



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS

Máster Universitario en Ingeniería Ambiental

Estudio de la producción de productos microbiológicos solubles (SMP) en un cultivo de microalgas bajo condiciones operacionales de estrés

Trabajo Final de Máster

Álvaro Marín Camacho

Directores:

Dra. María AV Pachés Giner

Josué González Camejo

Valencia, Septiembre de 2018

Resumen

La importancia de los recursos hídricos en el desarrollo socioeconómico, los ecosistemas y la supervivencia del ser humano combinado con las previsiones de cambio climático han hecho necesaria la búsqueda de nuevas formas de gestión de los recursos hídricos, entre ellas la reutilización de efluente de depuradora. Ésta se basa en un correcto tratamiento y depuración de las aguas residuales. Ya que los métodos tradicionales requieren un elevado coste energético y económico, además de no valorizar los contaminantes contenidos, han hecho necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos.

Entre las distintas alternativas se encuentra la combinación de tratamientos anaerobios de membranas combinados con fotobiorreactores de membrana de cultivo de microalgas. Sus principales ventajas son su alta capacidad para la obtención de productos de valor añadido y su condición de sumidero de CO₂. Entre las distintas capacidades de depuración encontramos la eliminación de nitrógeno y fósforo, bacterias coliformes y metales pesados, así como son acumuladoras de algunos compuestos, como organoclorados e hidrocarburos.

Sin embargo, uno de los principales problemas que presenta el empleo de fotobiorreactores es la separación de la biomasa algal, numerosos estudios señalan la filtración mediante tecnología de membranas como el método más competitivo. Uno de los principales problemas es el ensuciamiento o *fouling*, el cual provoca un descenso del flujo de permeado. Una de las principales causas de éste es la precipitación de compuestos orgánicos de alto peso molecular produciendo un biofilm sobre la membrana. El biofilm suele estar formado por las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales engloban polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, ácidos húmicos y otras sustancias poliméricas. Las EPS pueden encontrarse en el interior de la pared celular (eEPS) o fuera, lo que se conoce como productos microbianos solubles (SMP).

Entre los distintos motivos por los que los microorganismos segregan EPS son factores ambientales de estrés. En el presente trabajo se ha estudiado que condiciones operacionales minimizan la producción y liberación de SMP, realizando estudios sobre cómo afectan factores como la temperatura, disponibilidad de nutrientes, modos de operación o la competencia con otros microorganismos, buscando soluciones para reducir los costes de mantenimiento y operación de los fotobiorreactores de membrana (MPBR).

Resum

La importància dels recursos hídrics al desenvolupament socioeconòmic, els ecosistemes i la supervivència de l'ésser humà combinat amb les previsions de canvi climàtics han fet necessària la recerca de noves formes de gestió dels recursos hídrics, entre elles la reutilització d'efluent de depuradora. Aquesta es basa en un correcte tractament i depuració de les aigües residuals. Ja que els mètodes tradicionals requereixen un elevat cost energètic i econòmic, a més de no valoritzar els contaminants continguts, han fet necessària la recerca de tractament alternatius.

Entre les diferents alternatives es troba la combinació de tractaments anaerobis de membranes combinats amb fotobiorreactors de membrana de cultiu de microalgues. Els seus principals avantatges són la seva alta capacitat per a l'obtenció de productes de valor afegit i la seva condició d'embornal de CO₂. Entre les diferents capacitats de depuració trobem l'eliminació de nitrogen i fòsfor, bacteris coliformes i metalls pesants, així com són acumuladores d'alguns compostos, com organoclorats i hidrocarburs.

No obstant això, un dels principals problemes que presenta l'ús de fotobiorreactors és la separació de la biomassa algal, nombrosos estudis assenyalen la filtració mitjançant tecnologia de membranes com el mètode més competitiu. Un dels principals problemes és l'embrutiment o fouling, el qual provoca un descens del flux de permeat. Una de les principals causes d'aquest és la precipitació de compostos orgànics d'alt pes molecular produint un biofilm sobre la membrana. El biofilm sol estar format per les substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS), les quals engloben polisacàrids, proteïnes, àcids nucleics, lípids, àcids húmics i altres substàncies polimèriques. Les EPS poden trobar a l'interior de la paret cel·lular (EEPS) o fora, el que es coneix com a productes microbians solubles (SMP).

Entre els diferents motius pels quals els microorganismes segreguen EPS són factors ambientals d'estrès. En el present treball s'ha estudiat quines condicions operacionals minimitzen la producció i alliberament de SMP, realitzant estudis sobre com afecten factors com la temperatura, disponibilitat de nutrients, maneres d'operació o la competència amb altres microorganismes, buscant solucions per reduir els costos de manteniment i operació dels fotobiorreactors de membrana (MPBR).

Abstract

The importance of water resources in socioeconomic development, ecosystems and the survival of human beings combined with the predictions of climate change have made it necessary to search for new ways of managing water resources, including the reuse of sewage effluent. This is based on a correct treatment and purification of wastewater. Since traditional methods require a high energy and economic cost, in addition to not valuing the contained contaminants, they have made the search for alternative treatments necessary.

Among the different alternatives is the combination of anaerobic treatments of membranes combined with membrane photobioreactors of microalgae culture. Its main advantages are its high capacity for obtaining value-added products and its status as a CO₂ sink. Among the different purification capacities we find the elimination of nitrogen and phosphorus, coliform bacteria and heavy metals, as well as accumulating some compounds, such as organochlorines and hydrocarbons.

However, one of the main problems that the use of photobioreactors presents is the separation of the algal biomass; numerous studies point to filtration through membrane technology as the most competitive method. One of the main problems is fouling, which causes a decrease in permeate flow. One of the main causes of this is the precipitation of organic compounds of high molecular weight producing a biofilm on the membrane. The biofilm usually consists of extracellular polymeric substances (EPS), which include polysaccharides, proteins, nucleic acids, lipids, humic acids and other polymeric substances. EPS can be found inside the cell wall (eEPS) or outside, which is known as soluble microbial products (SMP).

Among the different reasons why microorganisms secrete EPS are environmental factors of stress. In the present work it has been studied that operational conditions minimize the production and release of SMP, conducting studies on how they affect factors such as temperature, availability of nutrients, modes of operation or competition with other microorganisms, seeking solutions to reduce maintenance costs and operation of membrane photobioreactors (MPBR).

Índice

1. Introducción	19
1.1. Problemática ambiental de la contaminación de aguas	19
1.2. Tratamiento de aguas residuales con microalgas	21
1.3. Crecimiento de las microalgas	25
1.4. Métodos de separación de la biomasa	28
1.5. Reactores de Membrana	30
1.6. Ensuciamiento de membranas (<i>Fouling</i>)	34
1.7. Sustancias Poliméricas Extracelulares	37
2. Objetivos	39
3. Material y métodos	41
3.1. Planta piloto	41
3.1.1. Funcionamiento de la planta piloto	41
3.1.2. Toma de muestras	42
3.2. Montajes Experimentales	42
3.2.1. Inóculo y Alimento	42
3.2.2. Diseño de Experimentos	42
3.2.3. Purga y Alimentación	43
3.3. Determinación de Glúcidos	47
3.4. Determinación de Proteínas	47
3.5. Determinación de DQO _{sol}	48
3.6. Determinación de Ácidos Grasos Volátiles	48
3.7. Determinación de Nutrientes	49
3.8. Determinación de la Densidad Óptica	49
3.9. Determinación de los Sólidos Suspendidos Totales y Volátiles	49
4. Resultados y discusión	51
4.1. Experimentos con condiciones controladas	51
4.1.1. Influencia del modo de operación.	51
4.1.2. Influencia de la temperatura.	60
4.1.3. Influencia de la concentración de nutrientes en la producción de SMP.	68
4.1.4. Influencia de la competencia con AOB sobre la producción de SMP.	72
4.2. Seguimiento de la planta piloto	75
5. Conclusiones	81
6. Bibliografía	83

