que *Chlorella sorokiniana* no muestra inhibición ante concentraciones de $400 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$. Lo que aún no se ha determinado es qué forma de nitrógeno es más beneficiosa energéticamente para la producción de microalgas.

El **fósforo** es tomado del medio en forma de ortofosfatos ($P-PO_4^{-3}$), cuya concentración en equilibrio con las formas protonadas depende del pH del medio. Factores como un pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio, ralentizan la toma de fosfatos por parte de las microalgas.

La cantidad necesaria de fósforo es mucho menor que la de nitrógeno para una misma cantidad de biomasa generada. Diversos autores concluyen que la toma de nutrientes por parte de las microalgas se ve influida por la relación N:P en el medio de cultivo, de modo que se producirá un mayor crecimiento y toma de nutrientes cuanto más próxima esté a la composición de las microalgas. Por ejemplo, para la microalga *Chlorella* la relación óptima es de 8:1 (Aslan y Kapdan, 2008). Sin embargo, como las microalgas son capaces de adaptarse al medio de cultivo pueden tomar, en principio, uno de los nutrientes en una proporción mayor que la presente en su composición celular.

Las microalgas requieren, para su crecimiento, además de otros **macro- y micronutrientes** (Richmond, 2004). Aparte del C, N y P, otros elementos son necesarios para el cultivo de microalgas, tanto macronutrientes (S, K, Na, Fe, Mg, Ca) como micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se), tal como se observa en la composición elemental de las células microalgales. Muchos de dichos elementos traza son relevantes en reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos necesarios para el metabolismo. Al igual que el P, estos iones traza muestran cierta afinidad por otros compuestos del medio y precipitan. Para evitar este problema, se añaden al medio agentes quelantes de metales, como el EDTA (especialmente el Na-EDTA, que es de fácil disolución).

2.1.3 Salinidad

La salinidad del medio de cultivo tiene una gran influencia en el crecimiento de las microalgas así como en la productividad de lípidos para biodiesel u otras sustancias de valor. Araujo (2011) en un estudio con diez cepas de microalgas diferentes observó cómo cada una respondía de modo distinto ante un cambio en la salinidad del medio de 25 g/L a 35 g/L , calculando los resultados de rendimiento y productividad de biomasa y de aceite por volumen cultivado. Sin embargo, especies de microalgas como *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis tetraathele* no presentaron cambios frente a la salinidad. La mayor productividad se alcanzó con *Chlorella vulgaris*, que alcanzó una relación biomasa inicial:final de 1:10.

2.1.4 pH

El pH del medio influye tanto en la proporción de las especies del equilibrio químico del CO_2 , y por tanto, en la alcalinidad del medio, como en la forma química en que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes necesarios. Cada especie de microalga tiene un rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de

qué especies químicas esté más habituada a asimilar. El pH en la mayoría de cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9, con un óptimo entre 8,2–8,7.

El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH⁻, lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por stripping a la atmósfera y la eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos.

El control de pH se consigue mediante aireación o inyección controlada de CO₂, pero también mediante la adición de ácidos o bases.

2.1.5 Oxígeno

El nivel de oxígeno disuelto es un parámetro que debe ser controlado en el cultivo de microalgas, ya que altas concentraciones de oxígeno disuelto pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima RuBisCo. Esta inhibición se ve favorecida por un déficit de CO₂ y por la alta radiación y temperatura.

Muchas especies de microalgas no son capaces de sobrevivir en un medio sobresaturado de oxígeno más de 2 o 3 horas. El nivel de saturación varía siendo para algunas especies el 120% de saturación en el aire mientras que para otras el 200%.

Así mismo, en cultivos de alta densidad, la producción fotosintética de oxígeno puede alcanzar hasta los 40 mg/L, de forma que con la radiación adecuada pueden llegar a desarrollarse radicales de oxígeno libres. Estos radicales son tóxicos para las células y causarían daños en sus membranas. La presión parcial del oxígeno en el cultivo puede disminuirse aumentando la turbulencia y *stripping* de aire.

2.1.6 Agitación

La agitación facilita la eficiencia en el transporte, impidiendo la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes del reactor, homogeniza el pH y asegura la distribución de los gases y de la luz. Con una correcta agitación se somete a las algas a ciclos rápidos de mezclado, en los que en cuestión de milisegundos pasan de una zona oscura a una zona iluminada.

El flujo turbulento es de gran importancia en cultivos de alta densidad, puesto que en el medio natural las densidades celulares del fitoplancton rondan las 10³ células/ml, de modo que la distancia media entre células es de 250 veces su diámetro, mientras que en sistemas artificiales de cultivo esta distancia se ve reducida a tan sólo 10 veces su diámetro, ya que se alcanzan densidades de 10⁹ células/ml. El flujo laminar provoca, además de una distribución heterogénea de la luz, gradientes de difusión.

Sin embargo, no todas las especies toleran una agitación fuerte que suponga un buen mezclado en el reactor, ya que son sensibles al estrés hidrodinámico.

2.1.7 Temperatura

En el crecimiento de las microalgas, la temperatura es un factor a considerar, puesto que influye en los coeficientes de velocidad de las reacciones biosintéticas (Richmond, 1986). La relación entre temperatura y velocidad de crecimiento aumenta exponencialmente hasta que se alcanza la temperatura óptima.

A pesar de que una gran variedad de microalgas son capaces de desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, como la especie *Chlorella* que puede crecer entre 5 y 42°C, todas ellas presentan un rango fuera del cual se ven inhibidas e incluso mueren.

Por otro lado, si existe una fluctuación muy amplia entre la temperatura máxima y mínima, puede ser igual de importante tanto el calentamiento durante las horas del día con poca luz como la refrigeración durante las horas de mayor iluminación. En este sentido, conviene cuando sea posible el empleo de frío o calor recuperado del mismo proceso o de un proceso industrial asociado, para mantener un balance neto favorable de energía. La refrigeración puede ser evitada mediante el uso de sistemas que regulen la cantidad de luz que llega al reactor, como sistemas de sombra, dilución de la luz, etc.

Diversos autores han 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.

2.2 Principales sistemas de cultivo de microalgas

Las microalgas se pueden cultivar de manera fotoautótrofa, fotoheterótrofa, 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 el tipo de funcionamiento en:

2.2.1 Tecnología de cultivo de algas de primera generación: Sistemas abiertos

El 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. Los sistemas artificiales presentan diferentes diseños: inclinados (de capa fina), circulares y los más extendidos son los estanques de carrusel o canales (*raceway ponds*).

Los canales o “raceway ponds” suelen ser canales de hormigón ovalados poco profundos (de unos 15-20 cm) en forma de circuito cerrado, donde el cultivo es recirculado y mezclado para favorecer la estabilización del crecimiento y la productividad de las microalgas. Elementos como un rodete, hélices, inyector de aire, etc., se suelen encargar 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 bucle hasta el punto de extracción, evitándose así también la sedimentación.

Debido a la poca profundidad de los canales, la difusión desde la atmósfera permite a las algas obtener el CO₂ necesario para su crecimiento. No obstante, se pueden instalar difusores en el fondo del estanque y reflectantes de luz para poder aumentar la profundidad de los mismos.



Creative Commons Texas A&M AgriLife. <http://www.flickr.com/photos/agrilife/>

Otro tipo de sistemas de cultivo abierto son “piscinas inclinadas” en las que la turbulencia es creada por la propia gravedad. Presentan una serie de inconvenientes tales como la fuerte evaporación, la ineficiente utilización del terreno y la sedimentación de las células en los sectores en los que la velocidad de flujo es menor, así como el coste energético de bombear el cultivo de nuevo a la parte superior.

También existen “tanques circulares” para el cultivo de microalgas pero este sistema presenta una serie de desventajas tales como la ineficiente utilización del terreno, el elevado coste de las construcciones de hormigón y el alto consumo de energía. En los estanques circulares la agitación se realiza mediante una pala que gira recorriendo toda la superficie. A pesar de ser costosos en su construcción y operación, son muy usados en Japón, Taiwán e Indonesia para la producción de *Chlorella* (Lee, 2001).

Tanto los tanques circulares como las piscinas inclinadas no son sistemas comerciales que se empleen en la actualidad.



Creative Commons Sandialabs. <http://www.flickr.com/photos/sandialabs/>

La producción mediante estanques o lagunaje es un método más barato en comparación con los fotobioreactores, tanto en inversión como en mantenimiento y consumo energético durante el funcionamiento.

Sin embargo, 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, lo que es posible en el cultivo de microalgas extremófilas, pero no con otro tipo de microalgas. Por ejemplo, *Chlorella*, *Dunaliella salina* y *Spirulina* presentan esta opción, mediante el control de un alto nivel de nutrientes, una elevada salinidad y una 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 CO₂ 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.

Ventajas

- Barato de construir
- Bajo coste de funcionamiento.

Desventajas

- Baja productividad (bajas densidades del cultivo)
- Grandes superficies de cultivo necesarias
- Trabajo intensivo preciso
- Falta real de control de cultivo
- Riesgos de enfermedades bacterianas para las algas (Fagos)
- Complejo control de la temperatura
- Dificultad de mezclado eficiente
- Potencial falta de CO₂
- Limitación de la luz en capas inferiores.

2.2.2 Tecnología de cultivo de algas de segunda generación: Sistemas cerrados

Los sistemas cerrados de cultivo de algas surgieron para solucionar la problemática de los sistemas de cultivo abiertos. Son sistemas más caros pero suplen las carencias de los sistemas tradicionales.

Los sistemas cerrados se encuentran en total aislamiento con el ambiente exterior y, por tanto, sin contacto directo con la atmósfera. Este aislamiento total del medio externo supone una reducción total de la contaminación, un mayor control de las condiciones de cultivo y, en general, una mayor rentabilidad.

2.2.2.1 Cámaras de algas

Las cámaras de algas son sistemas cerrados de pequeña escala de producción. En ellas se llevan a cabo cultivos de algas escalares donde el volumen del cultivo va aumentando.

Existen recipientes de tamaños muy diversos en los que se mantiene el cultivo bajo unas condiciones muy controladas de temperatura, luz, etc.

El control del parámetro temperatura se realiza con una combinación de termostatos y calefactores, mientras que la luz aplicada es artificial y se suele aportar por medio de tubos fluorescentes que permiten una distribución homogénea de la luz y de la radiación ultravioleta, así como un control de la temperatura, ya que emiten poca cantidad de calor.

En función de las necesidades de cada tipo de cultivo se pueden elegir diferentes tipos de materiales con distintas características de espectro lumínico.

Creative Commons Microphyt. <http://www.flickr.com/photos/microphyt/>



2.2.2.2 Fotobioreactores

Un fotobioreactor es un sistema cerrado forzado al máximo en busca de la obtención del mayor crecimiento de la microalga que se desee cultivar.

Los fotobioreactores se caracterizan por la regulación y control de la mayoría de parámetros de crecimiento importantes, al mismo tiempo que reducen el riesgo de contaminación y las pérdidas de CO₂ por difusión. Además, permiten condiciones de cultivo reproducibles, el control de la temperatura y un diseño flexible (Pulz, 2001).

En estos equipos, la luz no incide directamente en las células, sino que atraviesa unas paredes transparentes para llegar hasta ellas. Por ello en los fotobioreactores cerrados el intercambio directo de gases entre el cultivo y la atmósfera suele estar fuertemente limitado. La principal consecuencia es la acumulación de oxígeno en su interior.

Las posibilidades técnicas de un fotobioreactor cerrado son mucho mayores que las de los sistemas abiertos. Pueden clasificarse según su diseño y modo de operación:

- Desde el punto de vista del diseño, los fotobioreactores pueden clasificarse como: (a) planos o tubulares, (b) horizontales, verticales, inclinados o espirales, (c) serpentines (tubos acodados, circulación en serie) o (d) múltiples (circulación en paralelo desde un colector repartidor a uno recogedor).
- Desde el punto de vista del modo de operación, los fotobioreactores pueden clasificarse como: (a) impulsados agitados por aire o por bombas, (b) reactores de una fase (el intercambio de gases se produce en una cámara separada) o (c) reactores de dos fases (no existe cámara de intercambio de gases, sino que éste se produce a lo largo de todo el reactor).

La elección del tipo de fotobioreactor es complicada y no debe hacerse sin un estudio previo de la especie a cultivar que incluya la resistencia a condiciones ambientales o hidrodinámicas, los costes de operación, la necesidad de esterilidad, el valor del producto final o de los recursos hídricos o de suelo disponibles (Ugwu *et al.*, 2007).

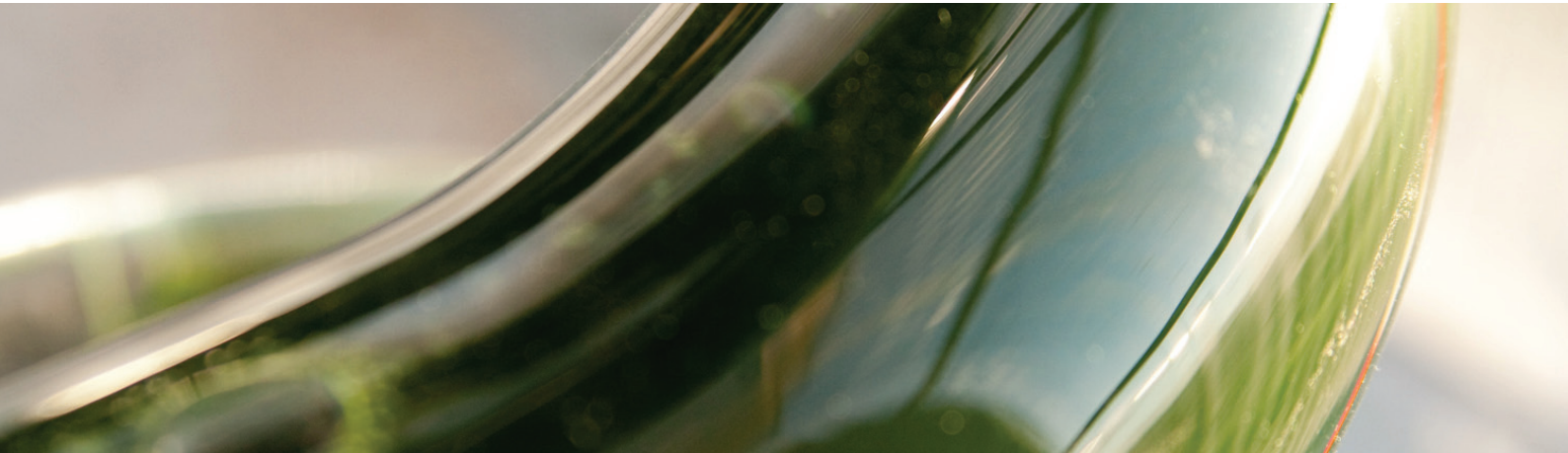
De todas las posibles configuraciones, los fotobioreactores cerrados que más están siendo investigados para su aplicación a la producción comercial de sustancias de alto valor añadido, son:

• Fotobioreactores tubulares:

Los reactores tubulares son uno de los fotobioreactores más adecuados para cultivos en el exterior, debido a su alta relación área iluminada/volumen reactor. La transferencia de materia así como el grado de agitación en los fotobioreactores tubulares son limitados, causando altas concentraciones de O₂. Los problemas de fotoinhibición también son comunes, ya que si no hay un buen grado de mezcla las células de la superficie reciben grandes cantidades de luz, mientras que a las interiores no les llega la suficiente (Ugwu *et al.*, 2007).

A principios de los 80, Pirt y colaboradores desarrollaron un fotobioreactor tubular que posteriormente fue patentado (Pirt *et al.*, 1983).

Molina-Grima y colaboradores han contribuido con importantes avances al desarrollo de los fotobiorreactores. El reactor de mayor tamaño que han desarrollado es un reactor tubular horizontal, con desorción en columna airlift, de 30.000 litros, instalado en el interior de un invernadero, para amortiguar los cambios de temperatura (*Molina- Grima, 2008*).



Creative Commons Microphyt. <http://www.flickr.com/photos/microphyt/>

• **Fotobiorreactores de paredes planas, inclinados o verticales:**

Formados por dos láminas de materiales transparentes generalmente de plástico (rígido o flexible) verticales o inclinadas, entre las que se agita el cultivo mediante sistemas mecánicos o neumáticos.

El espacio entre las láminas suele ser de entre 1 y 20 cm, y la altura de las mismas de hasta 2 m. Tienen la ventaja de posibilitar grandes superficies de cultivo expuestas a la luz por unidad de superficie de terreno (hasta 500 m² irradiados/100m²), aunque resulta difícil mantener las turbulencias adecuadas.

Las concentraciones de O₂ disuelto son bajas y las eficiencias fotosintéticas que se alcanzan son altas.

Tiene ciertos problemas, como la dificultad de escalado, la imposibilidad de controlar la temperatura y un posible estrés hidrodinámico de ciertas especies (*Ugwu et al. 2007*).

Este tipo de reactores han sido ampliamente investigados por Tredici y colaboradores (*Tredici et al., 1991, Tredici y Chini-Zitelli, 1998*). Una nueva versión de reactores planos está construida con bolsas de plástico e inmersos en un estanque de agua para regulación térmica.

Las principales ventajas de los sistemas de bolsas de plástico verticales son:

- Más superficie solar para inculcar el cultivo
- Mayor producción por hectárea que los estanques

Sin embargo los sistemas de bolsas de plástico presentan las siguientes desventajas:

- Trabajo intensivo preciso
- Falta real de control de cultivo
- 4 años de vida útil para las bolsas de plástico
- Obstrucción de bolsas debido a la adherencia de las algas a las bolsas



Creative Commons Universidad EAFIT. <http://www.flickr.com/photos/eafit/>

• Fotobioreactores de columna vertical:

Los fotobioreactores de columna vertical constan de un tubo vertical de altura generalmente entre 1 y 3 m, y un diámetro que oscila entre 5 y 50 cm, en el que se burbujea aire desde el fondo (Ugwu *et al.*, 2007) como sistema de agitación. Son compactos y de bajo coste, y muy sencillos de esterilizar y de operar monosépticamente. La desorción de gases tiene lugar en la parte alta de la columna. Se estima que pueden ser adecuados para el cultivo a gran escala, sin embargo, tampoco existen aplicaciones comerciales.

Por su posición vertical absorben menos radiación que los dispuestos horizontalmente, pero no acumulan oxígeno. Estos reactores suelen utilizarse como sistemas de producción de inóculos debido al elevado control de las condiciones de operación que se alcanzan en los mismos.

• Fotobioreactores iluminados interiormente:

La iluminación interior de los fotobioreactores puede ser natural, mediante el uso de colectores solares y fibra óptica que recogen luz solar del exterior y la transfieren al interior de los reactores, o puede ser artificial, mediante lámparas fluorescentes. Los reactores con colector solar siguen siendo investigados actualmente, dado su gran potencial de productividad porque reduce los problemas de accesibilidad a la luz y la fotoinhibición, así como por su rentabilidad. La iluminación artificial sólo se está considerando generalmente en la investigación, puesto que el consumo de energía es muy elevado para ser utilizada en producciones comerciales.

Creative Commons Los Alamos National Laboratory. <http://www.flickr.com/photos/losalamosnatlab/>

En función del material empleado en la construcción, se pueden distinguir:

• **Fotobioreactores de plástico:**

Ventajas

- Alta productividad
- Control básico del cultivo

Desventajas

- Trabajo intensivo preciso, requiere la limpieza de tubos
- 4 años de vida útil de los tubos de plástico
- Obstrucción de tubos debido a la adherencia de las algas al plástico

• **Fotobioreactores de aluminio y cristal:**

Ventajas:

- Alta productividad por km^2
- Posibilidad de producción continua
- Total control del crecimiento del alga
- Sistema de autolimpieza
- Tiempo mínimo de mantenimiento
- Vida útil de 30 años
- Amplia área para luz en el sistema
- No hay partes plásticas
- Mínimos costes de operación y mantenimiento
- Bajo consumo de energía

Desventajas:

- Mayor coste de inversión por km^2 que otros sistemas de producción hasta que se alcancen las economías de escala

2.2.2.3 Sistemas de cultivo híbridos

Recientemente ha sido propuesto el uso de **sistemas híbridos** que combinan diferentes etapas del crecimiento en fotobioreactores y lagunas abiertas o estanques. Generalmente estos sistemas consisten en una primera etapa de producción de la biomasa en fotobioreactores, donde hay mayor control de las condiciones ambientales, minimizando la contaminación y maximizando la división celular. En la segunda etapa las microalgas son cultivadas en lagunas abiertas para acumulación de productos inducidos por la deficiencia de nutrientes de ese sistema (Brenan y Owende, 2010; Hernández *et al.*, 2009).

2.2.2.4 Sistemas de cultivo heterotróficos

Un número significativo de microalgas es capaz de crecer en ausencia de luz, usando sustratos de carbono orgánico, como la glucosa. En los sistemas heterotróficos, el cultivo de las algas se realiza en bioreactores agitados, en una adaptación de la tecnología de fermentación. Son sistemas que permiten fácil cambio de escala y generan la mayor densidad de biomasa producida. Así mismo, proporcionan un alto grado de control del crecimiento y la reducción de los costes de cosecha, pero tienen un consumo de energía mayor (Borowitzka, 1999).

Ese tipo de cultivo es usado actualmente para la producción comercial del alga *Cryptocodinium cohnii*, para producción de ácidos grasos ricos en omega 3 (Martek, 2010) y de *Chlorella* en Japón. Recientemente, Li *et al.* (2007) testaron su uso en la producción de biodiesel, concluyendo que con esta técnica de cultivo es posible alcanzar un mayor grado de lípidos en las microalgas, lo que favorecería su uso en comparación al uso de fotobioreactores (Li *et al.*, 2007).

2.3 Parámetros de diseño de los fotobioreactores

Los criterios comunes de diseño de un fotobioreactor son aquellos que conllevan una alta productividad volumétrica y de conversión de energía lumínica de forma económicamente viable. Un fotobioreactor eficiente no se puede diseñar sin los adecuados conocimientos del comportamiento de las microalgas durante su cultivo. Por tal motivo y, centrándonos en el cultivo de microalgas fototrofas, los fotobioreactores deben ser diseñados para un organismo y unas condiciones ambientales concretas, ya que las microalgas presentan gran diversidad en cuanto a morfología, requerimientos nutritivos y de luz y resistencia a diferentes tipos de estrés, como el hidrodin.

Los principales criterios de diseño son: relación superficie iluminada/volumen del reactor, orientación e inclinación, sistemas de mezcla y desorción de gases, sistemas de limpieza, transparencia y durabilidad del material, y sistemas de regulación de la temperatura. Para los fotobioreactores comerciales son además de gran importancia la facilidad de operación y de escalado, así como los bajos costes de construcción, operación y mantenimiento.

Un parámetro importante en el diseño de un fotobioreactor 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 fotobioreactor, y la atenuación depende de la longitud de onda de la radiación y la densidad del cultivo, provocando un gradiente de intensidad de luz en su dirección de penetración. Para cada especie, es necesario encontrar 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 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 flujo turbulento es de gran importancia en cultivos de alta densidad, puesto que el flujo laminar provoca, además de distribución heterogénea de la luz, gradientes de difusión. Según este principio, los fotobioreactores con alta densidad de cultivo han de ser generalmente 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. El movimiento o la mezcla de las células en el sistema es esencial para evitar sedimentaciones, estratificaciones térmicas, para distribuir los nutrientes, etc; el movimiento del oxígeno generado fotosintéticamente es positivo para facilitar su escape y conseguir además turbulencia en las células microalgales, provocando con ese movimiento que pasen en el interior del tubo por periodos de luz-oscuridad alternos. La velocidad media de flujo en los diferentes sistemas existentes se ha establecido en unos 20-30 cm/s, puesto que el empleo de una velocidad mayor puede afectar a las microalgas cultivadas, ya que son sensibles al estrés hidrodinámico.

En cuanto a la geometría del reactor, ésta condicionará el recorrido realizado por las células mientras son impulsadas por la agitación. Por ejemplo, en los reactores tubulares, a mayor diámetro mayor recorrido y tiempo necesario para pasar de la zona iluminada (zona fótica) a la zona oscura. El tiempo que tarda una célula en hacer este recorrido se denomina como ciclo luz/oscuridad. Por tal motivo, uno de los mayores esfuerzos en la investigación aplicada de microalgas se ha centrado en el diseño de fotobioreactores que optimizan las condiciones de agitación, la superficie iluminada, la penetración de luz, etc., para que cada célula reciba una iluminación adecuada. Éste sigue siendo actualmente uno de los retos de la investigación (Pulz, 2001).

El suministro de carbono, en forma normalmente de CO_2 , y la eliminación del oxígeno generado son, después de la distribución de luz, la cuestión de mayor importancia en un fotobioreactor.

Una ventaja de los fotobioreactores frente a los sistemas abiertos de cultivo (estanques) es un menor escape de CO_2 a la atmósfera. Recientemente las investigaciones se centran en el uso de membranas para favorecer la transferencia de gas al seno del fluido en el cultivo (Posten 2009).

La acumulación de oxígeno derivado de la actividad fotosintética es uno de los principales factores que limitan el desarrollo de los fotobioreactores, estando la cantidad de oxígeno producido directamente relacionada con el volumen del sistema. Con una buena tasa fotosintética la concentración de oxígeno disuelto puede alcanzar un nivel en torno a 4-5 veces al valor de saturación en aire. En cantidades de saturación, la concentración de oxígeno en el aire, ronda los 7,2 mg O_2 /L, asumiendo este nivel como el 100% de saturación, en los fotobioreactores pueden producirse acúmulos peligrosos de niveles de oxígeno como consecuencia de la alta tasa fotosintética que van a experimentar las microalgas. Dado que estos niveles son tóxicos para los organismos fotoautótrofos, es frecuente el empleo de sistemas de desgasificación para su extracción. En sistemas de cultivo vertical, los sistemas de desgasificación son más fáciles, ya que es suficiente con suministrar aire, que favorece la salida del oxígeno por la parte superior; por el contrario, en sistemas horizontales se debe diseñar un sistema que favorezca la salida

del oxígeno. La salida del oxígeno generado por las microalgas es de gran importancia puesto que, cuando se producen las reacciones oscuras de la fotosíntesis, donde se sintetizan los compuestos orgánicos, si tenemos una gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua va a favorecer la reacción de fotorespiración de las algas, donde el carbono orgánico creado va a ser transformado de nuevo en CO_2 . Esto implica una pérdida considerable de la biomasa creada con anterioridad.

En sistemas cerrados de cultivo, como los fotobioreactores, es necesaria además la refrigeración adicional en zonas cálidas, donde la relación entre nivel de luz y la temperatura puede afectar en gran medida a la biomasa algal. La temperatura puede ser controlada fácilmente por varios mecanismos, como rociadores de agua, inmersión del colector solar en un baño (piscina) termostatzado, situar reactor dentro de un invernadero, etc (*Reboloso-Fuentes, 1999*).

La automatización de los procesos de producción de microalgas es imprescindible, tanto para la reducción del coste de producción por minimización de la mano de obra necesaria como, principalmente, por la mejora de la producción. Esta mejora viene dada por la adecuación de las condiciones de cultivo a los requerimientos de las diferentes especies y por el aseguramiento de la producción como consecuencia del mantenimiento de la estabilidad de los mismos.

La automatización puede realizarse en muy diferentes niveles, desde un menor nivel de automatización que implicaría sólo los trasiegos de líquidos (medio de cultivo, cultivo, cosechado) necesarios para la operación en continuo de los reactores, hasta el mayor nivel de automatización que implicaría el control de todos los parámetros de cultivo como el pH, la temperatura, la agitación, el oxígeno disuelto, etc. En todos los casos es necesario un mínimo control y automatización del proceso para asegurar su estabilidad y producción. A partir de dicho mínimo, se pueden incorporar todo tipo de mejoras como el control de pH por inyección de CO_2 y/o gases de combustión, lo que repercute notablemente en el aumento de la productividad con un bajo incremento del coste. Sin embargo, la automatización excesiva no sólo puede incrementar de forma insostenible el coste sino que puede incluso introducir inestabilidad en el sistema. Actualmente se están desarrollando diversas herramientas para el control y automatización de tareas en procesos de producción de microalgas (*Berenguel M, et. al, 2004*).

2.4 ¿Cómo se maximiza el cultivo de algas?

Los factores a tener en cuenta para maximizar el cultivo de algas son los siguientes:

- Escoger las cepas de alga adecuadas (se conocen más de 6.000 cepas).
- Mantener una concentración de CO₂ óptima en todo el sistema con inyecciones a intervalos regulares.
- Aplicar todas las longitudes de onda de luz necesarias en el sistema mediante reflectores y un diseño adecuado.
- Filtrar espectros de luz dañinos para que no se adentren en el sistema.
- Eliminar el oxígeno para evitar el envenenamiento de la capa superior.
- Monitorizar la profundidad del cultivo de alga para asegurar una cosecha adecuada.
- Asegurar una correcta circulación de agua y nutrientes.
- Mantener una temperatura óptima de cultivo en todo momento.
- Prensar las algas antes del cosechado.
- Ubicar el sistema en un invernadero.

Es muy importante optimizar la luz necesaria para el cultivo puesto que, mientras más adecuada sea la luz solar que reciba el sistema mejor tasa de crecimiento tendrá, ya que esto proporciona todas las longitudes de onda necesarias para un cultivo continuo de microalgas. Sin embargo, las microalgas absorben y se cultivan sin problemas en luz difusa o reflejada (albedo), como aquella que proporciona un día nublado; si se incorporan reflectores al sistema de cultivo, éstos aumentan la luz albedo que entra en el sistema, fortaleciendo así el cultivo de algas con niveles bajos de luz.

Un día medio proporcionará aproximadamente 6 horas de luz solar al sistema y por tanto limita a un máximo de 8 horas la productividad diaria. Sin embargo, con el uso de matrices de luz de crecimiento agrícola de LED avanzados durante días particularmente nublados y por la noche, en invernadero, se garantiza un cultivo continuo de 24 horas/día.

2.5 Separación y post-tratamiento de las algas producidas

2.5.1 Separación

En la producción de microalgas, su separación del medio de cultivo supone entre el 20 y 30% del coste total (Molina Grima 2003), lo que supone que esta etapa es determinante en la rentabilidad y en el balance energético del proceso.

Las microalgas son, en general, difíciles de separar por su pequeño tamaño, si bien, algunas cianobacterias sedimentan por su tamaño (decantación espontánea) o flotan, y algunas microalgas forman agregados (biofloculación), lo que facilita su decantación.

Un método de extracción o cosecha adecuado podrá involucrar una o más etapas y será realizado en sistemas físicos, químicos y/o biológicos, con la finalidad de remover gran cantidad de agua y procesar grandes volúmenes de biomasa algal. La experiencia ha demostrado que todavía no existe un método de separación universal y esa es actualmente un área en la que hay bastante espacio para investigación y desarrollo (Mata *et al.*, 2009).

La técnica de separación depende de la especie de microalga, la densidad del cultivo, el uso posterior y factores económicos como el precio del subproducto obtenido. Normalmente, 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% (mediante 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** sólo es factible 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 (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.
- En el caso de la **decantación**, su eficacia depende del radio de las microalgas y su densidad. Es el método más empleado en el tratamiento de agua residual, debido a las grandes cantidades de biomasa con que se trabaja y su bajo valor añadido, pero sólo es posible en algunos casos, como en el alga *Spirulina*. Aplicándose **ultrasonidos** previos a la decantación se optimiza 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 de mantenimiento del equipo, así como el peligro de dañar las células debido al esfuerzo cortante, por lo que no siempre es un sistema rentable. 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: por ejemplo, para volúmenes menores a 2 m³/día, la rentabilidad es mayor que en el caso de centrifugación (Brennan 2010); Para mayores volúmenes (>20m³/día) los costes de bombeo y de reemplazo de las membranas pueden hacer perder competitividad. La filtración se puede realizar 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 que aumenta la resistencia a la filtración. No obstante, existen pretratamientos para contrarrestar este efecto.

La selección de la técnica adecuada de cosecha es, por tanto, fundamental en el cultivo y producción de biomasa de algas. Y, por tanto, debe ser un factor considerado en la selección de especies a ser utilizadas.

Para elegir el procedimiento de separación adecuado, se debe considerar la calidad necesaria y el valor añadido del producto final deseado. En caso de que sea un producto de relativo bajo valor (como biocombustibles), deberá utilizarse solamente sedimentación por gravedad, generalmente reforzada por floculación. Para productos de alto valor agregado y que necesiten de alta calidad, tales como aditivos de alimentos o con aplicaciones farmacológicas, es recomendable el uso de centrifugas que pueden procesar grandes volúmenes de biomasa y, además, estos dispositivos pueden ser higienizados y esterilizados fácilmente de forma que se evita efectivamente la contaminación.

Otro criterio básico para la selección del proceso de extracción es su potencial para ajustar el nivel aceptable de humedad de forma que se faciliten los procesos posteriores. Por ejemplo, la biomasa cosechada por sedimentación posee humedad más alta que aquella centrifugada. En el caso de la reducción de humedad por calor, ésta es aún más cara que la centrifugación, por lo que el uso de este método de cosecha es justificable sólo cuando se necesite la biomasa deshidratada.

2.5.2 Post-tratamiento

Una vez separada la biomasa de algas del medio de cultivo (5-15% peso seco), ésta debe ser rápidamente procesada, pues es altamente perecible, pudiendo dañarse en pocas horas, dependiendo de la temperatura ambiente (Mata *et al.*, 2010); Brennan & Owende, 2010).

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

En el caso de extracción de productos de interés, es normal la necesidad de romper las células previamente para recuperarse los productos intracelulares, como son los aceites. La mayor parte de los métodos de ruptura de las células aplicados a las microalgas fueron adaptados de aquellos usados en microorganismos no fotosintéticos y de las plantas oleaginosas, e incluyen prensado, uso de solventes, homogeneización a alta presión, autoclavado o uso de enzimas.

3. DEPURACIÓN DE AGUAS MEDIANTE MICROALGAS

3.1 Conceptos generales

Las aguas residuales presentan elevadas concentraciones de contaminantes, como nitrógeno, fósforo y metales pesados, que deben eliminarse antes de que éstas sean vertidas al Dominio Público Hidráulico, con el fin de evitar problemas que pueden llevar a la degradación de la calidad ambiental de toda una zona. Actualmente, existen procesos eficaces para eliminar estos contaminantes de las aguas residuales, pero estos procesos tecnológicos presentan una serie de inconvenientes derivados de su elevado coste y complejidad de operación, la generación de residuos (lodos) o su alto consumo energético. Para eliminar estas desventajas, diversos investigadores han centrado sus estudios en depurar aguas residuales con algas mediante técnicas de biorremediación.

Por biorremediación se entiende la utilización de organismos vivos, de cualquier reino, para depurar ambientes contaminados. La fitodepuración es la utilización de plantas verdes (macrófitas o micrófitas) para depurar efluentes líquidos y/o gaseosos. La fitodepuración es, por lo tanto, una técnica específica de biorremediación.

La fitodepuración permite la eliminación simultánea de las sustancias contaminantes de las aguas residuales, que para las plantas pueden ser nutrientes, y del CO_2 de la atmósfera, utilizando para ello el metabolismo de las plantas verdes y la energía del sol. Como resultado del metabolismo se produce un aumento de la biomasa más o menos pronunciado, dependiendo de la especie vegetal que se utilice como biofiltro, y de las condiciones existentes de insolación, temperatura y concentraciones de nutrientes en el agua residual.