Índice de Tablas

Tabla 1: Clasificación de los distintos procesos de membrana 29

Tabla 2: Tabla resumen de los experimentos realizados en el laboratorio. 45

Índice de Figuras

<i>Figura 1: Esquema de funcionamiento de la filtración tangencial</i>	<i>29</i>
<i>Figura 2: Ensuciamiento por bloqueo de poro.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes 25°C</i>	<i>51</i>
<i>Figura 4: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes 25°C</i>	<i>52</i>
<i>Figura 5: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes 25°C.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 6: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes a 25°C.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 7: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} 25°C.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 8: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes 30°C</i>	<i>56</i>
<i>Figura 9: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes 30°C</i>	<i>56</i>
<i>Figura 10: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes 30°C.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 11: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes 30°C.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 12: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} a la izquierda 30°C.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 13: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes a temperaturas de 25, 30 y 35 °C</i>	<i>60</i>
<i>Figura 14: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes a temperaturas de 25, 30 y 35 °C</i>	<i>60</i>
<i>Figura 15: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes a temperaturas de 25, 30 y 35 °C</i>	<i>62</i>
<i>Figura 16: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes a temperaturas de 25, 30 y 35 °C</i>	<i>62</i>
<i>Figura 17: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} a temperaturas de 25, 30 y 35 °C</i>	<i>63</i>
<i>Figura 18: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes a temperaturas de 25°C e intervalos a 35°C.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 19: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes a temperaturas de 25°C e intervalos a 35°C</i>	<i>65</i>
<i>Figura 20: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes a temperaturas de 25°C e intervalos a 35°C.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 21: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes a temperaturas de 25°C e intervalos a 35°C</i>	<i>66</i>
<i>Figura 22: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} a temperaturas de 25°C e intervalos a 35°C</i>	<i>67</i>
<i>Figura 23: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes con diferentes concentraciones de nutrientes.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 24: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes con diferentes concentraciones de nutrientes.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 25: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes con diferentes concentraciones de nutrientes.....</i>	<i>69</i>

<i>Figura 26: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes con diferentes concentraciones de nutrientes.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 27: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} con diferentes concentraciones de nutrientes</i>	<i>70</i>
<i>Figura 28: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes con diferentes dosificaciones de alitiourea</i>	<i>72</i>
<i>Figura 29: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes con diferentes dosificaciones de alitiourea.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 30: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes con diferentes dosificaciones de alitiourea</i>	<i>73</i>
<i>Figura 31: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes con diferentes dosificaciones de alitiourea.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 32: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} con diferentes dosificaciones de alitiourea</i>	<i>74</i>
<i>Figura 33: Concentración de $SMP_{Glúcidos}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet</i>	<i>75</i>
<i>Figura 34: Concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 35: Concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ e intensidad lumínica en el FBR de la EDAR del Carraixet</i>	<i>75</i>
<i>Figura 36: Concentración de $SMP_{Proteínas}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet</i>	<i>77</i>
<i>Figura 37: Concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 38: Concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ e intensidad lumínica en el FBR de la EDAR del Carraixet</i>	<i>78</i>
<i>Figura 39: Concentración de DQO_{SOL} en el FBR de la EDAR del Carraixet</i>	<i>79</i>

1. Introducción

1.1. Problemática ambiental de la contaminación de aguas

El agua es un recurso que se encuentra en el epicentro del desarrollo sostenible y es fundamental para el desarrollo socioeconómico, la energía y la producción de alimentos, los ecosistemas saludables y para la propia supervivencia del ser humano (*UNESCO, 2015*).

Las proyecciones de cambio climático prevén sequías meteorológicas para el año 2100. Existe incertidumbre sobre cómo los déficits de lluvia y humedad del suelo podrían traducirse en periodos prolongados de sequía (*IPPC, 2014*) debido al cambio climático, especialmente en los meses de verano, si las precipitaciones promedio más bajas coinciden con el aumento de las temperaturas (*Murphy et al., 2009*). La información proporcionada por los modelos climáticos es insuficiente para apoyar la toma de decisiones de cara al futuro debido a la variabilidad natural del recurso, el crecimiento de las poblaciones y los hábitos de consumo de agua (*Walsh et al., 2016*). Por todo esto es necesario mejorar y gestionar los recursos hídricos a través de nuevas opciones de gestión, entre ellas la reutilización del efluente (*Angelakis et al., 2000*).

En la gran mayoría de países desarrollados, en los que se realizan tratamientos a las aguas residuales, con el fin evitar estos efectos negativos sobre el medio, se emplean tratamientos aerobios de fangos activados (*Rodríguez Fernández-Alba et al., 2006*) para la eliminación de materia orgánica y nutrientes. Estos degradan la materia orgánica, emitiendo dióxido de carbono, un gas de efecto invernadero (*Mamais et al., 2015*), y requieren de aireación, lo que conlleva un gasto energético y económico asociado. La eliminación de nitrógeno se realiza mediante un proceso de nitrificación-desnitrificación, lo que puede llevar asociado un consumo de fuentes de carbono orgánico, emitiéndose este al medio en forma de nitrógeno gas. Además, en caso de eliminar el fósforo por vía química, se produce un incremento en el coste, por el uso de reactivos, así como puede conducir a la producción de contaminación secundaria (*De la Noüe et al., 1992*).

La reutilización del efluente se basa en un correcto tratamiento y depuración de las aguas residuales, ya que, debido a las actividades urbanas e industriales se produce un aporte de materias contaminantes al agua, constituyendo así el agua residual. El vertido de esta, con contaminantes procedentes de la actividad humana, puede provocar modificaciones en las características del medio receptor. Entre las principales alteraciones que se pueden producir está la disminución de la concentración de oxígeno, afectando de forma perjudicial a la flora y fauna propia de los ecosistemas acuáticos. También puede afectar a la concentración de nutrientes, provocando un crecimiento excesivo de algas y otras plantas, fenómeno conocido como eutrofización (*Cai et al., 2013*). Además, existe peligro de propagación de organismos patógenos o sustancias tóxicas, que pueden ser causantes de la transmisión de enfermedades.

Por lo tanto, los procesos tradicionales de tratamiento de aguas residuales implican un alto coste energético y económico. Estos no aprovechan la energía contenida en la materia

orgánica ni recuperan los nutrientes presentes en esta. Teniendo en cuenta que el fósforo es considerado un recurso limitante y no renovable, del cual se estima su agotamiento entre 50 y 100 años (*Cordell et al., 2009*), se hace evidente la necesidad de recuperar y aprovechar este recurso, presente en las aguas residuales.

Por todo lo expuesto se hace patente la necesidad de buscar formas alternativas de depuración de aguas residuales, que incluyan la valorización de los subproductos generados durante el tratamiento. Por ello, se deben buscar tecnologías que se centren en la recuperación de los contaminantes, más que en la eliminación de estos. Entre estas formas alternativas encontramos el uso de tecnologías anaerobias de membrana combinadas con la utilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, produciendo energía, al mismo tiempo que se recicla el nitrógeno y el fósforo contenido. Para el cultivo se evita el uso de fuentes minerales en el proceso de producción de las microalgas y se evita el agotamiento de las reservas de fósforo, produciendo grandes cantidades de biomasa valiosa (*Olguín, 2012*).

La aplicación del desarrollo sostenible al tratamiento de aguas tiene como finalidad la recuperación de nutrientes, la obtención de productos y energía (*Kleerebezem & Van Loosdrecht, 2007*) y la reutilización del agua para distintos fines, dependiendo del grado de calidad (*Angelakis et al., 2000*).

1.2. Tratamiento de aguas residuales con microalgas

Para lograr los objetivos planteados en el apartado anterior, una tecnología en desarrollo es la combinación de reactores anaerobios de membrana (AnMBR) junto con fotobiorreactores de microalgas (FBRs). Esta combinación permite, en una primera etapa anaerobia, la eliminación de la materia orgánica mediante la valorización de esta para la producción de biogás (*Pretel et al., 2016*). La corriente de salida contiene una alta concentración de nutrientes, por lo que puede ser conducida al fotobiorreactor, ya que las microalgas tienen una alta capacidad de absorción de nutrientes (*Viruela et al., 2016*). Así mismo, el exceso de fango de la primera etapa anaerobia, junto con el exceso de biomasa algal puede digerirse de manera anaerobia para producir biogás.

El interés por los cultivos de microalgas reside del hecho de que los procesos de tratamiento convencionales tienen algunos inconvenientes, como su eficacia variable en la eliminación de nutrientes, funcionamiento costoso, procesos químicos que pueden conducir a la contaminación secundaria y la pérdida de nutrientes (N y P) (*De la Noüe et al., 1992*). Además, los procesos convencionales conducen a una utilización inadecuada de los recursos naturales (*Guterstan & Todd, 1990*).

Las principales ventajas que han despertado un gran interés por el cultivo de microalgas es su capacidad para la obtención de productos de valor añadido, su utilización como fuente alternativa a los combustibles fósiles tradicionales y su condición de sumidero de CO₂ (*Znad et al., 2012*). Dado que existe una gran variedad de microalgas capaces de consumir nutrientes y al mismo tiempo producir material celular potencialmente útil, estas representan una alternativa interesante como tratamiento terciario de las aguas residuales para la prevención de la eutrofización de las aguas superficiales (*Arbib et al., 2014*).

Entre las distintas capacidades de depuración de las microalgas encontramos:

- *Eliminación de nitrógeno y fósforo*: El tratamiento biológico de aguas residuales con algas para eliminar nutrientes como el nitrógeno y el fósforo y proporcionar oxígeno a las bacterias anaerobias se propuso hace más de 50 años (*Oswald & Gotaas, 1957*).

Las microalgas tienen una alta capacidad de absorción de nutrientes inorgánicos (*Talbot & De la Noüe, 1993*), ya que son macronutrientes esenciales para su crecimiento, y se pueden cultivar en masa en fotobiorreactores.

El crecimiento de las microalgas y la absorción de nutrientes no se ven afectados exclusivamente por la disponibilidad de nutrientes, también dependen de interacciones complejas entre factores físicos como el pH (*Azov & Shelef, 1987*), la intensidad de la luz y la temperatura (*Talbot & De la Noüe, 1993*) y factores bióticos. El primer factor biótico que influye en el crecimiento es la densidad inicial. Se espera que cuanto mayor es la productividad de biomasa algal, mayor sea la capacidad de eliminación de nutrientes del sistema (*Lau et al., 1995; González-Camejo et al., 2018; Morales-Amaral et al., 2015*). Sin embargo, la alta densidad de algas conduciría a

producir sombreado en los reactores, acumulación de sustancias inhibitoras y reducción de la eficacia fotosintética (Darley, 1982).

- *Eliminación de bacterias coliformes:* Moawad (1968) observó que los factores ambientales que eran favorables para el crecimiento de microalgas eran desfavorables para la supervivencia de bacterias coliformes. El aumento del pH debido a la actividad fotosintética produce un efecto desinfectante. (Mara & Pearson, 1986).
- *Eliminación de metales pesados:* Se sabe que las microalgas son capaces de captar metales pesados (Rai et al., 1981). Se han detectado concentraciones significativas de metales pesados y en aguas residuales urbanas, por lo tanto, la bioacumulación de metales por parte de las algas puede ser un método factible para la remediación de las aguas residuales contaminadas con metales (Darnall et al., 1986).

Se han realizado diversos estudios que han establecido que existen microalgas marinas y de agua dulce capaces de captar selectivamente varios metales pesados de los medios acuosos y acumular estos dentro de sus células (Chen et al., 2012).

Además, las algas también han resultado ser buenos acumuladores de compuestos, tales como organoclorados y tributilestaño (Wright & Weber, 1991), pudiendo descomponer algunos de estos compuestos (Wu & Kosaric, 1991). También se ha observado que las algas degradan algunos hidrocarburos (Carpenter et al., 1989). Otro factor a tener en cuenta es la capacidad de las microalgas para fijar CO₂ (de Wilt et al., 2016).

La investigación actual está centrada principalmente en la obtención de cultivos con alto contenido en lípidos para la producción de biodiesel y otras posibilidades de aprovechamiento energético como son la fermentación alcohólica o la digestión anaerobia.

Otra de las aplicaciones en las que pueden ser empleados los cultivos de microalgas es la industria alimentaria, ya que algunas especies como *Chlorella*, *Dunaliella* y *Spirulina* son una fuente importante de ácidos grasos polinsaturados esenciales para el ser humano, ya que reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares. También se emplean en alimentación animal como suplementos que mejoran la respuesta inmunológica o la fertilidad.

Algunas ventajas interesantes respecto a otros tratamientos convencionales son:

- Rentabilidad: Este sistema es más rentable en la eliminación de fósforo y nitrógeno que los procesos de fangos activados y otros tratamientos secundarios.
- Bajos requisitos energéticos.
- Reducción en la formación de fangos.
- Reducción de gases de efecto invernadero.
- Producción de biomasa algal útil para diversos usos.
- Eliminación simultánea de nitrógeno y fósforo.
- Oxigenación del agua efluente.

Debido a que los requisitos de espacio son muy elevados para la implantación de sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante cultivo de microalgas (*De Pauw & Van Vaerenbergh, 1983*), se han estudiado y desarrollado sistemas de tratamiento mediante cultivos de algas hiperconcentrados, los cuales son altamente eficientes en la eliminación de nitrógeno y fósforo, con un consumo mínimo de energía (*Arbib et al., 2013*). Otro de los inconvenientes que presentan los fotobiorreactores son: como aumentar la eficacia solar y cómo reducir el consumo de energía.

Por otro lado, el cultivo de microalgas se puede llevar a cabo de forma fotoautótrofa, fotoheterótrofa, mixotrófico o heterótrofa. La única forma viable a nivel industrial actualmente es la primera (*Brennan & Owende, 2010*).

- *Fotoautótrofa*: Las algas obtienen la energía del Sol y el carbono de compuestos inorgánicos (sales).
- *Fotoheterótrofa*: Obtienen la energía del Sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- *Mixotrófica*: Algunas algas son capaces de crecer tanto de forma autótrofa como heterótrofa, de manera que la fuente de energía puede ser tanto la luz como la materia orgánica. El carbono se obtiene tanto de compuestos orgánicos como de CO₂.
- *Heterótrofa*: Los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono, existen algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz.

Según la configuración y funcionamiento de sistema de cultivo de microalgas, estos pueden ser, sistemas abiertos (estanque o canales) o cerrados (fotobiorreactores). Los sistemas abiertos son canales o estanques de reducida profundidad y funcionamiento simple. Sin embargo, los sistemas cerrados tienen mayor complejidad, se trata de cultivos en espacios cerrados, donde prácticamente no existe contacto con la atmósfera y dotados con geometrías diversas para favorecer el paso de la luz (*Ho et al., 2011*).

- *Sistemas abiertos*: Los sistemas abiertos son generalmente fáciles de diseñar, construir y operar, pero tienen importantes limitaciones como son el requerimiento de un gran espacio para su implantación, la dificultad de cultivar una única especie, la falta de control sobre los parámetros de operación, las pérdidas de agua por evaporación y las dificultades de mezclado eficiente, lo que conlleva insuficiencia de luz en las capas inferiores, así como la potencial falta de CO₂ (*Pulz & Scheibenbogen, 2006*).

Los estanques de canal abiertos se caracterizan por sus bajas densidades celulares, actualmente es el sistema de cultivo más utilizado y más barato para producción comercial de microalgas (*Chisti, 2007*).

Los más utilizados son los estanques tipo *raceway*. Son canales construidos en forma de bucle infinito donde el cultivo circula gracias a la impulsión ofrecida por unas paletas giratorias.

- *Sistemas cerrados*: Los sistemas cerrados se caracterizan por tener una mejor eficiencia fotosintética y una huella de carbono reducida (*Wang et al., 2012*). Actualmente se ha incorporado la tecnología de membranas a los fotobiorreactores (PBR), lo que ha dado como resultado el concepto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) (*Bilad et al., 2014*).

Son reactores transparentes de plástico o vidrio para permitir el paso de la luz, confeccionados con geometrías muy variadas, destacando entre las diferentes geometrías los de columna, placa plana o tubulares.

En estos sistemas, la productividad es mucho mayor, duplicando y triplicando los valores máximos alcanzados en cultivos al aire libre. La productividad alcanzada en los fotobiorreactores aun no es la máxima teórica, y no ha sido posible llevar a gran escala resultados obtenidos en laboratorio (*Posten, 2009*).

- Tubulares: Tubos transparentes a través de los cuales se hace circular el cultivo, para evitar altas concentraciones de oxígeno, los tubos se conectan a un desgasificador donde el oxígeno se elimina mediante inyección de aire. Estos pueden orientarse horizontalmente, dispuestos en un solo plano o múltiples planos apilados verticalmente (columna). Los diámetros de los tubos varían según la orientación del sistema entre 3 y 10 cm (*Chisti, 2007*).
- Placa plana: Son recipientes planos transparentes, donde el cultivo se mezcla por aireación. La profundidad del cultivo varía entre 1 y 20 cm, por lo que las concentraciones de biomasa varían mucho (*Zou & Richmond, 1999*). Éste, al tratarse del sistema con la trayectoria óptica más corta tiene una productividad global más alta (*de Vree et al., 2015*).

Por lo tanto, el cultivo de microalgas lleva asociado un valor añadido debido a la producción de biomasa algal, favoreciendo la implementación de una economía circular, empleando esta en complementos proteicos y aditivos alimentarios (acuicultura, alimentación animal y humana), producción energía como biogás y biocombustibles, agricultura (fertilizantes y acondicionadores del suelo), productos farmacéuticos, cosméticos y otros productos químicos valiosos (*Mallick, 2002*).

1.3. Crecimiento de las microalgas

Cada especie de microalga presenta características propias respecto a condiciones óptimas de crecimiento, así como la productividad máxima alcanzada en diferentes configuraciones de cultivo, sin embargo, Los factores influyentes en el desarrollo son comunes.

- *Luz*: Los organismos fotosintéticos solo emplean la fracción del espectro de luz solar fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm. Esta fracción supone aproximadamente el 40% de la radiación total del Sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales presentan una eficiencia de alrededor del 1% en la conversión de energía lumínica en biomasa.

El crecimiento de los organismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de luz recibida, siempre que se encuentre por debajo de cierto límite. A partir de éste, los sistemas se ven dañados y la fotosíntesis inhibida, a este fenómeno se le denomina fotoinhibición (*Pulz, 1998*). Las algas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila de sus células, por lo que las algas adaptadas a bajas intensidades lumínicas tienen un mayor contenido en clorofila.