Como ventaja frente a otras técnicas de depuración de aguas residuales, la fitodepuración permite aprovechar la capacidad de las plantas verdes de metabolizar sustancias contaminantes con la ayuda de la energía solar. Por lo tanto, la energía consumida para depurar es gratuita.

Otra ventaja de la fitodepuración es el hecho de que las plantas necesitan del CO_2 atmosférico para absorber los contaminantes del agua, fijando ambos en la biomasa que constituye sus tejidos y liberando oxígeno (O_2). Por lo tanto, al implantar un sistema de fitodepuración no sólo se depuran las aguas contaminadas, sino que también se contribuye a mitigar el efecto invernadero.

El uso de microalgas para tratamiento de diversos tipos de aguas residuales contaminadas, ha sido objeto de estudios en los últimos años (Phang *et al.*, 2000; Grönlund, 2002; Olguín *et al.*, 2003; Olguín, 2003; Bécares, 2006; Hu y Sommerfeld, 2004; Asplund, 2008; González *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2008) y más recientemente combinando la depuración de las aguas con la producción de biomasa algal para la producción de biocombustibles (Bhatnagar *et al.*, 2010; Johnson y Wen, 2010; Li *et al.*, 2010).

No obstante, en la actualidad el uso de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales se emplea a pequeña escala. 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 algal generada

del agua depurada, debido al pequeño tamaño de las microalgas y su baja densidad, sobre todo, en un sistema de canales de oxidación o estanques. En este sentido, se ha investigado con especies de cianobacterias filamentosas con alta capacidad de autofloculación, así como con biomasa fijada mediante técnicas de separación. Por otro lado, para una eliminación efectiva de nutrientes es necesaria la selección de especies de microalgas que soporten las condiciones del medio y las posibles concentraciones de contaminantes, así como una productividad alta de biomasa fotosintética.

3.2 Sistemas de depuración de aguas mediante algas

3.2.1 Sistemas abiertos

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 artificiales son canales de oxidación de poca profundidad, los cuales disponen de sistemas mecánicos de mezclado, y han demostrado gran eficacia en el tratamiento del agua residual contaminada.

Los sistemas abiertos pueden ser también lagunas o humedales artificiales al aire libre, separados del ambiente natural mediante adecuadas impermeabilizaciones de suelos y barreras de contención que eviten eventuales desbordes. Sus principales ventajas son el bajo coste de implantación y mantenimiento, y su valor paisajístico y biotópico, puesto que permiten convertir zonas degradadas en pequeños ecosistemas controlados. Sus principales inconvenientes son las grandes superficies de suelo que necesitan, el rendimiento variable de depuración en función de la estación del año y, en el caso de regiones geográficas muy secas, la enorme pérdida del agua por evapotranspiración, lo que conlleva un riesgo de que los nutrientes lleguen a concentrarse más rápidamente de lo que las plantas puedan metabolizar, dando origen a fenómenos de eutrofización, muerte de las plantas, agotamiento del O_2 y malos olores por la descomposición anaeróbica de la materia orgánica.

El efecto de la oscilación de la temperatura y la luz solar a lo largo del día y del año es importante en la productividad de las algas para la depuración de aguas, tanto en el sentido limitante como inhibitorio. El cultivo de algas en sistemas de lagunaje con iluminación natural puede presentar, por lo tanto, desventajas derivadas de dicha estacionalidad. Así mismo, otro posible problema es la presencia de zooplancton depredador del cultivo de algas, como protozoos, hongos e incluso virus.

Existen sistemas naturales de depuración abiertos de lagunas con macrófitas acuáticas sumergidas, como pueden ser las algas, así como sistemas de depuración abiertos artificiales mediante balsas de agua residual en las que se vierten las microalgas para la regeneración del agua. Independientemente de la especie de que se trate, las aguas no deben ser demasiado turbias, pues la eficiencia depurativa de las algas depende precisamente de que reciban mucho sol.

Los sistemas de lagunaje de alta carga (*HRAP*) se empezaron a desarrollar en la década de 1950. Son lagunas de unos 300 a 600 cm de profundidad que trabajan en el rango de 4–10 días de tiempo de retención hidráulico. . 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. Su poca profundidad favorece el crecimiento de las microalgas,

debido a la posibilidad de penetración de la luz en todo el volumen de agua. Han sido empleados para tratar efluentes de la digestión anaerobia de purines y de residuos de acuicultura (Olguín 2003).

Una vez completada la absorción de contaminantes por las algas, se vierte el agua ya depurada y limpia. Así mismo, la biomasa generada es filtrada para su posterior aprovechamiento.



Creative Commons Texas A&M AgriLife. <http://www.flickr.com/photos/agrilife/>

Principalmente, los sistemas de lagunaje de alta carga (HRAP) 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. Así mismo, 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 pesados.

3.2.2 Sistemas cerrados

Se trata de estructuras cerradas que contienen las plantas en su interior, constituyendo en cierto modo microecosistemas, con mecanismos de regulación más o menos complejos.

Los sistemas cerrados resultan más costosos, pero su eficiencia depurativa y de producción de biomasa es mayor, porque mantienen las condiciones de vida de las plantas dentro de un rango óptimo para las mismas.

El fotobiotratamiento es una tecnología de cultivo cerrado para la depuración de aguas residuales mediante microalgas, proceso que además permite operar durante la noche y obtener energía a través de la biomasa algal resultante. Los fotobiorreactores son estructuras de material transparente de variadas formas, con o sin fuentes de luz artificial, en las que se inyecta el agua residual a tratar y el aire puro o mezclado con gases de combustión. La metabolización de los nutrientes y del CO₂ es realizada por microalgas en suspensión.

Se caracterizan por alcanzar elevadas eficiencias depurativas con menor ocupación de suelo que los sistemas abiertos, sin perder agua por evapotranspiración, pero con un coste operativo algo mayor puesto que se requieren bombas para hacer circular el agua residual, sopladores para hacer burbujear el aire, y centrifugas o algún otro sistema para separar las microalgas del agua ya depurada.



Creative Commons Microphyt. <http://www.flickr.com/photos/microphyt/>

3.3 Principales especies de cultivo utilizadas en la depuración de aguas residuales

En la actualidad, existen diversos estudios publicados y experimentos realizados para calcular el rendimiento de la depuración de aguas residuales mediante distintas especies de microalgas, las tasas de remoción de contaminantes del agua y la consecuente producción de biomasa con alto valor como materia prima para la generación de biocombustibles u otros usos.

Una de las primeras descripciones del empleo de algas en el tratamiento de aguas residuales se remonta al año 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 mediante biofilms o en medios como alginato o quitosán (Abe y Takahashi 2008).

Se han desarrollado tanto monocultivos como cultivos de varias especies en aguas residuales artificiales y reales, de modo que estudios simultáneos sobre un extenso número de especies de microalgas han concluido que éstas son aptas para la eliminación de contaminantes en aguas residuales y que la eficacia del proceso es muy prometedora. Los resultados muestran porcentajes de eliminación que alcanzan el 100% en algunos casos, variando en función de las condiciones de operación, las especies empleadas y las características del agua residual. Otros estudios han trabajado con aguas de elevada carga orgánica, ya sea procedente de ganadería o de agricultura, concluyendo también 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.*, 2009). Estas especies pueden utilizar en su crecimiento diferentes compuestos de nitrógeno tales como amonio, nitrato o urea (Xin *et al.*, 2010).

Hay que destacar el potencial que presentan las microalgas no sólo en la eliminación de nutrientes de las aguas residuales sino también en la eliminación de metales pesados en dichas aguas.

En la Tabla 1 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</i> y <i>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 sp.</i>	Altos niveles de amonio en efluente de digestión anaerobia

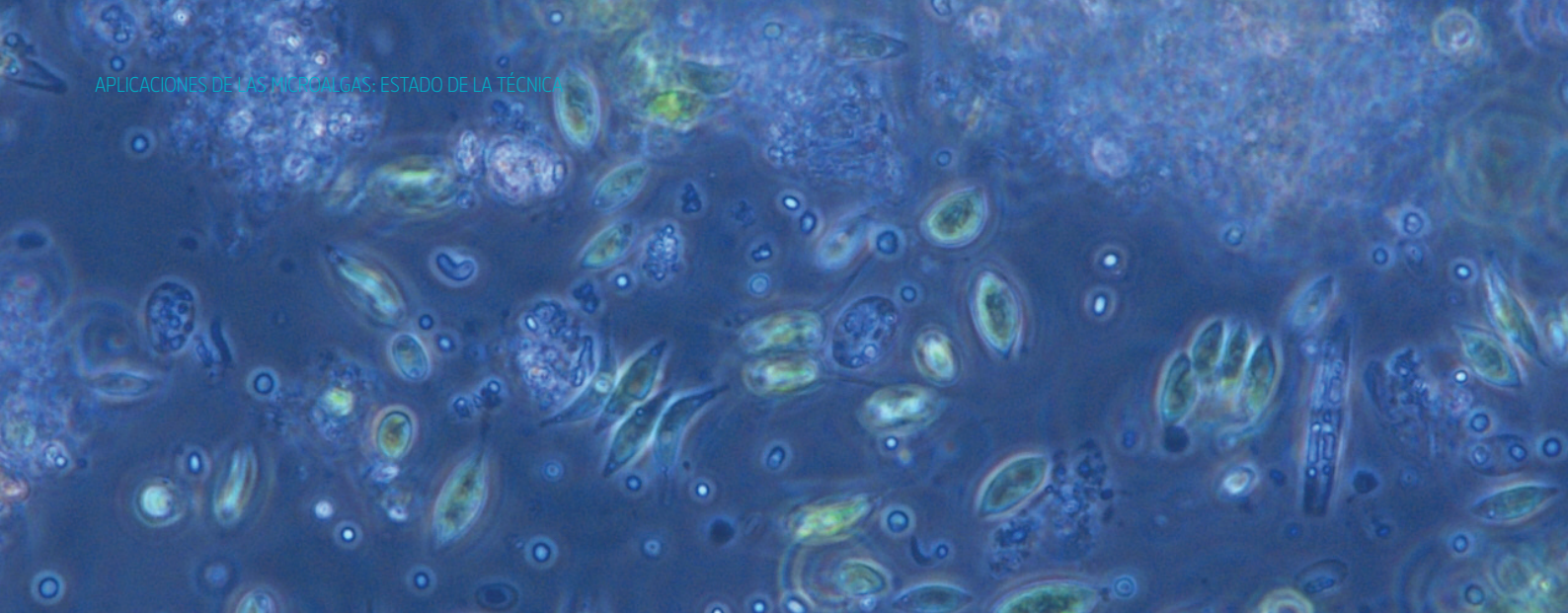
Tabla 1. Microalgas empleadas en la degradación de diversos contaminantes (Rawat 2010)

Entre las principales especies de cultivo estudiadas en la depuración de aguas residuales mediante microalgas podemos distinguir, en función del tipo de agua residual a tratar, las siguientes:

3.3.1 Microalgas para la depuración de aguas residuales urbanas

El principal potencial de las microalgas en la depuración de aguas residuales urbanas se fundamenta en su capacidad de asimilación, y por tanto, en la eliminación del medio de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. Por tal motivo, la mayoría de estudios se centran en el uso de las microalgas como tratamiento terciario de las aguas urbanas, 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 con elevada concentración en nutrientes. Estas especies son *Chlorella* (ej. *Chlorella stigmatophora*, *Chlorella vulgaris*, etc) y *Scenedesmus* (ej. *Scenedesmus obliquus*), y existe gran cantidad de estudios sobre ellas.



Fotografía de la microalga *Scenedesmus* sp.

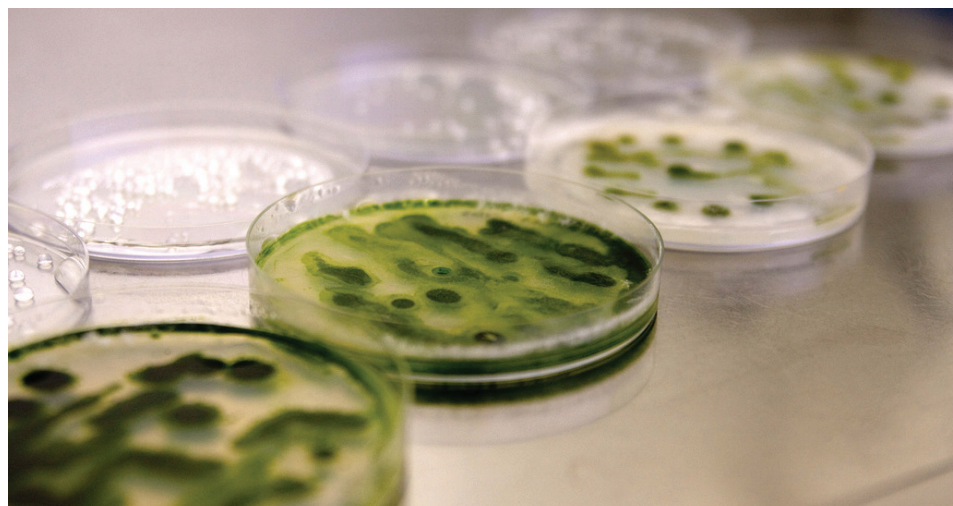
Wang y Min (2009) evaluaron el crecimiento de *Chlorella* en el agua residual urbana, en cuatro momentos distintos de su proceso de tratamiento: previa a la decantación primaria, tras la decantación primaria, después del tratamiento de fangos activos y el sobrenadante de la centrifuga de fangos. Su estudio aporta datos de velocidades específicas de crecimiento (desde 0,34 d⁻¹ tras fangos activos hasta 0,95 d⁻¹ para el sobrenadante) y de eliminación de nutrientes y DQO. Además se observa que las microalgas eliminan aluminio, calcio, hierro, magnesio y manganeso del sobrenadante de la centrifuga.

Así mismo, Wang y Lan (2011) estudiaron la producción de biomasa y la eliminación de nutrientes mediante el cultivo de *Neochloris oleoabundans* en un agua residual urbana, una vez finalizado el tratamiento secundario, obteniendo una concentración de biomasa de 2.100 mg/L, una producción de 233mg/L/d y una eliminación total de 218 mgN-NO₃/L y 47 mgPO₄/L.

En un estudio, Ruiz-Marín (2010) obtuvo un porcentaje de eliminación de amonio del 100% y del 60% en cultivos tipo batch de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

Posteriormente, 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 después de su tratamiento secundario mediante tres configuraciones diferentes (fangos activos, A2O y canales de oxidación).

- *Chlorella stigmatophora*
- *Chlorella vulgaris*
- *Scenedesmus obliquus*
- *Chlorella elipsoidea*
- *Neochloris oleoabundans*



Creative Commons Microphyt. <http://www.flickr.com/photos/microphyt/>

3.3.2 Microalgas para la depuración de aguas residuales industriales

En el caso de las aguas residuales industriales el principal interés no suele ser la eliminación de nutrientes sino la eliminación de metales pesados, tales como cadmio, cromo, zinc, etc., o compuestos tóxicos orgánicos (hidrocarburos, biocidas, tensioactivos) que pueden ser fijados por determinadas microalgas.

Las microalgas fotosintéticas 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. A su vez, las microalgas son capaces de segregar metabolitos que actúan como agentes quelantes de iones metálicos. Otro motivo por el cual las aguas industriales tratadas mediante microalgas presentan menor concentración de iones metálicos es la precipitación química debido al aumento de pH asociado a la fotosíntesis.

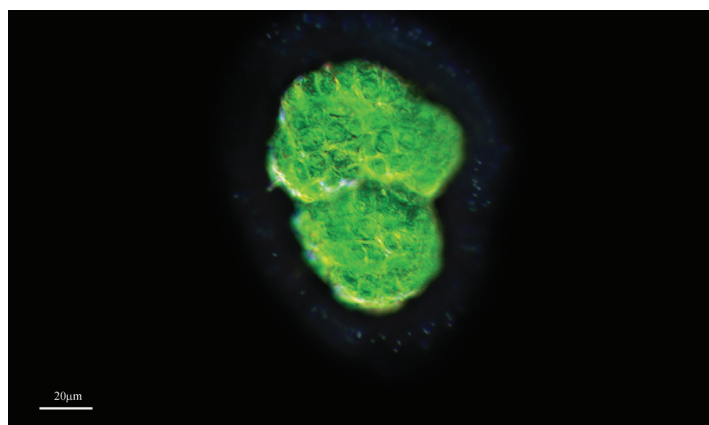
En un estudio llevado a cabo por Wang y Min (2009) queda patente que la capacidad de eliminar metales como hierro, aluminio, manganeso, magnesio y zinc de las microalgas es mayor que la de la biomasa bacteriana y fúngica, estudiándose cuatro tipos diferentes de agua residual, obteniéndose porcentajes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

Así mismo, las algas (ej. *Phormidium*, *Scenedesmus*, *Chlorella*) inmovilizadas en matrices sintéticas como acrilamida, poliuretano, resinas, espumas de polivinilo o en polímeros naturales como alginato, carragenato, agar, agarosa, así como en quitosano, son capaces de eliminar diversos metales pesados. La completa revisión de de-Bashan (2010) cita 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 los biocidas, hidrocarburos o surfactantes.

Debido a que en las aguas residuales industriales los nutrientes no se encuentran en altas concentraciones, el crecimiento de las algas es más lento y por tanto la cantidad de biomasa algal generada es menor.

Existe un estudio en agua residual de una industria de fabricación de alfombras, donde las microalgas *Chlorella saccharophila*, *Pleurochrysis carterae* y *Botryococcus braunii* son capaces de generar, sin embargo, una cantidad importante de biomasa, que podría ser empleada para usos energéticos (Chinnasamy 2010).