- *Nutrientes*: Los principales nutrientes minerales que toman del medio y necesitan para su desarrollo, en el caso de las microalgas autótrofas, son:
 - *Carbono*: Las microalgas pueden emplear como fuente de carbono el CO₂ presente en la atmósfera, así como los iones bicarbonato (HCO₃⁻).
 - *Nitrógeno*: El contenido en nitrógeno de la biomasa puede suponer entre un 1% y hasta un 10% y depende de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. En general, las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno gas y óxido de nitrógeno en algunos casos.

El nitrógeno amoniacal es la fuente de nitrógeno preferida debido a la menor necesidad de energía para la absorción de amoniaco (*Markou et al., 2014*). Cuando el amoníaco, el nitrito y el nitrato están presentes en concentraciones similares en el agua residual, las algas tienden a usar amoníaco preferentemente y la absorción de nitrito y nitrato no ocurre en gran medida, hasta que el amoníaco se consume casi por completo (*Cai et al., 2013*). Sin embargo, cuando el nitrato estaba presente en la alimentación en una concentración mucho más alta, otro estudio en MPBR mostró que el nitrato, en lugar de amonio, era preferido por *C. vulgaris*, *Botryococcus braunii* y *Spirulina platensis* (*Honda et al., 2012*). También se ha sugerido que cuando se exponen a diferentes formas de nitrógeno, algunas especies de microalgas, como *Scenedesmus*, no muestran preferencia por ciertas fuentes de nitrógeno (*Park et al., 2010*).

El nitrógeno en forma de amonio, cuyo equilibrio de disociación depende de la temperatura y el pH del medio, inhibe el crecimiento de las microalgas, ya que en general es tóxico para los organismos fotosintéticos. La tolerancia depende de la especie, en el caso de *Chlorella sp.*, no muestra inhibición ante concentraciones de $400 \text{ mgNH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$.

- *Fósforo*: Es otro de los macronutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas, lo toman en forma de ortofosfatos (PO_4^{3-}). Existen factores que ralentizan la toma de fosfatos por parte de las microalgas, como la concentración de fósforo total, factores ambientales como el pH, la temperatura o la intensidad de luz, así como la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio (Choi et al., 2015). La cantidad necesaria de fósforo es mucho menor que la de nitrógeno para una misma cantidad de biomasa generada.
- *Otros nutrientes*: Macronutrientes como azufre, calcio, magnesio y potasio, así como de micronutrientes como molibdeno, hierro, níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro (Markou et al., 2014).

Es importante destacar que un déficit de nutrientes provoca en las microalgas una acumulación de lípidos siempre que haya luz y CO_2 disponibles en el medio (Rodolfi, 2009).

- *Salinidad*: La salinidad del medio de cultivo tiene una gran influencia sobre el crecimiento de las algas como sobre la productividad de lípidos y otras sustancias de interés (Araujo, 2011).
- *pH*: El pH es un parámetro clave y controlable para el crecimiento y la cosecha de la biomasa algal (Wang et al., 2009). En el caso del cultivo de *Chlorella sp.*, el pH óptimo se encuentra entre 6,3 y 7,5 (Huo et al., 2012), este se consigue mediante aireación o adición de CO_2 (Arbib et al., 2013). El proceso fotosintético de fijación de CO_2 provoca un aumento gradual de pH en el medio debido a la acumulación de OH^- (Muñoz et al., 2009) lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoniaco por stripping a la atmósfera y la eliminación de fósforo por precipitación de ortofosfatos.
- *Oxígeno*: El nivel de oxígeno disuelto se debe controlar, ya que altas concentraciones de oxígeno pueden inhibir la fijación de carbono. Esta inhibición se ve favorecida por altas radiaciones y temperaturas, así como el déficit de CO_2 , ya que altas concentraciones de oxígeno en presencia de la radiación adecuada pueden llegar a desarrollar radicales libres, que pueden ser tóxicos para las células y causar daños en las membranas. La creación de turbulencia puede reducir la concentración de oxígeno debido al stripping de aire.

- *Agitación*: La agitación facilita la eficiencia del transporte de sustancias en el medio, impide la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes del reactor homogeneiza el pH y asegura una correcta distribución de los gases y luz.

Cabe destacar que no todas las especies toleran una agitación fuerte, ya que son sensibles al estrés hidrodinámico.

- *Temperatura*: Existen una gran variedad de microalgas capaces de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, aun así, todas ellas presentan un rango fuera del cual se ven inhibidas o incluso mueren. La temperatura óptima para el crecimiento efectivo de muchas especies se encuentra entre 25 y 30°C, mientras que las altas temperaturas (35°C o más) pueden influir negativamente en el crecimiento de algunas especies. (Chinnasamy *et al.*, 2009).

En sistemas abiertos de cultivo un incremento de temperatura se ve compensado por la evaporación del agua, regulándose de este modo la temperatura máxima. En sistemas cerrados, es necesaria la refrigeración adicional. Si la fluctuación entre temperatura mínima y máxima es muy amplia, puede ser igual de necesario el calentamiento durante las horas de poca luz que la refrigeración durante las horas de mayor iluminación.

- *Aireación*: Durante la operación de un MPBR se necesita aireación suficiente para mezclar eficazmente la suspensión de algas, proporcionar CO₂ y reducir el ensuciamiento de la membrana (Park *et al.*, 2010).
- *Modo de operación*: La operación en continuo puede llegar a doblar la biomasa de algas producidas en un fotobiorreactor en comparación con operación en batch (Ruiz *et al.*, 2013). En continuo la biomasa se mantiene más tiempo en fase de crecimiento exponencial gracias a la continua entrada al reactor de nuevo medio de cultivo, con una concentración más alta de nutrientes (Mata *et al.*, 2013).
- *Tiempo de retención hidráulico*: El tiempo de retención hidráulico afecta a la productividad de las microalgas (Matamoros *et al.*, 2015), así como a la efectividad del tratamiento de aguas residuales (Xu *et al.*, 2015). El TRH óptimo varía considerablemente entre las distintas especies de microalgas (Ruiz *et al.*, 2013), en general es preferible el empleo de TRH largos para una eliminación adecuada de contaminantes.
- *Tiempo de retención celular*: El TRC está asociado con la concentración de biomasa y la fase de crecimiento en las que se cultivan las distintas especies (Bilad *et al.*, 2014). El empleo de MPBR permite el desacoplamiento de TRC y TRH, lo que puede mejorar la acumulación de especies de crecimiento relativamente lento en el sistema (Ahmed *et al.*, 2007). El TRC óptimo depende de la especie, la carga de nutrientes y la intensidad de luz, aunque un TRC alto también puede causar el descenso de las productividades de biomasa debido a la baja proporción de alimento (Honda *et al.*, 2012).

1.4. Métodos de separación de la biomasa algal

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

- *Flotación*: La flotación sólo es posible en los casos de las especies que flotan naturalmente, y no necesitan reactivos químicos.
- *Decantación*: La decantación depende del radio de los microorganismos y su densidad, es el método más empleado en tratamiento de aguas por las grandes cantidades de biomasa con las que se trabaja, sin embargo, en el caso de las microalgas solo es posible su utilización en algunos casos.
- *Centrifugación*: La centrifugación es el método más extendido en el caso de los productos con alto valor añadido (*Molina Grima, 2003*), aunque presenta inconvenientes por el alto consumo energético y el peligro de dañar las células debido al esfuerzo cortante.
- *Filtración (Tecnología de membranas)*: Una membrana es una barrera semipermeable que permite el paso selectivo de sustancias a través de ella. El proceso de separación tiene lugar debido a la existencia de una fuerza impulsora, principalmente la presión, concentración o potencial eléctrico.

El sistema de cultivo de microalgas que ha sido objeto de estudio consiste en un fotobiorreactor donde se desarrolla la biomasa algal, seguido de un proceso de separación de la biomasa generada mediante tecnología de membranas.

La filtración puede ser el método más competitivo en comparación al resto de sistemas de separación de microalgas, aunque para grandes volúmenes los costes de bombeo y de reemplazo de las membranas puede hacer perder la competitividad del método.

En los procesos de separación por membranas la corriente a tratar fluye de forma tangencial a lo largo de la superficie de la membrana, generándose dos corrientes, una llamada permeado, que es la fracción capaz de atravesar la membrana y otra, llamada rechazo, que es la fracción que no es capaz de atravesar los poros de la membrana.

La filtración tangencial permite mantener una velocidad elevada de filtración, generando turbulencias, que evita que las partículas se depositen sobre la superficie de la membrana formándose una torta, que dificultaría el paso a través de esta.

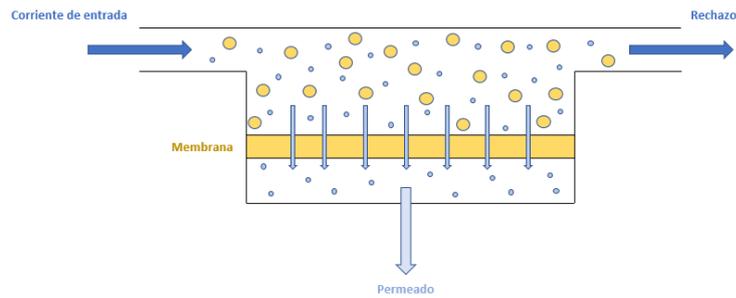


Figura 1: Esquema de funcionamiento de la filtración tangencial

Las membranas que emplean un gradiente de presión entre la corriente de entrada y el permeado como fuerza impulsora se clasifican, según su tamaño de poro en: Microfiltración (MF), Ultrafiltración (UF), Nanofiltración (NF) y Osmosis Inversa (OI).

Tabla 1: Clasificación de los distintos procesos de membrana

Tipo de filtración	Tamaño de poro	Contaminantes eliminados	Presión de operación
MF	0,1 - 10 μm	Sólidos suspendidos, bacterias, protozoos	0,1 - 2 bar
UF	0,003 - 0,1 μm	Coloides, proteínas, polisacáridos, bacterias, virus	1 - 5 bar
NF	< 0,001 μm	Virus, materia orgánica, iones multivalentes	5 - 20 bar
OI	< 0,0001 μm	Impurezas, iones monovalentes	10 - 100 bar

La microfiltración y ultrafiltración son considerados procesos de membrana a baja presión. La UF retienen moléculas como coloides, proteínas y azúcares (Mulder, 2012).

Las membranas de Microfiltración (MF) y Ultrafiltración (UF) son las utilizadas en los reactores biológicos de membranas (MBR).

1.5. Reactores de Membrana

La tecnología de los reactores de membranas combina el tratamiento biológico de aguas residuales con un sistema de membranas de ultrafiltración o microfiltración (Judd & Judd, 2011).

En el tratamiento de aguas residuales, la tecnología de membranas estaba limitada a tratamientos de afino o sistemas terciarios. Estos se aplicaban exclusivamente en los casos en que los requerimientos de vertido eran muy rigurosos o donde se pretendía reutilizar el agua depurada, ya que la tecnología de membranas tenía un alto coste de inversión y operación. El desarrollo de módulos de membrana menos costosos y más eficientes ha permitido la aplicación de los procesos de membrana al tratamiento secundario de aguas residuales.

El proceso MBR es un proceso donde la membrana actúa de barrera física entre la biomasa presente en la zona de tratamiento y el agua tratada. La acción de la membrana garantiza un efluente de gran calidad, cumpliendo los requisitos necesarios para su reutilización debido a la retención de sólidos en suspensión, coloides, bacterias y gran parte de virus.

El agua filtrada, denominada permeado, constituye el agua tratada, mientras que el rechazo de la membrana, la biomasa, permanece en el reactor formando el licor mezcla. Una vez se ha alcanzado la concentración máxima de sólidos en el licor mezcla, se realiza la purga del reactor para mantener el régimen estacionario de operación.

El principal problema de los procesos MBR reside en el ensuciamiento de las membranas durante la filtración, inconveniente que todavía está pendiente de resolver, debido a los mecanismos que se dan son muy complejos (Meng *et al.*, 2017) y que se explica con más detalles en el siguiente apartado.

Las principales ventajas que presentan los procesos de membrana en comparación con otros procesos biológicos son las siguientes:

- *Mayor calidad del agua tratada:* Este sistema permite tratar el agua biológicamente y por medio de las membranas retener los sólidos suspendidos, bacterias y algunos virus dentro del biorreactor, proporcionando un efluente de alta calidad.
- *Flexibilidad de operación:* La sustitución de un decantador por un módulo de membranas para la separación de la fracción sedimentable permite que en los MBR el tiempo de retención celular se pueda manejar independientemente del tiempo de retención hidráulico, permitiendo un control óptimo de los procesos biológicos y una mayor fiabilidad y flexibilidad de uso.
- *Tamaño compacto de la planta:* Ahorro importante de espacio debido a la sustitución del decantador y el tratamiento terciario por un módulo de membranas, alcanzando unos niveles de calidad similares a los sistemas convencionales.

- *Capacidad de ampliación:* La tecnología MBR es modular y permite la ampliación de la planta para adaptarse a las necesidades.
- *Fiabilidad del proceso:* La calidad del efluente de un MBR no depende de las variaciones de caudal o carga contaminante que pueden afectar negativamente a la calidad del efluente en el proceso convencional.

Sin embargo, los procesos MBR también ofrecen algunas desventajas:

- *Costes:* Una de las principales limitaciones que ofrece la tecnología MBR es de carácter económico, ya que requiere una inversión inicial importante debido al elevado precio de las membranas, el gasto energético asociado a las elevadas presiones necesarias para la operación del sistema y los gastos asociados a la limpieza de las membranas.
- *Ensuciamiento de membranas:* La acumulación de partículas en las membranas es uno de los principales inconvenientes encontrados, tanto a nivel operacional como de costes (Judd & Judd, 2011). El *fouling* reduce el flujo de permeado, por lo que este se debe limpiar para restaurar sus características, aumentando los costes operacionales, además, con el tiempo las membranas no se recuperan con la limpieza y deben sustituirse. Este fenómeno se explicará con más detalle en el apartado 1.5.
- *Acumulación en el biorreactor de compuestos inorgánicos no filtrables:* Posible acumulación de compuestos inorgánicos no filtrables que a determinadas concentraciones pueden ser dañinos para la población presente en los reactores.

Los biorreactores de membrana están compuestos por dos partes principales, la unidad de tratamiento biológico y el módulo de membranas. Existen diferentes configuraciones, dependiendo de la ubicación de las membranas y la tecnología utilizada para crear el gradiente de presión que constituye la fuerza impulsora del proceso de filtración.

- *Biorreactores de membrana sumergida:* En esta configuración, la membrana está inmersa el reactor biológico. La fuerza impulsora se alcanza presurizando el reactor o creando una presión negativa en el lado del permeado mediante la aspiración a través de la membrana.
- *Biorreactores con membrana externa:* Esta configuración consiste en la recirculación del licor mezcla hasta la unidad de membranas, situada en el exterior del reactor biológico. La fuerza impulsora es la presión creada por el bombeo hacia el módulo.

En el caso que nos ocupa, la planta piloto que ha sido objeto de estudio dispone de dos reactores de membranas:

- *Reactor Anaerobio de Membranas (AnMBR):* En este reactor se combina el proceso anaerobio de degradación de la materia orgánica con el sistema de separación por membranas. Este sistema no precisa aporte de oxígeno, lo que permite la reducción de costes energéticos, así como permite el almacenamiento y recolección del biogás producido debido a la hermeticidad del sistema. Este tipo de sistemas permiten

obtener tiempos de retención celular lo suficientemente elevados para el completo desarrollo de la biomasa anaerobia, gracias a la gran capacidad de retención de sólidos que presentan las membranas, evitando también los problemas de sedimentabilidad de los fangos anaerobios.

El tratamiento de aguas residuales por vía anaerobia es un proceso a partir del cual la materia orgánica compleja es degradada a compuestos sencillos sin necesidad de un aceptor externo de electrones, como pueden ser el nitrato o el oxígeno, a diferencia de los tratamientos aerobios o anóxicos. Este proceso transforma la materia orgánica en metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂).

Las principales ventajas que presenta el uso de la tecnología AnMBR, además de las comunes a cualquier reactor de membranas citadas anteriormente, son las siguientes:

- Reduce la problemática asociada a la decantación de los fangos anaerobios.
- No existe consumo energético por aporte de oxígeno al sistema.
- Se obtiene una corriente de biogás, lo que supone la recuperación energética de los contaminantes del agua residual.
- Presenta una alta capacidad de eliminación para los sustratos lentamente biodegradables.
- Presenta una baja producción de fangos en comparación con los procesos aerobios, aproximadamente una producción entre 5 y 10 veces menor.
- Los fangos obtenidos están estabilizados y puede ser aprovechados como fertilizantes.

El principal inconveniente de los AnMBR es no poder eliminar nutrientes, por ello su efluente se trata en un fotobiorreactor de cultivo de microalgas.

- *Fotobiorreactor de membranas (MPBR)*: En segundo lugar, se dispone un fotobiorreactor de membranas para la eliminación de los nutrientes del agua residual tratada anaerobiamente, que sirve de alimento a este. Esta tecnología se considera adecuada debido a la capacidad de las microalgas para la eliminación de nutrientes, así como la generación de cantidad significativa de materia orgánica que aumenta la producción de biogás.