- *Chlorella saccharophila*
- *Pleurochrysis carterae*
- *Botryococcus braunii*



Creative Commons Proyecto Agua. <http://www.flickr.com/photos/microagua/>

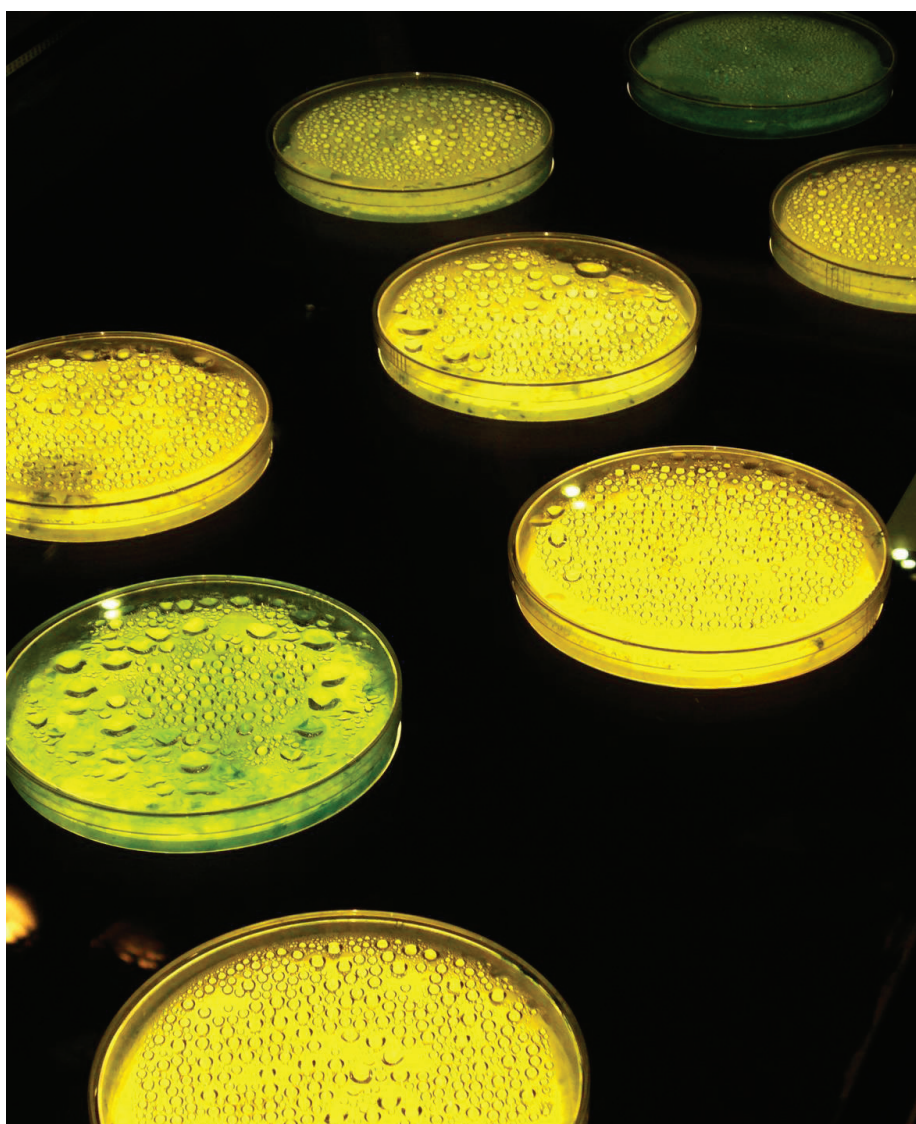
3.3.3. Microalgas para la depuración de aguas residuales de explotaciones ganaderas y agrícolas

Estas aguas se caracterizan por presentar concentraciones de nutrientes muy elevadas, y diversos estudios han demostrado la capacidad de determinadas especies de microalgas de eliminarlos del medio, como ejemplo *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 purines, demostrando la capacidad de dicha microalga de eliminar altos contenidos en nutrientes (5-6 mg NH₄⁺/L·d) y la importancia del aporte de carbono inorgánico en forma de alcalinidad del medio, ante la ausencia de inyección de CO₂.

Markou (2011) hace referencia a numerosos ejemplos de cultivo de cianobacterias para tratar residuos y aguas residuales de industrias de ganado porcino, vacuno y de aves.

- *Botryococcus braunii*
- *Microspora willeana*
- *Ulothrix sp.*
- *Rhizoclonium hierglypticum*



Creative Commons Roberto Venturini. <http://www.flickr.com/photos/robven/>

4. BIOFIJACIÓN DE CO₂

4.1 Efecto invernadero y cambio climático

El siglo XXI pasará a la historia como el siglo del cambio climático inducido por el hombre. Por primera vez en la historia de nuestro planeta la especie humana llega a ejercer una presión tal sobre la biosfera, que los efectos de la misma se pueden medir a escala mundial. El Mediterráneo en general, y España en particular, corren el riesgo de sufrir el avance progresivo de la desertificación, salinización y ulterior erosión de suelos. En este sentido, el principal agente precursor del efecto invernadero y, a su vez, del cambio climático global es el CO₂ de origen antrópico.

La Convención Marco de las Naciones Unidas (CMNUCC) fue adoptada en Nueva York el 9 de mayo de 1992 y entró en vigor el 21 de marzo de 1994. Su objetivo es reforzar la conciencia pública mundial sobre los problemas relacionados con el cambio climático, ya que existen claras evidencias de que el incremento de emisiones de gases de efecto invernadero debidas a actividades antropogénicas es la principal causa del aumento de la temperatura media en la nuestro planeta. Como consecuencia del aumento de la temperatura media global se están produciendo cambios en el clima terrestre, es lo que llamamos el cambio climático.

El Protocolo de Kioto se aplica a las emisiones de seis gases de efecto invernadero:

- Dióxido de carbono (CO₂).
- Metano (CH₄).
- Óxido nitroso (N₂O).
- Hidrofluorocarbonos (HFC).
- Perfluorocarbonos (PFC).
- Hexafluoruro de azufre (SF₆).

4.2 El dióxido de carbono (CO₂) y su ciclo

El dióxido de carbono (CO₂) es uno de los principales componentes de la atmósfera y juega un papel muy importante en el ciclo de las plantas, algas y cianobacterias ya que estas usan la energía lumínica del sol para fotosintetizar carbohidratos a partir del dióxido de carbono y expulsan oxígeno como consecuencia de la reacción. Durante la noche, cuando no hay luz solar, las plantas no pueden realizar la fotosíntesis y desprenden dióxido de carbono procedente de la respiración celular al igual que la mayor parte de los organismos de la Tierra, incluida la especie humana.

El ciclo del dióxido de carbono comprende a su vez dos subciclos, uno biológico (rápido) y otro geológico (lento).

En el ciclo biológico se produce el intercambio de CO₂ entre los seres vivos y la atmósfera. Produciéndose la fijación de CO₂ de la atmósfera a los vegetales a través de la fotosíntesis y la emisión de CO₂ a la atmósfera a través de la respiración animal y vegetal.

En el ciclo geológico se regula la transferencia de CO_2 entre el suelo, atmósfera y masas de agua (océanos, lagos, ríos...). El CO_2 atmosférico, se disuelve con facilidad en agua, formando ácido carbónico (H_2CO_3). Este ácido influye sobre los silicatos que forman las rocas y producen iones de bicarbonato. Los iones disueltos en el agua, son asimilados por los animales acuáticos para formar sus tejidos y una vez estos mueren se depositan en los sedimentos marinos. A través de las erupciones volcánicas, vuelve a la atmósfera al fusionarse en combustión las rocas con los restos de los seres vivos. Ocasionalmente, cuando la materia orgánica queda sepultada en anoxia, de forma que no hay oxígeno que produzca su descomposición aerobia y se produce la fermentación que lo transforma en carbón, petróleo o gas natural. Los grandes depósitos de piedra caliza en el fondo de los océanos así como en determinados depósitos en superficie son auténticos reservorios de CO_2 .

4.3 Efectos ambientales del CO_2

El CO_2 , en concentraciones adecuadas en nuestra atmósfera, es uno de los gases de efecto invernadero que contribuyen a que la Tierra tenga una temperatura habitable ya que impide la salida de calor de la atmósfera. Su concentración en la atmósfera se ha mantenido constante desde finales del Precámbrico hasta la Revolución Industrial, momento a partir del cual comienzan a detectarse subidas significativas en su concentración debido a la quema de combustibles fósiles. Paralelamente al aumento de CO_2 en la atmósfera se ha incrementado la temperatura global de la Tierra produciéndose en las últimas décadas un significativo calentamiento global.

Al mismo tiempo, este calentamiento global, genera el aumento de nivel del mar por tres factores principales:

1. Dilatación térmica. Los océanos han absorbido aproximadamente el 80% del calor adicional y el agua al calentarse, se dilata. Alrededor de la mitad del aumento del nivel del mar que se produjo a lo largo del siglo pasado es atribuible al hecho de que los océanos, al calentarse, ocupan un mayor espacio.
2. El deshielo de los glaciares y los casquetes polares: Las grandes formaciones de hielo se derriten parcialmente de forma natural en verano pero hasta ahora, en invierno, las precipitaciones en forma de nieve compuestas en su mayor parte por agua de mar evaporada, bastaban para compensar el deshielo. Sin embargo, las elevadas temperaturas persistentes causadas por el calentamiento global, hacen que la cantidad de hielo que se derrite en verano haya aumentado y que las nevadas hayan disminuido.
3. Pérdida de hielo en Groenlandia y en la Antártida Occidental. Igual que con los glaciares y los casquetes de hielo, el aumento del calor está provocando que las placas de hielo que recubren Groenlandia y la Antártida se derritan a un ritmo acelerado.

Cuando el nivel del mar se eleva con rapidez, tal y como ocurre en los últimos tiempos, incluso los pequeños aumentos pueden tener consecuencias devastadoras en los hábitats costeros. El agua de mar penetra en zonas cada vez más alejadas de la costa, lo cual puede generar consecuencias catastróficas como la erosión, las inundación de humedales, la contaminación de acuíferos y de suelo agrícola, y la pérdida del hábitat de peces, pájaros y plantas.

Al mismo tiempo, muchos asentamientos humanos se podrían ver afectados por las inundaciones costeras. La subida del nivel del mar les obligaría a abandonar sus hogares y a desplazarse a otras zonas. Las islas de poca altitud podrían quedar totalmente sumergidas.

El calentamiento global también está generando una pérdida significativa de la biodiversidad y la redistribución de hábitats de muchos organismos animales y vegetales.

4.4 El Protocolo de Kioto

El Protocolo de Kioto es el acuerdo firmado por los principales países industrializados y en vías de desarrollo, el 11 de diciembre de 1997, en el que se promueve el desarrollo sostenible. Los países firmantes, están obligados a cumplir los compromisos cuantificados de limitación y reducción de las emisiones, aplicando y elaborando políticas y medidas de conformidad con sus circunstancias nacionales.

Los países firmantes del Protocolo de Kioto se comprometen a la reducción de sus emisiones de gases efecto invernadero en un 5% respecto de sus emisiones en el año base (1990) durante el periodo comprendido entre los años 2005 y 2012.

En el Anexo B del Protocolo se recogen los compromisos de limitación de de gases de efecto invernadero, los cuales se muestran en la tabla 2.

Parte		Compromiso cuantificado de limitación o reducción de las emisiones <i>(% del nivel del año o periodo de base)</i>	
Alemania	92	Islandia	110
Australia	108	Italia	92
Austria	92	Japón	94
Bélgica	92	Letonia*	92
Bulgaria*	92	Liechtenstein	92
Canadá	94	Lituania*	92
Comunidad Europea	92	Luxemburgo	92
Croacia*	95	Mónaco	92
Dinamarca	92	Noruega	101
Eslovaquia*	92	Nueva Zelanda	100
Eslovenia*	92	Países Bajos	92
España	92	Polonia*	94
E.E. U.U.	93	Portugal	92
Estonia*	92	Reino Unido de G. Bretaña e Irlanda del Norte	92
Federación de Rusia*	100	República Checa*	92
Finlandia	92	Rumania*	92
Francia	92	Suecia	92
Grecia	92	Suiza	92
Hungría*	94	Ucrania*	100
Irlanda	92		
* Países que están en proceso de transición a una economía de mercado.			

Tabla 2. Compromisos de reducción de emisiones por los países firmantes del Protocolo de Kioto.
Fuente: Anexo B Protocolo de Kioto, 1998.

La Unión Europea debe reducir globalmente el 8% de sus emisiones sobre la base de 1990 y para conseguirlo, los países más desarrollados deberán limitar sus emisiones más allá del 8% y los menos desarrollados podrán incluso aumentarlas. Este acuerdo, se realiza con cuotas asimétricas para favorecer el crecimiento de los países menos desarrollados además de compensar su menor contribución histórica a la emisión de gases invernadero.

Para conseguir los objetivos de reducción, el Protocolo contempla tres tipos de mecanismos:

1. Comercio de Emisiones: Los países que emitan por debajo del límite impuesto por el Protocolo de Kioto pueden vender su excedente de “derechos de emisiones de CO₂” a aquellos países que lo excedan.
2. Implementación Conjunta. Consiste en la inversión de un país obligado al cumplimiento de Kioto en otro país también obligado al cumplimiento, en proyectos de reducción de emisiones o fijación de CO₂ involucrando cualquier sector de la economía.
3. Mecanismos de Desarrollo Limpio. Se realiza entre un país desarrollado que se encuentra obligado a reducir sus emisiones y otro en vías de desarrollo que no lo está. El país desarrollado invierte en tecnologías de desarrollo limpio que fijan o reducen las emisiones de CO₂ en el segundo.

La Convención Marco de las Naciones Unidas para el Cambio Climático insta a los diferentes países a la estabilización de la concentración atmosférica de los gases efecto invernadero, y establece que este objetivo se alcanzará cuando las emisiones de gases invernadero antropogénicas se equiparen con las que La Tierra puede absorber de forma natural.

Según el IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), las diferentes tecnologías para la reducción en las que se debe incidir son:

- Mejora de la eficiencia energética, en la conversión, transporte y uso final de la energía.
- Transición de tecnologías basadas en el carbón a tecnologías basadas en gas natural para la producción eléctrica.
- Aumento de las fuentes de energía de baja emisión: renovables y nuclear.
- Captura y secuestro de CO₂ para su almacenamiento en el subsuelo.
- Secuestro de CO₂ en sumideros naturales o biológicos por procesos fotosintéticos o de absorción del gas en el agua del mar.

Para alcanzar los objetivos de reducción de emisiones deben considerarse todas las opciones y aplicar la más adecuada en cada caso, debemos también tener en cuenta que las energías renovables no serán capaces de cubrir todas las necesidades de energía que se espera se necesite en los próximos años y que los contras de la energía nuclear (inseguridad, almacenamiento de residuos o incluso, amenazas terroristas) hacen que la decisión de considerarla no se base tanto en cuestiones técnicas sino en cuestiones de aceptación social. Por ello debe tenerse en cuenta que en los próximos años se seguirán consumiendo energías procedentes de combustibles fósiles.

España, como país signatario del Protocolo de Kioto, se comprometió a contener el volumen de emisiones de CO₂ en el periodo 2008-2012 en un +15% sobre los volúmenes de 1990. En el año 2008, las emisiones de CO₂ en la economía española excedían en un 20,9% estos límites.

Desde 2008 hasta la actualidad España se ve inmersa en una profunda crisis económica que estanca el crecimiento del PIB, al mismo tiempo que se llevan implementando desde 2005 toda una serie de políticas medioambientales y energéticas dirigidas a reducir las emisiones contaminantes.

A la finalización del plazo, España había cumplido con sus objetivos medioambientales a pesar de exceder en algo más de un 8% sus límites a través del uso de mecanismos de compensación establecidos por el propio Protocolo de Kioto.

España presenta una alta dependencia de consumo de productos petrolíferos lo cual implica un elevado volumen de emisiones al mismo tiempo que el sector eléctrico presenta una mejora de la eficiencia ambiental debida a la introducción de las energías renovables y la sustitución de fuentes energéticas como el carbón.

El 7 de diciembre de 2013, se celebró la Conferencia de las Naciones Unidas del Cambio Climático en Doha, allí, los 194 países reunidos, aprobaron una prórroga del compromiso de Kioto hasta 2020. Sin contar con Japón, Rusia, Canadá y Nueva Zelanda.

Si bien, el problema que se plantea es que los países que se han comprometido a reducir sus emisiones durante el segundo periodo de Kioto, con los de la Unión Europea, Australia y Noruega a la cabeza, generan poco más del 15% del total de emisiones contaminantes mundiales mientras que otros países, como Estados Unidos, que tiene un nivel mucho más elevado de emisiones nunca llegó a ratificar la primera parte del Protocolo de Kioto y tampoco se ha sumado a este segundo periodo.

En esta Conferencia, los países miembros de la UE respaldaron aplazar la subasta de 900 millones de permisos de emisiones de dióxido de carbono (CO₂) para tratar de limitar el exceso de oferta y forzar así una subida de precios ya que el sistema de comercio de derechos se diseñó para que el precio de la tonelada estuviera entre los 25 y los 30 euros, y las empresas tuvieran un incentivo para invertir en mejorar su tecnología. El cálculo de derechos que se iban a poner en el mercado se hizo antes de que llegara la crisis económica y, con ella, el exceso de oferta que ha llegado a situar el precio en 2,5 euros. En diciembre de 2013 se encontraba en torno a los 4,5 euros.

A día de hoy, el sistema de derechos de emisión tiene un exceso de 2.000 millones de permisos y cada permiso da derecho a emitir una tonelada de CO₂, este hecho ha desplomado los precios ya que resulta más barato contraminar y pagar que invertir en mejores técnicas para hacerse más limpias. Con la decisión tomada en la Conferencia por el Cambio Climático se pretende salvar el sistema de comercio de derechos de emisión a través del *backloading* (término con el que se conoce el retraso en la salida al mercado de estos permisos) provocando así un incremento de los precios de los derechos de emisión.

4.5 Rol de las microalgas en el control del cambio climático global

La fijación fotosintética del CO₂ atmosférico en plantas y árboles juega un papel fundamental para mantener equilibrio de este gas y de hecho, numerosos estudios apuntan a que la reforestación podría paliar parcialmente el problema del calentamiento global.

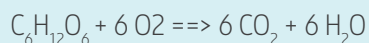
Al mismo tiempo, encontramos organismos fotosintéticos como macroalgas y microalgas que también fijan el CO₂ en forma de biomasa y lo retienen en su interior. Numerosos estudios se han centrado en el secuestro del CO₂ por parte de las algas, debido al efecto invernadero del gas y al hecho de que las microalgas y cianobacterias pueden fijar CO₂ con una eficiencia entre 10 y 50 veces mejor que las plantas terrestres.

De todos estos organismos, las microalgas son las más adecuadas para la fijación del CO₂ en gases de combustión porque son los únicos organismos capaces de adaptarse a ambientes cambiantes de condiciones climáticas (temperatura, ph, salinidad...) pudiendo incluso soportar condiciones extremas y de utilizar altas concentraciones de CO₂, que a diferencia de los cultivos vegetales o de los árboles éstas mejoran su productividad con el aumento de la concentración de CO₂ por encima de la concentración atmosférica (hasta cierto límite).

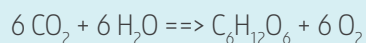
Por otro lado, las características físicas de las microalgas y su elevada proporción superficie/volumen ayuda a la rápida difusión de nutrientes y CO₂ de forma que se hace más fácil los cultivos de alta densidad y la rápida fijación, por lo que su potencial de productividad es mucho mayor que los de las plantas superiores y otras plantas acuáticas. Además, sus requerimientos de nutrientes son tan elevados que permite su cultivo en aguas residuales, produciéndose también la fijación del nitrógeno y el fósforo y disminuyendo la concentración de estos compuestos en las aguas.

Por todo ello, las microalgas se revelan como un elemento amortiguador de la acumulación del CO₂ atmosférico ya que son los principales productores primarios de los ecosistemas acuáticos, produciendo alrededor del 50% de la fotosíntesis total.

El equilibrio entre respiración-oxidación:

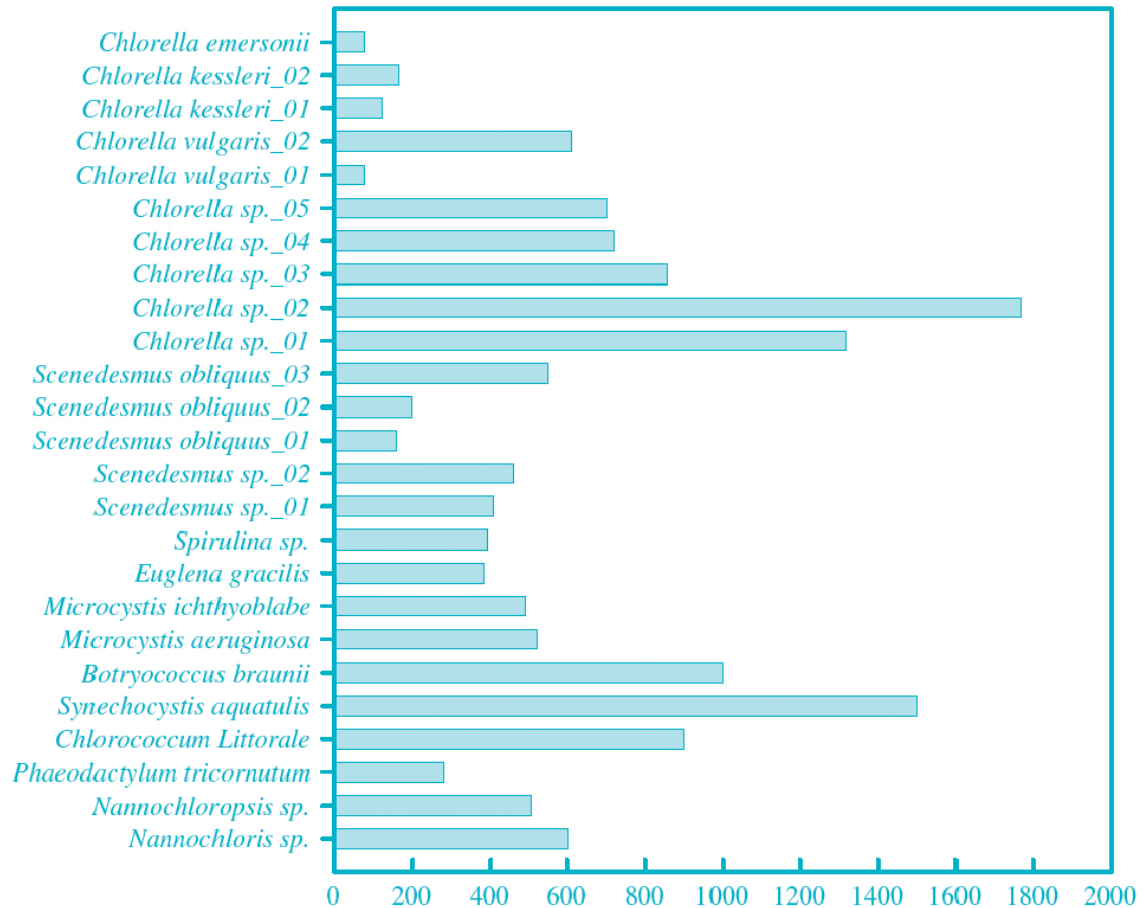


Y la fotosíntesis:



Marca la pauta del CO₂ y, consecuentemente del cambio climático.

El consumo normal de dióxido de carbono de las microalgas se sitúa entre 200 y 600 mg CO₂/L-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 CO₂ alcanzados por ciertas microalgas.



Consumo de dióxido de carbono (mg/L-d) por varias especies de microalgas (Ho et al 2011). Fuente: Ruiz A., 2011, Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.

El consumo de CO₂ por parte de las especies de microalgas citadas en la figura viene determinado no sólo por la especie sino también por otros parámetros como la concentración de CO₂ disponible, la configuración del reactor, el medio de cultivo, la temperatura o la intensidad de la luz. Por lo tanto, la figura no representa 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 CO₂ industrial.

El CO₂ sólo es consumido durante el día ya que las algas por la noche como cualquier organismo aeróbico producen CO₂ mediante la respiración.

Otros factores que influyen en el crecimiento de las microalgas son la luz, la temperatura y los nutrientes que estas tienen disponibles.

Las microalgas requieren de la luz solar para realizar la fotosíntesis y para su crecimiento. Las microalgas absorben la luz y por tanto, a mayor concentración de ellas, menos luz podrá penetrar en el cultivo. Por esta razón, los sistemas de cultivo de las microalgas son poco profundos y se optimizan en la captura de luz. Por la noche o en condiciones de oscuridad, la fotosíntesis no puede realizarse, por lo que las algas consumen la energía almacenada para la respiración. Dependiendo de la temperatura y de otras condiciones, por la noche se puede llegar a perder hasta un 25% de la biomasa producida durante el día (CHISTI, 2007). Aparte de CO₂ y luz, las microalgas necesitan aportes nutricionales para crecer, sobre todo de nitrógeno y fósforo.

Para la productividad estimada de 100 t biomasa/ha/año se predice una fijación de 165 t CO₂/ha/año, sin tener en cuenta el dióxido de carbono derivado del gasto energético en su producción, en la transformación a biocombustible y en el que se producirá al consumir el biocombustible. Si se utiliza el sistema combinado de producción de microalgas con el tratamiento de aguas residuales, inyectando CO₂ de gases de combustión, y la biomasa resultante se destina a la producción de biocombustibles y fertilizantes (a partir del residuo de la producción de biocombustibles), la reducción neta de CO₂ se estima de una tonelada por tonelada de biomasa (*Harmelen y Oonk, 2006*). En este caso el balance de CO₂ es realmente negativo gracias al ahorro de energía derivado del tratamiento más eficaz de las aguas residuales cuando se utilizan microalgas y en la producción de fertilizantes químicos que son sustituidos por biofertilizantes.

4.6 Estado del arte de la biofijación de CO₂ con microalgas: pasado, presente y futuro

Los cultivos de microalgas como fuente de combustibles renovables para reducir el efecto invernadero del calentamiento global han sido propuestos desde hace ya más de sesenta años. La idea de utilizar los gases de combustión, fundamentalmente de las centrales térmicas, para la producción de microalgas y conversión final de la biomasa a biocombustible surgió por primera vez en el año 1955, durante el encuentro de la *Solar Energy Society*, (Arizona, USA), inspirada en los estudios de Oswald (*Oswald, et al., 1957*) sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas mediante microalgas.

Después de la crisis energética del año 1973, el aprovechamiento de los gases de combustión con microalgas cobró especial interés, como una alternativa de energía, financiándose diversos programas de investigación con microalgas para su conversión en biocombustibles como biogás y biodiesel, especialmente en EEUU a través del Departamento de Energía de los Estados Unidos de América (DOE). El principal avance fue la aplicación de los sistemas propuestos por Oswald en reactores tipo *raceway* con agitación de paletas, alcanzándose una productividad de 60 t/ha/año.

Durante los años 80 se intensificaron los esfuerzos en la investigación de fijación de CO₂ con microalgas. Los principales proyectos se llevaron a cabo en EEUU y Japón. El programa "Aquatic Species Program" (ASP), del *National Renewable Energy Laboratory* de EEUU, demostró que los fotobioreactores exteriores son factibles para la utilización eficiente del CO₂ procedente de gases de combustión, dando lugar por un lado a altas productividades y por otro lado, al aislamiento de especies de microalgas adecuadas para la fijación de CO₂ en cultivos masivos y el aislamiento de aquellas especies con alto contenido en lípidos orientadas a la producción de biodiesel. Dicho programa también introducía la necesidad de modificación genética de las microalgas para conseguir los objetivos propuestos a un menor coste, como por ejemplo minimizar la fotoinhibición, lograr mayor contenido en lípidos, facilitar el cosechado, etc., (*Benemann, 1992*).

Los estudios llevados a cabo por los programas japoneses por el *Research Institute of Innovative Technology for the Earth* y Mitsubishi Heavy Industries Ltd., demostraron que las especies de microalgas *Nannochloris* y *Nannochloropsis* no solo crecían bien en altas concentraciones de CO₂, sino también cuando se inyectaban en el cultivo los gases reales de combustión, conteniendo además SO₂ y NO_x (*Negoro et al., 1991*) y metales pesados como Ni y V (*Negoro et al., 1992*). Así, *Negoro et al.* (1992) realizaron diversas experiencias a pequeña y media escala sobre el uso real de gases de combustión como fuente carbonada para la producción de microalgas,

inyectando directamente el gas de combustión en reactores abiertos de 0.10-0.20 m de profundidad donde el CO₂ era fijado por microalgas como *Nannochloropsis sp.* y *Phaeodactylum sp.* En el año 1995, Michiki logró grandes avances en fotobioreactores con colectores solares e iluminación interior a través de fibra óptica (Michiki, 1995). Así mismo, en Japón se llevó a cabo también el proyecto “Research Innovative Technologies of the Earth” (RITE) sobre la biofijación de CO₂ con microalgas (Usui y Ikenouchi, 1996, Ikuta *et al.*, 2000).

Actualmente se siguen impulsando proyectos dirigidos a utilizar microalgas para la eliminación del CO₂ de los gases de combustión debido a los problemas ambientales y económicos que augura el cambio climático y la prevista escasez de petróleo, aunque actualmente la atención se centra en maximizar la velocidad de fijación de CO₂ mediante la selección de genotipos adecuados y la modificación genética así como la optimización de los sistemas de cultivo, ya que las microalgas tienen el potencial de fijar grandes cantidades de CO₂ en su biomasa y ésta de ser transformada a biocombustibles. Puesto que existe este gran potencial y que la lucha contra el cambio climático requiere la coordinación de diversas tecnologías, la Agencia Internacional de la Energía, mediante su programa de I+D para la mitigación de los gases de efecto invernadero, el *IEA greenhouse Gas R&D Programme*, ha creado la Red Internacional de investigación para la biofijación de CO₂ con microalgas. Esta red supone el mayor esfuerzo coordinado que se está llevando a cabo en la actualidad sobre la lucha contra el efecto invernadero mediante el uso de microalgas, estimándose una productividad de las microalgas alrededor de las 100 toneladas de biomasa/ha/año en cultivo en raceways de poca profundidad y un alto rendimiento en la producción de biodiesel y otros biocombustibles. No obstante, estas previsiones aún deben ser demostradas en la práctica, lo que requerirá considerables esfuerzos de I+D+i.

En cuanto a Europa, actualmente también se están financiando proyectos de investigación tales como el “Aquafuels” o el “Enerbioalgae”. El proyecto “Aquafuels” recoge informes de las diversas iniciativas europeas llevadas a cabo en materia de producción de biocombustibles de algas considerando el ciclo de vida completo (2010). El proyecto “Enerbioalgae” pretende el aprovechamiento conjunto de la depuración de aguas residuales mediante microalgas junto con la depuración de gases de combustión.

Ya que la biofijación con microalgas puede actuar como sumidero real de CO₂, esta tecnología es particularmente adecuada en un futuro para la promoción de Mecanismos de Desarrollo Limpio en países en vías de desarrollo, donde las condiciones climáticas (radiación solar, disponibilidad de aguas saladas, etc) suelen ser favorables. Además, el tratamiento de aguas residuales junto a la producción de microalgas es un proceso tecnológicamente simple, que aportaría beneficios ambientales directos sobre la zona e ingresos por la venta de biocombustible y aplicación de biofertilizante en su agricultura local, ayudando al desarrollo de la zona y a mejorar sus condiciones de vida.

Si comparamos la biofijación de CO₂ mediante microalgas con otras tecnologías existentes de reducción de gases de efecto invernadero, la fijación con microalgas destinadas a la producción de biocombustibles es mucho más competitiva dado el aumento progresivo de los precios de la energía, al no depender sus gastos de una fuente fósil y al aumentar su beneficio por la venta del biocombustible residual (Harmelen y Oonk, 2006). El empleo de reactores más eficaces permite aumentar dicho valor.

5. PRODUCCIÓN DE BIOCARBURANTES A PARTIR DE MICROALGAS

5.1 Consideraciones generales

Una de las principales preocupaciones actuales a nivel mundial es la búsqueda de fuentes de energía alternativas o complementarias al petróleo, dada la previsión de agotamiento de las reservas del planeta y los problemas derivados de su uso, como emisiones de efecto invernadero, subida de los precios, inestabilidad de los mercados por dependencia energética de países productores, etc.

Por tal motivo, el desarrollo de las fuentes renovables de energía es uno de los aspectos claves de la política energética nacional, puesto que:

- Contribuyen a la reducción de los impactos que genera sobre el medio ambiente las emisiones de CO₂,
- Menor dependencia de los productos derivados del petróleo ,
- Aumentan la diversificación de las fuentes energéticas.
- La Directiva 2003/30/CE sobre fomento del uso de biocarburantes fija como valores de referencia para el establecimiento de objetivos indicativos nacionales una proporción mínima de biocarburantes y de otros combustibles renovables del 5,75% del consumo de gasolina y gasoil.

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, otras posibilidades de aprovechamiento energético de las microalgas, similares a las de aprovechamiento de otros tipos de biomasa existentes actualmente (residuo forestal, residuo orgánico urbano, etc.): mediante conversión termoquímica, química o bioquímica.

El biodiesel es un combustible líquido que se obtiene a partir de lípidos mediante procesos de esterificación y transesterificación. Estos lípidos provienen bien de grasas animales o bien de aceites de diversos cultivos, como los de soja (en la actualidad la materia prima más empleada), colza, maíz, girasol, palma, remolacha, etc. El principal problema de dichas materias primas vegetales es la necesidad de grandes extensiones de terreno para su cultivo y, por tanto, su competencia con los 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 a producir elevadas cantidades de lípidos o ácidos grasos, que pueden ser posteriormente empleados para la producción de biodiesel, manipulando las características físico-químicas del medio de cultivo. Estas manipulaciones pueden ser simples, como por ejemplo variando la salinidad del medio, la temperatura, el pH o la 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, generalmente las microalgas con alto contenido lipídico no presentan altas velocidades de crecimiento, por lo que se busca es optimizar 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 compete en el mercado de productos de alimentación: la superficie necesaria para su cultivo es mucho menor, por ejemplo, empleando aceite de colza se producen alrededor de 1.190 L biodiesel/ha de cultivo, mientras que en el caso de las algas se pueden obtener hasta 12.000 L/ha;
- Alto grado de aceite, que puede llegar a 70% de su peso seco;
- Su cultivo puede ser realizado en condiciones no adecuadas para la producción de cultivos convencionales, como en suelos degradados, en regiones desérticas, etc, y el CO₂ necesario para la producción puede ser procedente de gases de combustión de efluentes industriales;
- No hay régimen de cosecha, es decir, la producción se realiza durante todo el año, lo que lleva a un potencial de producción por área al año mucho más alto que el de cultivos convencionales;
- El consumo de agua es menor comparado al cultivo de plantas terrestres;
- 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. Algunas especies llegan incluso a doblar su biomasa en 3,5h en la fase de crecimiento exponencial;
- Su cultivo no requiere aplicación de fitosanitarios como herbicidas o pesticidas;
- Los nutrientes necesarios para su cultivo (especialmente el nitrógeno y el fósforo) pueden ser obtenidos de aguas residuales;
- Las algas presentan además mayor eficiencia fotosintética que los vegetales superiores y pueden ser cultivadas en medio salino simple (incluso en agua salobre) además de ser eficientes fijadoras de CO₂ (1kg en peso seco de biomasa de algas utiliza cerca de 1,83 kg de CO₂).