La tecnología de membranas se implementa en un fotobiorreactor (PBR) de cultivo de microalgas combinado con la tecnología de filtración por membranas, dando lugar a un MPBR. Los MPBR están diseñados para mejorar el acceso de la luz y ofrecer unas condiciones favorables para el crecimiento de las algas, como un mezclado eficiente, fuentes de carbono accesible y desgasificación bajo estrés hidrodinámico, así como disminuyen los costes de construcción y operación (Alcantara *et al.*, 2015).

La utilización de una membrana tiene como objetivo proporcionar la retención completa de células de microalgas, abordando así el problema del lavado de la biomasa y permitiendo un control separado del tiempo de retención celular (TRC) y el

tiempo de retención hidráulico (TRH) (*Honda et al., 2012*). El desacoplamiento de TRC y TRH permite que los MPBR produzcan concentraciones de biomasa 3,5 veces mayores que los PBR (*Marbelia et al., 2014*), por lo tanto, implican una mayor productividad de biomasa, mayor eficiencia en la eliminación de nutrientes y un menor requerimiento de espacio (*Bilad et al., 2014*).

Al igual que los MBR, los MPBR están sujetos a incrustaciones de membrana durante la operación, éstas suelen desarrollarse debido a las células de microalgas, materia orgánica derivada de células de microalgas como de bacterias, productos microbiológicos solubles (SMP) y sustancias inorgánicas que tienden a acumularse en la superficie de la membrana y dentro de los poros de la membrana (*Low et al., 2016*).

1.6. Ensuciamiento de membranas (*Fouling*)

El principal problema de los procesos de membrana es el ensuciamiento o *fouling*, este provoca un descenso del flujo de permeado. El *fouling* consiste en la adsorción y deposición, de diferentes elementos presentes en el agua sobre la membrana, debido a la interacción fisicoquímica de estos elementos con la membrana. Dependiendo de los grupos funcionales que forman las moléculas, las interacciones puede ser de tres tipos (Lujan-Facundo, 2016):

- *Fuerzas de Van der Waals*: Son fuerzas de estabilización molecular. Forman un enlace químico no covalente en el que participan dos tipos de fuerzas o interacciones, las fuerzas de dispersión (atracción) y las fuerzas de repulsión, entre las capas electrónicas de dos átomos contiguos.
- *Fuerzas de atracción electrostática*: Basadas en la ley de Coulomb, son fuerzas eléctricas que se producen cuando interactúan dos cargas puntuales en reposo, su magnitud es directamente proporcional al producto de la magnitud de ambas cargas e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa.
- *Adhesión por enlace químico*: Es una propiedad de la materia por la cual se unen dos superficies de sustancias cuando entran en contacto y se mantienen unidas por fuerzas intermoleculares, produciéndose enlaces iónicos, covalentes o enlaces de hidrógeno.

Las consecuencias del *fouling* son la reducción del flujo de permeado e incremento del gasto energético asociado a este, ya que para mantener el flujo de permeado constante se ha de aplicar una mayor presión (Drews et al., 2006).

Es por ello por lo que, uno de los retos más importantes que afronta la utilización de membranas es minimizar cualquier tipo de contaminación que pueda afectar a las membranas, principalmente las incrustaciones permanentes, las cuales van a determinar la vida útil de las membranas (Patsios y Karabelas, 2011). Por lo tanto, es necesario determinar qué condiciones de filtración son las más adecuadas para optimizar el diseño y la configuración del módulo de membranas (Drews, 2010).

Existen dos tipos diferenciados de *fouling*:

- *Fouling externo*: Las sustancias se depositan sobre la membrana.
- *Fouling interno*: Las sustancias taponan los poros del interior de la membrana

El *fouling externo* se elimina fácilmente mediante mecanismos de limpieza físicos, mientras que el *fouling interno* conlleva mecanismos más complejos de limpieza química agresiva e incluso la sustitución de las membranas (Smith et al., 2006; Lee et al., 2001).

Los mecanismos que originan el ensuciamiento de las membranas son:

- *Precipitación sobre la superficie de la membrana*: Precipitación de partículas sobre la superficie de la membrana, de manera que los poros quedan tapados (Figura 2a).

- *Obtención de poros:* Puede ocurrir que una partícula quede atrapada a lo largo del poro, impidiendo el paso (Figura 2b).
- *Constricción del poro por adsorción en las paredes:* Adsorción de partículas que causan la reducción efectiva del tamaño del poro, reduciendo el flujo permeado (Figura 2c).
- *Obtención del poro por un agregado:* Obturación del poro por acción de un agregado de partículas (Figura 2d).

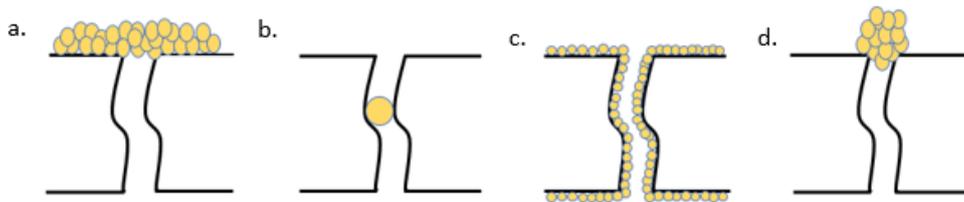


Figura 2: Ensuciamiento por bloqueo de poro: a) precipitación, b) obturación del poro, c) constricción del poro y d) formación de agregado

Otro fenómeno que se produce con el ensuciamiento de las membranas es la polarización por concentración. El resultado es la creación de gradientes de concentración en el lado de alimentación de la membrana, pudiendo disminuir la eficiencia de separación de la membrana y el flujo de permeado (Mulder, 2012).

Una elevada polarización por concentración aumenta la presión de la membrana en el lado de la alimentación, contribuyendo a disminuir el flujo de permeado. (Cheryan, 1998).

Este fenómeno depende de las condiciones de operación y no del tiempo de utilización de la membrana. La manera más sencilla de evitar la polarización es aumentar la velocidad tangencial de paso de la alimentación, de modo que las turbulencias generadas arrastren las sustancias depositadas en la superficie de la membrana.

Además, el ensuciamiento de la membrana puede ser causado por precipitación de compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos de alto peso molecular (Lin et al., 2009) o ensuciamiento biológico o *biofouling* (crecimiento de bacterias y otros microorganismos sobre la superficie de la membrana formando una biopelícula o *biofilm*) (Sweity et al., 2011).

En el caso de la depuración biológica, los compuestos que suelen producir *biofouling* son las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), los cuales son metabolitos segregados por la biomasa o generados por lisis celular. Las EPS están formados principalmente por glúcidos y proteínas, aunque también se encuentran en su composición, ácidos nucleicos, lípidos, ácidos húmicos y otros compuestos poliméricos (Wingender et al., 1999), estas forman una matriz tridimensional que actúa como mecanismo de unión entre los constituyentes del flóculo, mediante fuerzas electrostáticas (Nouha et al., 2018). La composición y origen de las EPS se explican con más detalle en el siguiente apartado.

Por último, existen diversos tratamientos para minimizar o eliminar el ensuciamiento de la membrana, reduciendo de esta manera los costes de mantenimiento y operación, se pueden dividir en métodos físicos y químicos (Zsirai *et al.*, 2012):

- Métodos físicos:
 - *Contralavado (Backflushing)*: Consiste en la inversión de flujo de permeado para eliminar las sustancias depositadas en la membrana. Dependiendo de la frecuencia e intensidad de esta inversión se pueden encontrar tres tipos:
 - ♦ *Backwash*: Se invierte el flujo de paso por la membrana durante uno o dos segundos cada pocos minutos.
 - ♦ *Backpulse*: Se realiza con una frecuencia e intensidad mayor que el backwash.
 - ♦ *Backshock*: Es la técnica más agresiva, ya que invierte el flujo cada pocos segundos durante menos de un segundo.
 - Creación de turbulencia: Con el objetivo de provocar una alta turbulencia en las proximidades de la superficie filtrante se introduce de un flujo de aire bajo de cada módulo de membranas en forma de burbuja gruesa.
 - Relajación: Cada ciclo de filtración consta de un período de producción seguido de una relajación un período de contrapulsación, que ayuda a mantener la membrana limpia.
- Métodos químicos:
 - Limpieza química: Consiste en el lavado de la membrana con diferentes productos químicos, principalmente hipoclorito sódico. En caso de pérdida de flujo por precipitación de sales se recurre a una limpieza ácida. Con este método se restituye casi completamente la membrana, pero un uso demasiado frecuente puede perjudicar a la membrana, reduciendo su vida útil, además de poder contaminar el agua.

1.7. Sustancias Poliméricas Extracelulares

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) engloban polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos, ácidos húmicos y cualquier otra sustancia polimérica que se encuentra dentro o fuera de la pared celular de microorganismos unicelulares (*Wingender et al.*, 1999). Las EPS engloban, por tanto, los productos solubles microbianos (SMP), así como los productos que están en el interior de la pared (eEPS).