En cuanto a los problemas técnicos de la obtención de biodiesel a partir de microalgas, estos se centran principalmente 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 tanto del alto precio de la tecnología necesaria, así como del hecho que compiten con precios de carburantes relativamente bajos.

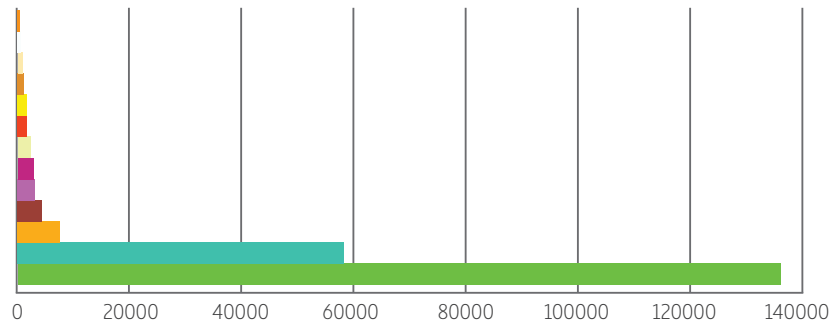
5.2 Microalgas como fuente de biodiesel

En las últimas décadas se ha demostrado que las microalgas suponen una alternativa más conveniente que cualquier otro tipo de organismo para la producción de triacilglicéridos y su conversión a biodiesel, ya que algunas especies oleaginosas, siendo organismos fotosintéticos, sólo requieren energía solar, agua, CO_2 y algunas sales para producir rendimientos muy altos de biomasa rica en lípidos (Li *et al.* 2008a). De hecho, son los organismos fotosintéticos más eficientes, puesto que absorben más CO_2 y liberan más O_2 que cualquier otra planta, crecen extremadamente rápido y llegan a acumular grandes cantidades de diversos productos. Algunas microalgas doblan su biomasa en 24 h y el tiempo de duplicación de biomasa durante la fase exponencial puede ser tan corto como 3.5 h (Chisti, 2007).

Más específicamente, los beneficios que se obtienen al usar microalgas para la producción de biodiesel son:

- a. Las microalgas oleaginosas tienen un rendimiento de aceite mucho mayor que cualquier cultivo convencional, siendo éste de 10 a 20 veces mayor que el derivado del aceite de palma y de 200 a 400 veces mayor que el derivado del aceite de soja.
- b. Sólo el biodiesel producido a partir de microalgas tiene una verdadera huella ecológica pequeña, dado que requiere una superficie de 1-2 órdenes de magnitud menores en comparación a los cultivos convencionales o los árboles. Según Chisti (2007) requiere de 1.5 a 3.2 millones de hectáreas para satisfacer el 50% de las demandas de energéticos de transporte en U.S.A. En contraposición, la soja, actual principal fuente de biodiesel en U.S.A. requiere de 330 a 450 millones de hectáreas para la misma finalidad. En México, se ha estimado que sólo se requiere el 1% de la superficie total del país, para cubrir el 100% de la demanda actual de diesel de petróleo (Garibay *et al.*, 2009).
- c. Con el biodiesel extraído de microalgas cultivadas en lagunas o estanques abiertos sólo se requieren 200.000 hectáreas para producir 1 cuadrillón de BTU (Sheehan *et al.*, 1998). Por contra, se requieren aproximadamente 40 millones de hectáreas si se utiliza etanol derivado de maíz o 20 millones de hectáreas si se utiliza biodiesel derivado de la soja.
- d. Las microalgas oleaginosas pueden ser cultivadas tanto en agua de mar como en agua salobre, disminuyendo así la presión sobre el agua dulce requerida para la producción de alimentos. Algunas especies de microalgas aisladas de agua dulce pueden crecer también en aguas residuales, eliminando así la competencia por el uso de agua para la agricultura.
- e. Las microalgas son excelentes fijadoras de CO_2 . Por cada 100 ton de microalgas producidas, se consumen 183 ton de CO_2 (Chisti, 2007).
- f. Respecto a la emisión de gases invernadero, es de los pocos bionergéticos con un valor negativo, ya que no se produce CO_2 durante el ciclo de vida de producción y el valor de este parámetro para microalgas (-183 kg CO_2 /MJ) es el más negativo respecto a los otros bionergéticos con valores negativos como el etanol a partir de pastos o de residuos celulósicos. Por el contrario, el diesel producido a partir de fuentes fósiles emite 83 kg CO_2 /MJ y el etanol a partir de maíz produce 81-85 kg CO_2 /MJ (Chisti, 2007).

Productividad de aceite



	Productividad de aceite L/ha
Maíz	172
Algodón	325
Soja	446
Mostaza	572
Grasa amarilla	907
Girasol	952
Cacahuete	1059
Canola	1190
Jatrofa	1892
Coco	2689
Palma de aceite	5950
Microalgas (1)	58700
Microalgas (2)	136900

Productividad de aceite de las microalgas en comparación con los cultivos convencionales (Gao et al. 2009, Schenk et al. 2008, Christi 2007).

(1) 30% de aceite en biomasa (con base a peso seco)

(2) 70% de aceite en biomasa (con base a peso seco)

5.3 Retos y oportunidades en la producción de biodiesel con microalgas

Según Loera-Quezada y Ollguín (2010), los parámetros claves que afectan a la factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas son fundamentalmente la productividad de la biomasa microalgal, el contenido celular de lípidos y sobre todo, la productividad de lípidos, principalmente triacilglicéridos. Este último parámetro determina el coste del proceso de cultivo, mientras que la densidad de la biomasa en el cultivo y el contenido celular de los lípidos afectan significativamente al coste de los procesos de extracción de lípidos y de transformación en biodiesel.

Por lo tanto, un proceso ideal debería permitir la producción de lípidos a la más alta productividad celular, con el contenido más alto posible en las células (Li *et al.*, 2008b). Sin embargo esta situación ideal es muy difícil de encontrar en la realidad, ya que las células con alto contenido de lípidos son producidas bajo condiciones de estrés fisiológico, el cual está asociado a condiciones limitantes de nutrientes y por lo tanto, asociados a una baja productividad de biomasa y de lípidos. Por tal motivo, los mayores retos en el desarrollo de procesos para la producción de biodiesel a partir de microalgas consisten en:

- a. Seleccionar las mejores cepas de microalgas, en términos de máximo contenido de lípidos y máxima productividad, mejor perfil de lípidos y adaptabilidad al tipo de agua a utilizar y a las condiciones ambientales;
- b. Establecer estrategias de cultivo adecuadas que permitan lograr la máxima productividad de lípidos y de biomasa algal;
- c. Lograr el uso de aguas residuales, evitando contaminaciones y niveles de concentración tóxicos;
- d. Seleccionar el tipo de reactor más adecuado o una combinación de reactores, que permitan una máxima producción de biomasa al mínimo coste;
- e. Lograr minimizar o eliminar los costes de recolección, y
- f. Lograr una extracción de lípidos y su posterior conversión a biodiesel, mediante estrategias de mínimo coste.

5.3.1 Selección de la especie de microalgas con mejores atributos

La elección de la especie de microalga oleaginosa para la producción de biodiesel es el primer paso para el desarrollo de un proceso de producción, ya que el éxito depende principalmente de ello.

La especie debe tener las características adecuadas para unas condiciones de cultivo específicas que permitan obtener los productos particulares requeridos. Para el cultivo de microalgas a gran escala, las principales características deseables son un crecimiento rápido, un alto contenido de productos de alto valor agregado, células grandes en colonias o filamentos, un desarrollo en ambientes extremos con gran tolerancia a condiciones ambientales, tolerancia a niveles altos de CO₂ (15% o más), a contaminantes y al efecto físico de la agitación o turbulencia. Además, no debe excretar autoinhibidores (Griffiths y Harrison, 2009).

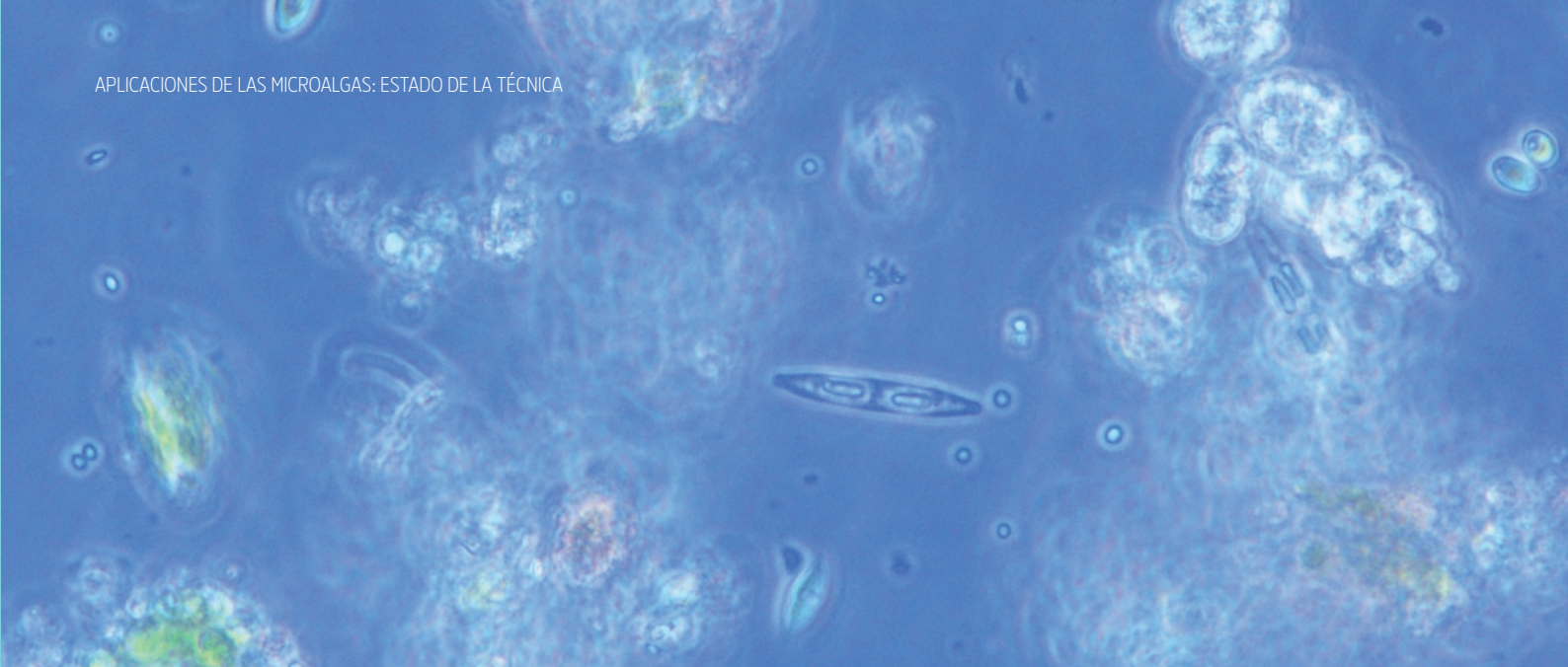
Numerosas listas de cepas de origen marino o dulceacuícolas que muestran un alto contenido de lípidos (Chisti, 2007) han sido descritas, y existen diversos estudios con especies del género *Chlorella* (Liu *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2008), con especies de *Dunaliella* (Takagi *et al.*, 2006), de *Nannochloris* (Takagi *et al.*, 2000) y con *Botryococcus braunii* (Li y Qin, 2005). Las especies *Nannochloris* y *Dunaliella* son especies marinas que presentan buenas ventajas para ser cultivadas en zonas costeras.

La tabla 3 muestra las diferencias del contenido de aceite en algunas especies de microalgas.

Especies de microalgas	Contenido de lípidos (% en peso seco)	Productividad en lípidos (mg/L/día)
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0–75.0	–
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6–16.4/39.8	17.6
<i>Chlorella sp.</i>	5.0–63.0	10.3–50.0
<i>Chlorococcum sp.</i>	19.3	53.7
<i>Dunaliella SP</i>	6.0–71.0	33.5 - 116.0
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27.4	47.3
<i>Isochrysis sp.</i>	7.0–40.0	37.8
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0	30.4
<i>Nannochloris sp.</i>	20.0–56.0	60.9–76.5
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12.0–53.0	37.6–142.0
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0–65.0	90.0–134.0
<i>Nitzschia sp.</i>	16.0–47.0	8.8–21.6
<i>Pavlova sp.</i>	30.9 – 35.5	40.2 - 49.4
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0–57.0	44.8
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0–18.8/60.7	34.8
<i>Scenedesmus sp.</i>	1.9–21.1	35.1 – 53.9
<i>Skeletonema sp.</i>	13.3–51.3	17.4 - 27.3
<i>Thalassiosira psudonana</i>	20.6	17.4
<i>Tetraselmis sp.</i>	8.5–23.0	27.0–43.3

Tabla 3 Contenido de aceite de algunas especies de microalgas.

Fuente: Mata *et al.*, 2009

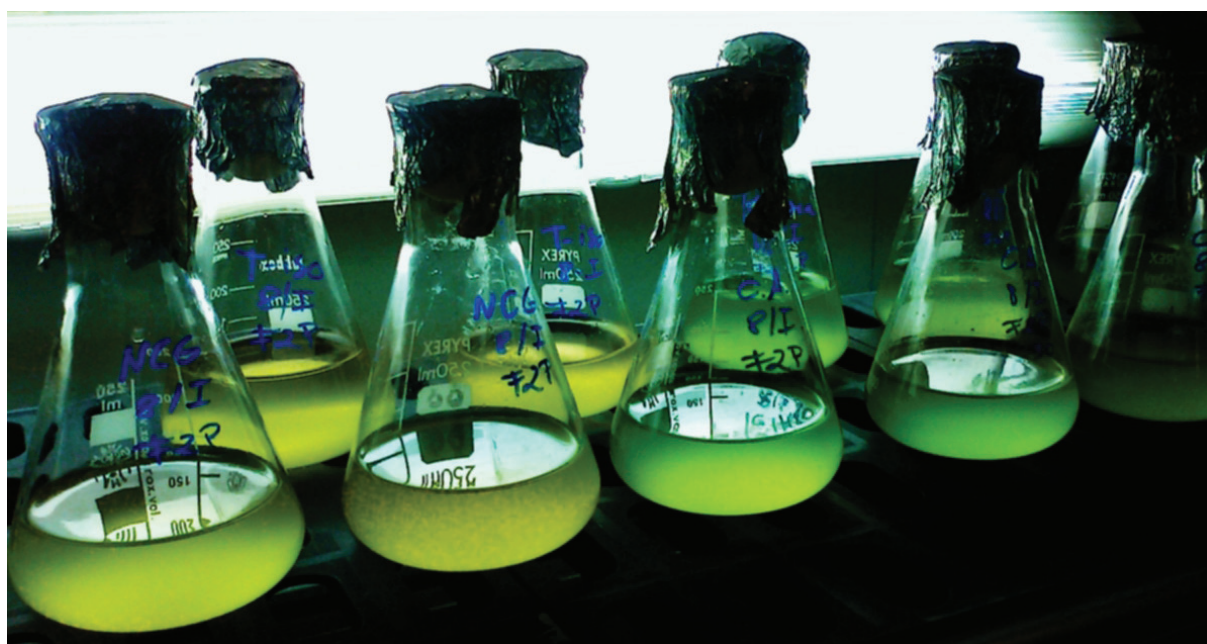


Fotografía de la especie *Nitzschia sp.* empleada en la producción de biodiesel.

En el año 2009, Rodolfi *et al.* investigaron 30 especies de microalgas para seleccionar aquellas con alta productividad en biomasa y alto contenido de lípidos, encontrando que *Nannochloropsis sp.*, es particularmente adecuada para la producción de aceite.

Gouveia y Oliveira (2009), investigaron 6 especies de microalgas tanto marinas como dulceacuícolas para elegir en términos de cantidad y calidad de aceite la mejor materia prima para la producción de biocombustibles. *Neochloris oleoabundans* (dulceacuícola) y *Nannochloropsis sp.* (marina) fueron las que mostraron mayor contenido de lípidos (29 y 28,7%, respectivamente), por lo que resultan adecuadas para tal fin.

En los últimos años, la investigación se centra fundamentalmente en generar cepas mejoradas genéticamente para la producción de lípidos. Aunque la aplicación de la ingeniería genética para tal fin se encuentra en etapas muy tempranas, ya se han desarrollado herramientas de manipulación genética en ciertos sistemas modelo para manipular el metabolismo central del carbono en estos organismos (Radakovits *et al.*, 2010).



5.3.2 Inducción del aumento de la productividad de lípidos

Las microalgas sintetizan ácidos grasos, que varían dependiendo de la especie, como precursores para la síntesis de varios tipos de lípidos. Sin embargo, sólo los lípidos neutrales son adecuados para la producción de biodiesel y dentro de éstos, los triacilglicéridos.

El contenido total de los lípidos en las microalgas puede variar, dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo, desde el 1% hasta el 90% del peso seco (Spolaore *et al.*, 2006; Chisti, 2007). Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés debidas a estímulos ambientales químicos y físicos, ocurre la síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, junto con alteraciones importantes en la composición de los lípidos y ácidos grasos. Los principales estímulos químicos a aplicar son la deficiencia de nutrientes, la salinidad y el pH del medio de cultivo, siendo la deficiencia de nitrógeno, con respecto a los nutrientes, el factor que más afecta el metabolismo de los lípidos (De *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008c; Hu *et al.*, 2008; Mendoza *et al.*, 2008; Solovchenko *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). Los principales estímulos físicos son la temperatura y la intensidad lumínica. Además de estos factores, la fase de crecimiento y la edad del cultivo también afectan al contenido y composición de los ácidos grasos, observándose un mayor contenido de lípidos en la fase estacionaria con respecto a la fase logarítmica (Spolaore *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008).

En estudios realizados con microalgas verdes, se observó que en el género *Dunaliella* su principal lípido de reserva son los triglicéridos y que bajo condiciones de limitación de nitrógeno y con un 1% de CO₂, éstos aumentaron del 1% al 22% respecto a los lípidos totales (Gordillo *et al.*, 1998). Además, la especie *Neochloris oleoabundans* puede acumular hasta el 80% de sus lípidos totales en forma de triglicéridos (Tornabene *et al.*, 1983), lo cual la sitúa como una de las especies con mayor potencial para la producción de biodiesel.

No obstante, se han realizado muy pocos estudios sobre la inducción de lípidos por limitaciones de nutrientes con reactores a escala piloto en condiciones exteriores.

En lo referente a la temperatura, se ha observado en muchas algas y cianobacterias que la insaturación de los ácidos grasos se incrementa cuando desciende la temperatura y viceversa, al aumentar la temperatura aumenta también la saturación de los ácidos grasos.

Así mismo, se ha comprobado que la intensidad lumínica influye notablemente en la composición química en general, en el contenido de pigmentos y en la actividad fotosintética de las microalgas. Normalmente, una intensidad lumínica baja induce la formación de lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos), los cuales están funcional y estructuralmente asociados a las membranas celulares de las microalgas (Hu *et al.*, 2008).

5.3.3 Selección del tipo de reactor más adecuado para el cultivo de microalgas oleaginosas

La producción de microalgas oleaginosas con el objeto de obtener biodiesel se puede realizar tanto en reactores cerrados (fotobioreactores) o en reactores abiertos (raceways o Lagunas Abiertas y Lagunas de Oxidación de Alta Tasa), descritos en el apartado 2.2. de la presente guía.

Los sistemas abiertos tienen un bajo coste de construcción, de operación y de producción. Sin embargo, presentan numerosas desventajas, ya que requieren de grandes áreas de superficie, sufren importantes pérdidas de agua por evaporación y de CO₂ por difusión a la atmósfera, el sistema de mezclado es deficiente lo que origina una baja concentración celular, lo que a su vez origina una baja productividad de biomasa algal. Además son propensos a la contaminación con otras algas y/o por organismos que se alimentan de microalgas; presentan una costosa recuperación del producto en los medios diluidos y una dificultad para el control de parámetros como la temperatura y el pH. Estos inconvenientes de los sistemas abiertos estimularon el desarrollo de diversos tipos de fotobioreactores (sistemas cerrados) que permiten un control más preciso de las condiciones de cultivo, (Chisti, 2007; Wogan *et al.*, 2008; Ugwu *et al.*, 2008), el cultivo de una sola especie por tiempos prolongados sin contaminación y la obtención de una alta productividad de biomasa algal (Molina-Grima *et al.*, 1999; Ugwu *et al.*, 2008).

Por otro lado, es importante mencionar que existen numerosos estudios sobre el uso de fotobioreactores para la producción de microalgas oleaginosas, aunque la mayoría son experiencias a nivel laboratorio y muy pocas a nivel de planta piloto (Rodolfi *et al.*, 2009). Las revisiones sobre este tema son numerosas y contrapuestas: Chisti (2007) promueve el uso de fotobioreactores y sin embargo otros expertos que han tenido años de experiencias de cultivo de microalgas a escala comercial defienden ampliamente el uso de las lagunas abiertas o raceways (Ben-Amotz, 2009; Benneman, 2008).

El debate se centra fundamentalmente en dos aspectos: los fotobioreactores son mucho más productivos que las lagunas abiertas y permiten controlar mejor las posibles contaminaciones y los demás parámetros y, sin embargo, son mucho más costosos, lo que impide una rentabilidad adecuada de producción de biomasa. El resultado de esta situación es que los procesos desarrollados en reactores cerrados no son aún económicamente rentables a gran escala, por lo que algunas experiencias comerciales de este tipo han fracasado en los últimos años.

Para evitar algunas de las principales desventajas del uso de las lagunas abiertas y de los fotobioreactores, una opción es optar por un cultivo que integra ambos sistemas, lo que se denomina un sistema de cultivo híbrido (Schenk *et al.*, 2008). La combinación de ambos sistemas es, para algunos autores, la elección más adecuada para obtener la mayor productividad tanto de biomasa como de lípidos, ya que la mayoría de las microalgas no acumulan biomasa ni producen lípidos de manera simultánea. Este sistema se realiza en dos etapas: en la primera se incrementa la densidad celular y en la segunda se incrementa la acumulación de lípidos. La primera etapa se lleva a cabo en sistemas cerrados en los que se obtiene la mayor densidad celular posible y se minimiza el riesgo de contaminación, bajo condiciones de suficiencia de nutrientes. La segunda etapa se realiza en lagunas abiertas usando el inóculo producido en el primer paso y se estimula la biosíntesis de lípidos bajo condiciones de limitación de nutrientes. El resultado esperado de la combinación de ambos sistemas es una alta densidad celular y un alto contenido de aceite (Ryan, 2009). Este sistema híbrido fue adaptado exitosamente para el cultivo a escala comercial (2 ha) de *Haematococcus pluvialis* para la producción de astaxantina y aceite (Huntley y Redalje, 2007).

5.3.4 Recolección de biomasa celular y extracción de lípidos

La recolección de la biomasa celular y la extracción de los lípidos es uno de los retos más importantes a vencer respecto a la producción de biomasa microalgal y de lípidos en particular. Incluso, en procesos de tratamiento de aguas residuales con microalgas, el coste de la recolección determina la viabilidad económica de todo el proceso (Olguín, 2003).

La extracción de las algas consiste en la recuperación de la biomasa en el medio de cultivo. Un método de cosecha adecuado podrá involucrar una o más etapas y será realizado en sistemas físicos, químicos y/o biológicos, con la finalidad de remover la gran cantidad de agua y procesar grandes volúmenes de biomasa de algas. La experiencia ha demostrado que todavía no existe un método de cosecha universal y esa es un área en que hay bastante espacio para investigación y desarrollo (Mata *et al.*, 2009).

Se considera en general que los problemas básicos de la recolección de biomasa celular son:

- a. El pequeño tamaño de las microalgas (entre 3 y 30 μm);
- b. El que los cultivos tienen una densidad celular relativamente baja, especialmente en las lagunas abiertas ($< 0.5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ de biomasa seca) y se requiere cosechar grandes volúmenes de líquido,
- c. El coste de la recolección contribuye de una manera muy importante (del 20 al 40%), al coste total de producción de la biomasa.

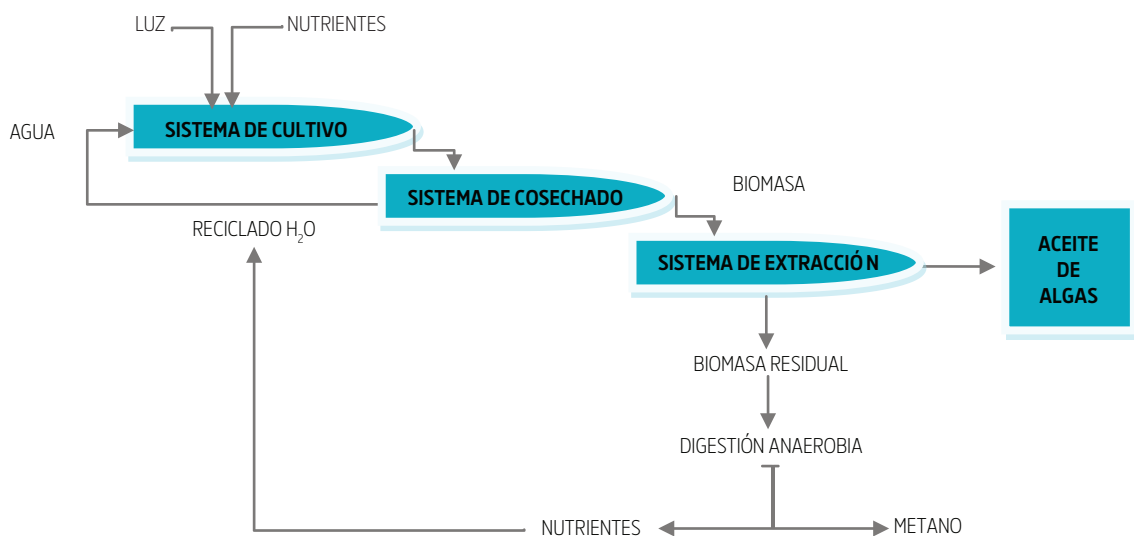
Teniendo en cuenta que la mayoría de las microalgas oleaginosas son pequeñas o no filamentosas, la filtración no es un método fácilmente aplicable a la producción de biodiesel a partir de microalgas, por lo que en la actualidad, la floculación con ciertas modificaciones a la floculación tradicional que utiliza sales metálicas que contaminan la biomasa, está siendo investigada por diversos grupos de investigación.

La recuperación de biomasa microbiana por floculación, se basa en el hecho de que la superficie de todas las cianobacterias y microalgas están cargadas negativamente debido a la presencia de polisacáridos extracelulares (Lee *et al.*, 2009). Sin embargo, la mayoría de los métodos de floculación no son adecuados para la cosecha de biomasa algal para la producción de un bien de bajo valor como el biodiesel, y algunos de ellos muestran interferencia con el agua de mar (Lee *et al.*, 2009). Para solventar estos aspectos, se desarrolló un proceso para la recuperación de la microalga marina *Pleurochrysis carterae*, en el que se utilizaron compuestos carbonados de fácil disponibilidad, tales como el acetato, el glicerol y la glucosa, para cultivarla y promover la formación de polisacáridos extracelulares y la floculación de las células. El proceso es prometedor dado que se encontraron buenos porcentajes de recuperación de más del 90% y un factor de concentración de 226 (Lee *et al.*, 2009). Así mismo, Vandamme *et al.* (2009), observaron que el uso de almidón catiónico fue muy eficiente para flocular microalgas de agua dulce como *Parachlorella* y *Scenedesmus*, pero no para flocular microalgas marinas como *Phaeodactylum* o *Nannochloropsis*.

Por otra parte, se ha recomendado el uso de otros procesos no convencionales para la recuperación a bajo coste de *Chlorella* para producción de biodiesel. Johnson y Wen (2010) estudiaron el cultivo de esta microalga a escala laboratorio sobre una placa de espuma de poliestireno que se coloca en la base de las superficies de

cultivo, logrando una productividad de biomasa de 25.65 gm^{-2} en base seca y un rendimiento de ácidos grasos de 2.31 gm^{-2} . Si bien este método parece prometedor, aún faltan estudios a mayor escala en los que se resuelva viablemente el raspado de las placas de poliestireno.

En relación al proceso de extracción de los lípidos intracelulares, se puede realizar con o sin romper las células previamente. La rotura de las células puede llevarse a cabo por métodos tradicionales, como el uso de la “prensa francesa” que utiliza altas presiones, o por un método más moderno como es la electroporación, en el cual se aplica un campo eléctrico a las células para lograr perforaciones en su pared celular. Así mismo, la extracción de los lípidos se puede realizar con solventes químicos en una o dos etapas (Schenk *et al.*, 2008). Tran *et al.* (2009), evaluaron cinco métodos diferentes y concluyeron que el más adecuado para extraer los lípidos de las especies *Botryococcus braunii* y de *Synechocystis sp.*, fue un método de un solo paso con derivatización para formar metil ésteres “in situ”. Samori *et al.*, (2010) describieron el uso exitoso de solventes de polaridad intercambiable para extraer los lípidos de *Botryococcus braunii*, donde la mezcla DBU/octanol mostró los rendimientos de recuperación más altos, frente a la extracción con n-hexano.



Esquema del proceso de obtención de aceite de microalgas. Esquema recogido en la presentación del proyecto A fully Integrated Process for Biodiesel Production from Microalgae in Saline Water (Proceso integrado de producción de biodiésel procedente de microalgas marinas) presentado por el profesor M. Borowitzka de la Universidad de Murdoch (Australia). Fuente: Energía de las Algas, presente y futuro, (Acien G. *et al.*).

Sin embargo, la extracción con solventes no es amigable con el medioambiente, debido principalmente a las emisiones a la atmósfera y por la disposición final del mismo. Teniendo en cuenta lo anterior, se han desarrollado métodos alternativos de extracción tales como el Proceso de Extracción Acuosa (AEP), que tiene un coste de inversión menor de capital, una operación más segura y una producción simultánea de aceite y de fracciones ricas en proteína con menos daño ambiental. Además, se han utilizado diversas enzimas para mejorar la extracción de lípidos en este proceso, alcanzando porcentajes de recuperación hasta del 90% (de Moura *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha descrito que el uso de lipasas comerciales (Novozymes) de origen microbiano y, en especial la lipasa N435 obtenida de *Candida antarctica* e inmovilizada en soporte hidrofóbico, fue la más eficiente para la transesterificación de ácidos grasos de origen animal por vía enzimática (Rivera *et al.*, 2009).

Según Miguel García Guerrero en la Conferencia en Oviedo de fecha 12/3/2008, los reactores de 50 L/m² con productividad volumétrica media de 0,7 g de biomasa l⁻¹día⁻¹ (o de 140 L/m² a 0.25 g l⁻¹día⁻¹ = 35 g biomasa m⁻²día⁻¹) y con contenidos de ácidos grasos del 30% producirían 10 g de aceite m⁻²día⁻¹. La extrapolación en área daría 0,35 toneladas de biomasa (0,1 toneladas de aceite ha⁻¹día⁻¹). La extrapolación en área y tiempo considerando 300 días operativos al año rendiría 105 toneladas de biomasa y 30 t de aceite ha⁻¹año⁻¹.

Según Acien G. *et al.*, otros autores, como el Dr. Yusuf Christi, llegan a plantear producciones potenciales de hasta 58.760 l aceite ha⁻¹año⁻¹, asumiendo un 30% de aceite en la biomasa. En este caso los datos reales que aporta son muy favorables, ya que para determinar esos rendimientos máximos combina los mejores datos de producción de biomasa algal y de contenido en lípidos. Por tal motivo, son valores de máximos difícilmente alcanzables, ya que la producción de biomasa lleva implícito una disminución de la producción de lípidos y viceversa.

En lo relativo a la estimación de producción de biodiesel de algas (t ha⁻¹año⁻¹), el rendimiento que han publicado la mayoría de autores se basa en cálculos sobre el contenido en lípidos totales, lo que incluye todos los compuestos liposolubles de las células de las algas. Pero el porcentaje de lípidos transformables en biodiesel (C-14 a C-24) que contienen es distinto y, además, debería valorarse la pérdida de rendimiento debida a la extracción de la biomasa de algas, sobre todo en el caso de las especies más oleaginosas como las clorofíceas.

Si los cálculos se efectuaran considerando el rendimiento en aceites extraíbles transformables en biodiesel, se obtendrían datos mucho más realistas que los obtenidos con el contenido en lípidos totales. Por lo que es una tarea prioritaria resolver primero, o en paralelo, el problema del rendimiento y el coste de la extracción de lípidos.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El cultivo de microalgas no es una actividad nueva. Más de sesenta años de investigación sobre la producción masiva de microalgas ha permitido su uso en la actualidad como alimento en la acuicultura de especies marinas, la depuración de aguas residuales, y la producción de biocarburantes y de compuestos para sectores como la dietética y la cosmética. Se trata de productos cuyo valor de mercado permite llevar a cabo de forma rentable este tipo de actividad económica.

A pesar del potencial de las microalgas para su aprovechamiento en los sectores de la energía, la depuración y la 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.

En consecuencia, la investigación actual en microalgas se desarrolla en varios frentes, como el de la ingeniería, orientados a maximizar la productividad y disminuir el consumo energético.

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.

Además, 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.

Actualmente existe un renovado interés en la investigación con microalgas debido a los problemas ambientales y económicos que supone el cambio climático global así como la escasez de petróleo, y es que las microalgas tienen el potencial de biofijar grandes cantidades de CO_2 en su biomasa y ésta de ser transformada a biocombustibles, pudiendo actuar como sumidero real de CO_2 .

La producción de biodiesel a partir de microalgas ha pasado por diversas etapas desde hace varias décadas. El auge académico que mostró desde los años ochenta se ha incrementado en los últimos años, atrayendo a un mayor número de investigadores de todo el mundo. Por otro lado, recientemente han surgido numerosas compañías privadas interesadas en invertir en este nuevo tipo de bioenergético, registrándose un crecimiento intenso y cada año existen numerosos foros y reuniones para promover la inversión en la investigación y desarrollo de este tipo de biodiesel.

Para lograr disminuir los costes de producción de biomasa algal y conseguir así una producción de biodiesel a costes competitivos, se requiere vencer los retos científicos y tecnológicos de su producción, los cuales están orientados a dar respuestas rentables para lograr:

- a. Aumentar la productividad de biomasa microalgal con el mayor contenido de lípidos del perfil adecuado para la producción de biodiesel;
- b. Lograr mayores rendimientos de biomasa microalgal diseñando reactores que ofrezcan costes de inversión y de operación competitivos;
- c. Diseñar nuevos procesos de extracción y recolección de biomasa por medio de biofloculación o el uso de cepas con capacidades intrínsecas de autofloculación;
- d. Optimizar los métodos existentes de extracción de lípidos y de su transesterificación, para que permitan mayores rendimientos a menores costes y, por tanto, mayor competitividad;
- e. Diseñar nuevos procesos para la generación de co-sustancias de alto valor añadido.

Incluso con altas productividades, la obtención de biomasa microalgal es más cara que para la obtención de biomasa procedente de plantas superiores. Esta diferencia de costes debe justificarse en base a la alta calidad de la biomasa microalgal, que permite una conversión a biocombustibles menos costosa, y a la posibilidad de co-producción de sustancias de alto valor agregado. Además, la baja ocupación del suelo de los sistemas de cultivo de microalgas en comparación con los cultivos agrícolas convencionales, la posibilidad de cultivo de las microalgas combinada con la depuración de aguas residuales y la utilización de agua o suelo inservible para otro tipo de cultivos podrían justificar el desarrollo a medio-largo plazo de esta tecnología para su dedicación exclusiva a la reducción de CO₂ y la producción de biocombustibles.