Las EPS son principalmente secreciones por parte de microorganismos de alto peso molecular y los productos de lisis celular e hidrólisis de macromoléculas. Cuando se liberan al medio algunos compuestos presentes en las aguas residuales pueden ser adsorbidos por la matriz de las EPS, entre ellos metales pesados o contaminantes orgánicos (*Liu & Fang*, 2003).

Las eEPS están fuertemente unidas a la célula, se encuentran en la superficie de la membrana celular y se obtienen tras someter la muestra a un proceso de extracción. La extracción debe ser moderada, ya que si esta es agresiva puede llegar a producirse la ruptura de la membrana celular extrayéndose, además, otros productos que interferirían en las medidas de proteínas y glúcidos. Los SMP se generan debido a procesos de hidrólisis y difusión, se encuentran débilmente unidos a la célula o disueltos en la solución del licor mezcla.

Los SMP, formados principalmente por glúcidos y proteínas, se miden mediante los métodos de Dubois (1956) y el método de Lowry modificado (1951) respectivamente. El procedimiento de estos métodos se desarrolla con más detalle en los apartados 3.3 y 3.4.

La mayoría de la bibliografía existente y revisada hace referencia a las EPS estudiadas en tratamientos convencionales de fangos activados, existiendo diferentes definiciones para el término SMP. Una de las más aceptadas hace referencia al material orgánico que producen los microorganismos durante el crecimiento y la descomposición endógena (*Barker & Stuckey*, 1999). Otros autores afirman que los SMP resultan de productos intermedios o productos finales de la degradación del sustrato y descomposición celular endógena (*Boero et al.*, 1991) o también se define como el conjunto de compuesto orgánicos que resultan del metabolismo del sustrato (generalmente asociado al crecimiento de biomasa) y la descomposición de la biomasa durante la mineralización completa de sustrato simples (*Noguera et al.*, 1994).

Chudoba (1985) clasificó los compuestos orgánicos producidos por microorganismos en tratamientos de fangos activados en tres categorías:

- Compuestos segregados por microorganismos debido a su interacción con el medio.
- Compuestos producidos como resultado del metabolismo del sustrato y el crecimiento bacteriano.
- Compuestos liberados durante la lisis y degradación de microorganismos.

Namkung y Rittman (1986) agruparon los SMP en dos categorías diferentes basadas en la fase bacteriana de la cual derivan:

- UAP (Utilisation Associated Products), son SMP asociados con el metabolismo del sustrato y el crecimiento de la biomasa, se producen a una velocidad proporcional a la tasa de utilización del sustrato.
- BAP (Biomass Associated Products), son SMP asociados a la descomposición de la biomasa y se producen a una tasa proporcional a la concentración de biomasa.

Otros autores han incluido otros factores como causa de la producción de SMP, entre ellos encontramos la producción de SMP como alivio del estrés ambiental, como cambios extremos de temperatura (*Smeaton & Elliot, 1967*) o como respuesta a sustancias tóxicas presentes en el medio (*Kuo, 1993*). *Barker & Stuckey (1999)* establecen que la producción y liberación de SMP está relacionada con la biomasa presente en el reactor, mayor concentración de biomasa conduce a mayor concentración de SMP.

En estudios realizados en cianobacterias se observó como la formación de colonias se produce a través de la cohesión de células individuales dentro de una capa viscosa, sin estructura, llamada mucílago (*Kessel & Eloff, 1975*), formado principalmente por un polisacárido extracelular (*Plude et al., 1991*). Cuando se induce la formación de colonias en un cultivo aumenta el contenido en EPS, principalmente en SMP, tanto para un cultivo de cianobacterias (*Yang et al., 2008*) como en microalgas (*Yang et al., 2010*). Algunos de los factores que influyen en la formación de colonias y, por tanto, en la producción y liberación de SMP al medio son la concentración de nutrientes (*Yang & Kong, 2013*), la temperatura e intensidad de luz (*Li et al., 2013*), como estrategia de defensa contra la depredación por parte del zooplancton (*Yang et al., 2008*), estimulación por parte de bacteria heterotróficas (*Shen et al., 2011*) y la presencia de metales pesados (*Bi et al., 2013*).

Según algunos estudios realizados sobre la producción de SMP en cultivos de microalgas se observó cómo la alta densidad celular en el cultivo conduce a la producción de autosombreado y la acumulación de sustancias inhibitorias (*Fogg, 1975; Darley, 1982*).

Por lo tanto, las EPS, tanto eEPS y SMP, son producidas y liberadas por los distintos organismos que pueden estar involucrados en los diferentes procesos de tratamiento de aguas residuales.

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es el estudio de la producción de SMP en un cultivo de microalgas para el tratamiento del efluente de un AnMBR bajo diferentes condiciones. El estudio de la producción de estas sustancias es importante para garantizar el proceso de tratamiento de aguas residuales en cultivos de microalgas, así como para mejorar el proceso de filtración de este. Para ello se han llevado a cabo diversos experimentos a escala laboratorio, así como la monitorización de la concentración de SMP (glúcidos y proteínas) de una planta piloto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) para determinar patrones de comportamiento en la producción de estos durante la operación de dicha planta.

Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Analizar el comportamiento y composición de los SMP (carbohidratos y proteínas) en los montajes experimentales a escala de laboratorio.
- Analizar la relación de los SMP/DQO_{sol} en los montajes experimentales a escala de laboratorio.
- Estudiar el comportamiento y composición de los SMP (carbohidratos y proteínas) en la planta piloto de cultivo de microalgas de la EDAR de la Cuenca del Carraixet.
- Estudiar la relación de los SMP/DQO_{sol} en la planta piloto de cultivo de microalgas de la EDAR de la Cuenca Del Carraixet.
- Relacionar la concentración de SMP y el rendimiento de la planta de microalgas de la Cuenca del Carraixet.
- Determinar las condiciones de operación que menos estresan el cultivo de microalgas.

3. Material y métodos

3.1. Planta piloto

Se realizó un seguimiento de la planta piloto para el cultivo de microalgas que el grupo de investigación CALAGUA explota en la EDAR de la Cuenca del Carraixet (Alboraya, Valencia). El trabajo experimental se realizó mediante la toma de muestras del licor mezcla del FBR-4 situado en esta planta en un período comprendido entre el 23-11-2017 y el 19-12-2017.

3.1.1. Funcionamiento de la planta piloto

Después de un pretratamiento y una decantación primaria, una fracción del agua bruta de entrada a la EDAR de la Cuenca del Carraixet es derivada a un Reactor Anaerobio de Membrana Sumergida (AnMBR). Tras el paso por este primer reactor, se genera un efluente del AnMBR, el cual no presenta sólidos en suspensión y tiene unas altas concentraciones de nutrientes, con valores medios de amonio de $45 \pm 5 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ y de fósforo de $4,5 \pm 0,5 \text{ mgP} \cdot \text{L}^{-1}$.

Con el objetivo de lograr la oxidación de los sulfuros, un compuesto que resulta tóxico para las microalgas (*González-Camejo et al., 2017*), a sulfatos, el efluente del AnMBR es almacenado y aireado en un tanque de regulación. El agua aireada en el depósito intermedio (DI) será el influente que alimentará al fotobiorreactor de membrana posterior (MPBR), el cual ha sido objeto de muestreo en este Trabajo Final de Máster.

El MPBR está compuesto por dos fotobiorreactores (FBR) de placa plana de metacrilato dispuestos en paralelo y un sistema de filtración por membranas. El volumen de trabajo de cada uno de los FBR es de 235 L, con dimensiones de 2 x 1.15 x 0.10 m (largo x alto x ancho). Cada uno de los FBR cuenta con un sistema de aireación en la parte inferior, a través del cual se inyecta CO_2 (99.9%) para mantener el valor del pH en torno a 7,5 evitando así la precipitación del fósforo y el stripping de amonio. Además, el sistema de aireación garantiza la agitación necesaria para la homogeneización del cultivo y evitar la sedimentación de este, así como para evitar la adhesión de las microalgas a las paredes.

Otro parámetro de control es la temperatura, esta se controla mediante un sistema de refrigeración formado por un serpentín de acero inoxidable sumergido en el cultivo, obteniendo valores medios de temperatura de $22,5 \pm 2,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los FBRs están orientados este-oeste para aprovechar la máxima irradiación solar. La cara opuesta está dotada con un sistema de iluminación artificial formado por doce lámparas LED de 40W cada una, las cuales aportan $300 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintética activa (PAR, 400 a 700 nm de longitud de onda). El sistema de iluminación permanece encendido durante las 24 horas del día.

El sistema de ultrafiltración está compuesto por un tanque de membrana de 19 L con un área de filtración de 3,4 m² y un tamaño de poro de 0,03 μm. Para mantener un funcionamiento continuo de la membrana, parte del rechazo de la filtración es recirculado, mientras se retira del sistema el volumen de permeado correspondiente para mantener un TRC de 2 días y un TRH de 1,25 días (condiciones de operación de la planta MPBR durante el periodo de seguimiento realizado en este Trabajo Final de Máster).