Aunque existan las numerosas ventajas citadas anteriormente, todavía no hay viabilidad económica en la producción de biocombustibles procedentes de algas. Aún se debe revisar el potencial de este proceso para el balance energético negativo global, después de la contabilización de la demanda energética para bombeo de agua, transferencia de CO₂, cosecha y extracción. Por tanto, para alcanzar una tecnología sostenible y económicamente viable, aún se deben mejorar diversos puntos, incluyendo:

- La selección de especies y cepas que equilibren requisitos para producción de biocombustibles con la producción de otros co-productos de alto valor añadido, de modo que se favorezca la viabilidad económica del proceso;
- El alcance de una mayor eficiencia fotosintética;
- El desarrollo de sistemas de producción que posibiliten: monocultivo, reducción de la evaporación y disminución de las pérdidas de CO₂ por difusión, maximización de la relación superficie iluminada/volumen del reactor, sistemas de autolimpieza y de regulación de la temperatura, transparencia y durabilidad del material, así como facilidad de operación y de escalado.

Así mismo, el problema de la producción de algas para producir biomasa no es sólo la producción, sino el cosechado. En el caso de las microalgas, el cosechado es muy costoso en equipos y energía, ya que se trata de organismos de muy pequeño tamaño y que, además, normalmente se cultivan a unas densidades de cosechado bajas; estos costes se incrementan especialmente si la tecnología de cosechado se basa en la centrifugación. Teniendo en cuenta que las densidades en *raceway* son más bajas que en fotobioreactores, los costes de cosechado son aún superiores en los primeros.

Por tanto, resulta imprescindible reducir o eliminar los costes de la recolección para que el proceso sea viable. La centrifugación para grandes volúmenes es actualmente inviable, por lo que habría que buscar algas de mayor tamaño que decanten bien, con el máximo reciclado de las aguas empleadas, o bien buscando procesos de cosechado diferentes y más baratos.

Además de seguir investigando en la búsqueda de nuevas especies de microalgas, sería interesante profundizar en aquellas especies que tengan la capacidad de no ser “micro” en fotobiorreactores, sino “meso”, es decir, agregados filamentosos con tamaños que oscilen entre 0,02 y 3 cm para facilitar su recolección.

El apoyo de las entidades gubernamentales más relacionadas a esta temática se hace imprescindible para lograr que los grupos de investigación avancen en sus desarrollos y se puedan llevar a cabo explotaciones de estas tecnologías a una escala piloto, semi-industrial e incluso industrial. Así mismo, es importante la generación de nuevas políticas públicas a nivel nacional e internacional para el fomento de la I + D no sólo en la producción de biodiesel, sino de biodiesel a partir de microalgas.

Como se ha comentado, la disminución de los costes de producción y extracción, así como la maximización de los beneficios, debe pasar por el aumento de la eficiencia en la producción de la biomasa algal, por lo que sería necesario reducir los costes de cultivo, reduciendo por ejemplo el gasto de fertilizantes y de CO₂, así como reducir los costes de cosechado. Además, habría que aumentar el valor añadido del producto obteniendo no únicamente biocombustibles, sino también obteniendo de la biomasa residual otros co-productos de alto interés y valor.

Existe un gran potencial en la combinación de procesos en los que participan las microalgas para mejorar tanto la viabilidad económica como la medioambiental global, mediante la obtención de biodiesel a partir de producción de microalgas con tratamiento de aguas residuales, inyectando CO₂ de gases de combustión, o la digestión anaerobia para obtención de metano de las microalgas tras haberseles extraído los lípidos u otras sustancias, o bien el destino final del residuo de la biomasa como fertilizante.

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.

Acien G. et al. *Energía de las algas, presente y futuro*. Ed. BIOPLAT.

Algae Production System, 2011. *Sistemas de producción de algas, La Comercialización de algas*. Jornada FAEN.

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.

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.

Asplund, M. 2008. *Algal biomass growth as a step in purification of leachate*. Projekt Mikrobiell Bioteknik 7.5 hp. Linköpings University, Sweden

Barbaro J. *Fitodepuración. Una técnica sencilla y natural para depurar aguas residuales*. Ed. Arquitectura del Paisaje, B&PNº 154.

Bécares, E. 2006. *Limnology of natural systems for wastewater treatment. Ten years of experiences at the experimental field for low-cost sanitation in Mansilla de las Mulas (León, Spain)*. Limnetica 25(1-2):143-154

Ben-Amotz, A. 2009. *Bio-fuel and CO₂ capture by algae*. ANR meeting on «Third Generation Biofuels» - February, 5th 2009. Paris, France.

Benemann, J.R., 1992. *Biological utilization of CO₂ – A review*. Prepared for MIT White Paper. Unpublished.

Benemann, J., 2002. *Greenhouse gas emissions and potential for mitigation from wastewater treatment processes*. Report to the Electric Power Research Institute and U.S. Department of Energy.

Benemann, J.R. 2008. *Microalgae biofuels - A technology roadmap*. 11th International Conference on Applied Phycology. Applied phycology in the 21st century; novel opportunities in a changing world. Galway, Ireland, June 21-27.

Berenguel M, Rodríguez F, Acien FG, García JL, 2004, *Model predictive control of tubular biological photobioreactors*. Journal of Process Control, 14: 377-387

- Bhatnagar, A., et al., 2010. *Chlorella minutissima*—a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Appl Biochem Biotechnol* 161:523-536.
- 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.
- 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.
- Cañavate, J., 2008, *Una visión integrada sobre el cultivo de microalgas para la producción de biocombustibles*. Publicado en mispecies.com y editado por InterAqua CB, 2009.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., 2010. *Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications*. *Bioresource Technology* 101, 3097-3105.
- Chisti, Y. 2007. *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnol Adv* 25(3):294-306.
- De, B.K., Chaudhury, S., Bhattacharyya, D.K. 1999. *Effect of nitrogen sources on α -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis**. *JAOCS* 76(1):156.
- De-Bashan, L., Bashan, Y., 2010. *Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects*. *Bioresource Technology* 101, 1611-1627.
- Demirbas, A., 2008. *Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections*. *Energy Conversion and Management* 49, 2106–2116.
- De Moura, J.M.L.N., et al., 2008. *Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybeans and Cream De-emulsification*. *J Am Oil Chem Soc* 85:985-995.
- Directiva 2003/30/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 8 de mayo de 2003, relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte.
- Gao, Y., et al., 2009. *Algae biodiesel. a feasibility report*. BPRO 29000.
- García Vicente, MJ y Durán Altisent, JM. *Captura de CO₂ mediante algas unicelulares*. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- Garibay Hernández, et al., 2009. *Biodiesel a partir de microalgas*. *BioTecnología* 13(3):38-66.
- González, C., et al., 2008. *Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters*. *Appl Microbiol Biotechnol* 80(5):891-898

González-López C.V., et al., 2011 Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO₂. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 2 (2):93-106

Gordillo F.J.L. et al., 1998. *Effects of light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of Dunaliella viridis*. *J Appl Phycol* 10(2):135-144.

Gouveia. L., Oliveira, A.C. 2009. *Microalgae as a raw material for biodiesel production*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2):269-274.

Griffiths, M.J., Harrison S.T.L. 2009. *Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production*. *J Appl Phycol* 21(5):493-507.

Grönlund, E. 2002. *Microalgae at wastewater treatment in cold climate*. Licentiate Thesis. Division of Sanitary Engineering. Department of Environmental Engineering, Luleå University of Technology, SE-971 87, Luleå, Sweden.

Harmelen, T., Oonk, H., 2006. *Microalgae Biofixation Processes: Applications and potencial contributions to greenhouse gas mitigation options*. Prepared for the International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae operated under the International Energy Agency Greenhouse Gas R&D Programme.

Hernández, AG. et al, 2009. *Biodiesel a Partir de Microalgas*. *Biotecnología y Bioingeniería*, 13, 38-61.

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 CO₂-emission mitigation systems- A review*. *Biotechnology Advances* 29, 189-198.

Hoffman, J.P., 1998. *Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae*. *Journal of Phycology* 34, 757-763.

Hoshida, H., et al.. 2005. *Accumulation of eicosapentaenoic acid in Nannochloropsis sp. in response to elevated CO₂ concentrations*. *J Appl Phycol* 17(1):29-34.

Hu, Q., Sommerfeld, M. 2004. *Selection of high performance microalgae for biorremediation of nitrate-contaminated groundwater*. Technical report for grant number 01-HO-GR-0113. School of Life Sciences, Arizona State University. March 1, 2003 to February 28, 2004. pp. 13.

Hu, Q., et al, 2008. *Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances*. *Plant J* 54(4):621-639.

Huntley, M.E., Redalje, D.G. 2007. *CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal*. *Mitig Adapt Strateg Glob Change* 12(4): 573-608.

- Ikuta Y., et al. 2000. *Carbon dioxide utilization - Microalgae biofixation*. Technology 75:137-145.
- Johnson, M.B., Wen, Z. 2010. *Development of an attached microalgal growth system for biofuel production*. Appl Microbiol Biotechnol 85:525-534.
- Khozin-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.
- 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.
- Lee, Y.K., 2001. *Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential*. Journal of Applied Phycology, 13. pp. 307-15.
- Lee, A.K, Lewis, D.M., Ashman, P.J. 2009. *Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel*. J Appl Phycol 21:559-567.
- Li, Y., Qin, J.G. 2005. *Comparison of growth and lipid content in three Botryococcus braunii strains*. J Appl Phycol 17(6):551-556.
- Li, Q., Du, W., Liu, D. 2008a. *Perspectives of microbial oils for biodiesel production*. Appl Microbiol Biotechnol 80:749-756.
- Li, Y., et al., 2008b. *Biofuels from microalgae*. Biotechnol Prog 24(4):815-820.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. 2008c. *Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae Neochloris oleabundans*. Appl Microbiol Biotechnol 81(4):629-636.
- Li, X., Hu, H-Y., Yang, J. 2010. *Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, Scenedesmus sp. LX1, growing in secondary effluent*. New Biotechnol 27(1):59-63.
- LI X, XU H, WU Q. *Large-scale biodiesel production from microalga Chlorella protothecoides through heterotrophic cultivation in bioreactors*. Biotechnology and Bioengineering 98(4):764-771, 2007.
- Lim, S., Chu, W., 2010. *Use of Chlorella vulgaris for bioremediation of textile wastewater*. Bioresource Technology 101, 7314-7322.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C., 2008. *Effect of iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris*. Bioresource Technol 99(11):4717-4722.
- Lodi, A., Binaghi, L., 2003. *Nitrate and phosphate removal by Spirulina platensis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30, 656-660.
- Loera-Quezada M., Ollguín E., 2010. *Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades*. Rev Latiinoam Biotecnol Amb Allgall 1(1):91-116 91.

Machado C., 2010, *Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe*. Ed. Organización Latinoamericana de Energía (OLADE) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

Markou, G., Georgakakis, D., 2011. *Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review*. Applied Energy, in press.

MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION. History of Martek - Visionary Plant Based Nutrition Research. Site: <http://www.martek.com/About/History.aspx> Acessado em: 10.03.

Martínez L., 2012. *Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas*. Ed. Universidad de León. Instituto de Recursos Naturales.

Martínez, M.E., Sánchez, S., 2000. *Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus**. Bioresource Technology 73, 263- 272.

MATA, T; MARTINS A; CAETANO NS. 2009. *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 217–232.

Mendoza, H., et al., 2008. *Variación cuantitativa y cualitativa de la composición en ácidos grasos de *Cryptocodinium cohnii* en condiciones de supresión de nitrógeno*. Grasas Aceites 59(1):27-32.

Michiki, H. 1995. *Biological CO₂ biofixation and utilization proyect*. Energy Conversion and Management, 36, pp. 701-705.

Molina-Grima, E., et. al, 1996. *A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances*. Journal of Biothecnology, 45, pp. 59- 69.

Molina Grima, E., et al., 1999. *Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup*. J Biotechnol 70(1-3):231-247.

Molina Grima, E., Belarbi, E.H (2003) *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*. Biotechnology Advances 20. 491-515.

Molina-Grima, E., 2008. *Photobioreactor engineering and scale-up*. Jornada Técnica Internacional: Producción y uso de las microalgas con fines energéticos. Madrid, 11 de Noviembre de 2009.

Negoro, M., et al., 1991. *Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SO_x and NO_x*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 28, nº 29, 877-886.

Negoro, M., et al., 1992. *Growth characteristics of microalgae in high concentration CO₂ gas and effects of culture medium trace components impurities thereon*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 34, nº 35, pp. 681-692.

Olguín, E.J. 2003. *Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes*. Biotechnol Adv 22(1-2):81-91.

- Olguín, E.J., et al., 2003. *Annual productivity of Spirulina (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions*. J Appl Phycol 15(2-3): 249-257.
- 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.
- Phang, S.M., et al., 2000. *Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater*. J Appl Phycol 12(3-5):395-400
- Pirt, S. J. Lee, et al., 1983. *A tubular bioreactor for photosynthetic production from carbon dioxide: design and performances*. Journal of Chemical Biotechnology, 33, pp. 35-58.
- 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.
- Powell, N., et al., 2008. *Factors influencing luxury uptake of phosphorous by microalgae in waste stabilization ponds*. Environ Sci Technol 42(16):5958-5962.
- Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Naciones Unidas, 1998.
- 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.
- Radakovits, R., et al., 2010. *Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production*. Eukaryotic Cell 9 (4): 486-501.
- 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.
- Reboloso-Fuertes M. et al., 1999. *Outdoor continuous culture of Porphyrium cruentum in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters*. Journal of Biotechnology, 70, pp. 271-288.
- Rivera, I., Villanueva, G., Sandoval, G. 2009. *Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática*. Grasas Aceites 60(5):469-474.

Richmond, A., 1986. *Microalgaculture*. CRC, Critical Reviews in Biotechnology, 4, pp. 369-438.

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

Richmond, A. (Ed.), 2004. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Ed. Blackwell Science Ltd. UK

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.

Ruiz A., 2011. *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente*. Universidad Politécnica de Valencia.

Ryan, C. 2009. *Cultivating clean energy. The promise of algae biofuels*. This report was carried out from July 2008 to June 2009 for the Natural Resources Defense Council (NRDC) under the sponsorship of the Gordon and Betty Moore Foundation (Palo Alto, CA). Preparation was supervised by NRDC and Terrapin Bright Green and conducted with the advice and assistance of the NRDC Algae Biofuels Advisory Committee.

Samori, C., et al., 2010. *Extraction of hydrocarbons from microalga Botryococcus braunii with switchable solvents*. Bioresource Technol 101(9): 3274-3279.

Schenk, P.M., et al. 2008. *Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production*. Bioenerg Res 1(1):20-43.

Sheehan J., et al., 1998. *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae*. Close-out report. National Renewable Energy Lab, Department of Energy, Golden, Colorado, U.S.A. Report number NREL/TP-580-24190, dated July 1998.

Solovchenko, A.E., et al., 2008. *Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga Parietochloris incisa*. J Appl Phycol 20(3):245-251.

Spolaore, P., et al., 2006. *Commercial applications of microalgae*. J Biosci Bioeng 101(2):87-96.

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

Takagi, M., et al., 2000. *Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of Nannochloris sp. UTEX LB1999*. Appl Microbiol Biotechnol 54(1):112-117.

Takagi, M., Karseno, S., Yoshida, T., 2006. *Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae Dunaliella cells*. J Biosci Bioeng 101(3):223-226.

- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien S., Burris, N., 1983. *Lipid composition of the nitrogen starved green alga Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Tech* 5(6):435-440.
- Tran, H.L., Hong, S.J., Lee C.G., 2009. *Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from Botryococcus braunii LB 572 and Synechocystis sp. PCC 6803*. *Biotechnol Bioproc E* 14:187-192.
- Tredici, M.R., et al., 1991. *A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria*. *Bioresource Technology*, 38, pp. 153-159.
- Tredici, M.R, Chini Zitelli, G., 1998. *Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. From open ponds to vertical alveolar panels: the Italian experience in development of reactors for mass cultivation of phototrophic microorganisms*. *Journal of Applied Phycology*, 4, pp. 221-331.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2007. *Photobioreactors for mass cultivation of algae*. *Bioresource Technology*, 99, pp. 4021–4028 .
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., 2008. *Photobioreactors for mass cultivation of algae*. *Bioresource Technology* 99, 4021-4028.
- Usui N. & Ikenouchi M. 1996. *The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE (1) - Highly-effective photobioreactor system*. *Energ Convers Manage* 38:S487-492.
- Vandamme, D., et al, 2009. *Flocculation of microalgae using cationic starch*. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-009-9488-8.
- Wackett, L.P., 2008. *Microbial-based fuels: science and technology*. *Microbial Biotechnology* 1(3): 211–225.
- 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*.
- Wogan, D.M., et al., 2008. *Algae: pond powered biofuels*. ATI Cleanenergy Incubator. The University of Texas at Austin. pp. 23.
- 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
- Xiong, W., et al., 2008. *High-density fermentation of microalga Chlorella protothecoides in bioreactor for microbio-diesel production*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(1):29-36.
- 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.

Sitios web:

Centro Internacional para la Investigación del Fenómeno de El Niño.
<http://www.ciifen.org>

Ciclo del carbono.
<http://www.ciclodelcarbono.com/>

Econoticias.
www.econoticias.com

El País. Noticias sobre el Protocolo de Kioto.
http://elpais.com/tag/protocolo_kioto/a/

Endesa.
www.endesa.com

Energías Renovables. El periodismo de las energía limpias.
<http://www.energias-renovables.com/>

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
<http://www.magrama.gob.es/es/>

Ministerio de Industria, Energía y Turismo.
www.minetur.gob.es/

Unión Europea.
<http://europa.eu/>

United Nations Framework Convention on Climate Change.
<http://unfccc.int/>