La purga de la planta MPBR se lleva a una co-digestión anaerobia (previa concentración de la biomasa) junto al fango de purga de la primera digestión y el procedente de la decantación primaria.

3.1.2. Toma de muestras

El período de seguimiento de la planta se realizó en los meses de noviembre y diciembre de 2017. Las muestras se tomaron tres días por semana (lunes, martes y jueves) y tres veces al día (9:00, 12:00 y 17:00 h), sumando un total de 30 muestra para el seguimiento. Para la recogida de muestras se emplearon botellas de vidrio ámbar de 500 mL para evitar procesos fotosintéticos durante el transporte de las muestras.

3.2. Montajes Experimentales

3.2.1. Inóculo y Alimento

El inóculo inicial empleado para la siembra de los reactores del laboratorio se obtuvo de la planta MPBR. El género de microalga predominante en este cultivo fue *Chlorella sp.*

El efluente del AnMBR previamente aireado (ver apartado 3.1.1.) se empleó como alimento para los reactores.

3.2.2. Diseño de Experimentos

El montaje empleado para los ensayos de laboratorio consistió en dos matraces Erlenmeyer Pyrex con un volumen de 2L, controlados por sondas de temperatura y de pH conectadas a un consort que registró datos de pH y temperatura en continuo, a lo largo de todo el experimento.

El aporte de carbono inorgánico al sistema se realizó a través de una bala de CO₂, utilizando el pH como variable de control. Se estableció el pH consigna en 7,5 (igual que en la planta MPBR). Cuando el valor del pH aumentaba por encima del valor de consigna se inyectaba un pequeño caudal de CO₂ a través de una electroválvula, conectada a una caja de relés. Se dispusieron 6 lámparas verticales LED (18W, 6000-6500 K) alrededor de los reactores como fuente de luz, aportando una intensidad media de 150 μmol·m⁻²·s⁻¹. Además, los reactores contaban con difusores y agitación magnética, permitiendo la homogeneización de nutrientes en todo el

volumen del reactor, evitando también la formación de flóculos y la sedimentación de los microorganismos presentes en el cultivo.

Por último, uno de los reactores contaba con una placa calefactora, situada bajo el reactor, que permitía el control de la temperatura, a través de una sonda conectada a la placa calefactora.

3.2.3. Purga y Alimentación

Para los experimentos realizados en continuo, se mantuvo el alimento extraído del AnMBR en nevera para evitar posibles variaciones en la composición del alimento. La purga y alimentación se realizó mediante un vaciado manual para mantener un $TRC = TRH$ que variaba en cada experimento (ver Tabla 2).

A continuación, se muestra en la tabla 2 un resumen de los experimentos realizados a escala laboratorio para conocer las condiciones de estrés que provocan una mayor producción y liberación de SMP para la especie de microalgas *Chlorella*.

Tabla 2: Tabla resumen de los experimentos realizados en el laboratorio. IT (Intervalos de Temperatura), TC (Temperatura Constante), EN (Exceso de Nutrientes), DN (Dilución de Nutrientes), CA (Con Alitiourea) y SA (Sin Alitiourea)

Experimento	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4		Exp. 5		Exp. 6	
	25°C	25°C	30°C	30°C	35°C	25°C	IT	TC	EN	DN	CA	SA
Modo de operación	Batch	Continuo	Batch	Continuo	Continuo		Continuo		Continuo		Continuo	
Duración	8 días		8 días		8 días		4 días		5 días		8 días	
Objetivo	Afección por modo de operación		Afección por modo de operación		Afección por temperatura		Afección por temperatura		Afección por nutrientes		Afección por competencia	
Inóculo	0,5 L cultivo 1,5 L alimento		0,5 L cultivo 1,5 L alimento		0,5 L cultivo 1,5 L alimento		0,5 L cultivo 1,5 L alimento		0,5 L cultivo 0,75 L alimento 0,75 L H ₂ O		0,5 L cultivo 1,5 L alimento	
Alimentación	-	-	0,66 L _{ALIMENTO} ·d ⁻¹		0,66 L _{ALIMENTO} ·d ⁻¹		0,66 L _{ALIMENTO} ·d ⁻¹		1 L _{ALIMENTO} ·d ⁻² 0,5 L _{AGUA} ·d ⁻¹		0,66 L _{ALIMENTO} ·d ⁻¹	
Concentración Alitiourea	10 mg·L ⁻¹		10 mg·L ⁻¹		10 mg·L ⁻¹		10 mg·L ⁻¹		10 mg·L ⁻¹		10 mg·L ⁻¹ -	
N-NH₄⁺ inicial (mg·L⁻¹)	22,48	37,61	22,48	37,61	56,40		40,71		47,4		26,29	
P-PO₄³⁻ inicial (mg·L⁻¹)	1,96	2,54	1,96	2,54	3,70		1,87		3,52		1,62	

3.3. Determinación de Glúcidos

El contenido total de glúcidos presentes en una muestra puede ser determinado en forma de azúcares simples, ya que, tanto oligosacáridos como polisacáridos, pueden simplificarse en monosacáridos a partir de una hidrólisis ácida (*Dubois et al.* 1956).

La metodología empleada para la determinación del contenido total de glúcidos en las muestras analizadas es el método de Dubois (*Dubois et al.* 1956). El fenol, en presencia de ácido sulfúrico, puede usarse para la determinación colorimétrica cuantitativa de azúcares y sus derivados metílicos, oligosacáridos y polisacáridos.

El procedimiento consiste en, tras filtrar la muestra por 0,45 μm para obtener la fracción soluble, adicionar 2 mL de la muestra a 5 mL de ácidos sulfúrico al 95,5% para producir la hidrólisis ácida de todos los oligosacáridos y polisacáridos, transformando estos en monosacáridos. Por último, se añaden 50 μL de fenol, produciendo el característico color amarillo de este método. Tras 20 minutos, se mide la absorbancia de las muestras a 480nm.

Para conocer la concentración de glúcidos presente en la solución de estudio se establece una recta de calibrado a partir de muestras patrón de concentración conocida. La relación entre concentración y absorbancia de las muestras patrón permite determinar la concentración presente en la solución de estudio.

3.4. Determinación de Proteínas

Para determinar la concentración total de proteínas presente se utiliza el método de Lowry (*Lowry et al.* 1951) modificado por Peterson (1977).

Este método consta de dos etapas:

1. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de las proteínas, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina, participes en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en la solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
2. Consiste en la reducción, también en medio básico, del reactivo Folin&Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina. El cobre actúa como catalizador. El principal constituyente del reactivo Folin&Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por grupos fenólicos da lugar a un complejo de color púrpura.

El procedimiento se realizó a partir de un Kit de la marca Sigma-Aldrich®. Para ello, tras filtrar la muestra por 0,45 μm , se añade 1 mL de la muestra en tubos de ensayo $\varnothing 16 \times 95 \text{mm}$ de plástico con 1 mL del reactivo Lowry y se deja 20 minutos a temperatura ambiente para que tenga lugar la reacción de biuret. Una vez transcurridos los 20 minutos, se añade el reactivo Folin & Ciocalteu's y se da la reducción del reactivo fenol. Tras 30 minutos, se mide la absorbancia a 750 nm.

Para conocer la concentración de proteínas presente en la solución de estudio se establece una recta de calibrado a partir de muestras patrón de concentración conocida. La relación entre concentración y absorbancia de las muestras patrón permite determinar la concentración presente en la solución de estudio.

3.5. Determinación de DQO_{sol}

Para la determinación de la DQO se empleó el método simplificado del dicromato (*Crespi et al.* 1986). Se trata de una técnica colorimétrica permite conocer la cantidad de materia orgánica presente en una disolución. En primer lugar, se deberá filtrar la muestra con membranas de policarbonato de 0,45 μm .

La digestión se realiza en tubos de vidrio, provistos de tapón roscado con junta de teflón. En cada tubo de digestión se introducen 2,5 mL de la muestra que se desea analizar, 5 mL de la solución ácido sulfúrico-sulfato de plata ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-AgSO}_4$) y 1,5 mL de solución HgSO_4 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Una vez se han preparado las muestras se mantienen durante 2 horas en un bloque digestor a 150 °C. Tras la digestión y una vez enfriados los tubos a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 446 nm.

Para conocer la concentración de DQO_{sol} presente en la solución de estudio se establece una recta de calibrado a partir de muestras patrón de concentración conocida. La relación entre concentración y absorbancia de las muestras patrón permite determinar la concentración presente en la solución de estudio.

3.6. Determinación de Ácidos Grasos Volátiles

Se ha utilizado el método de valoración ácido-base en 5 puntos para la determinación de la concentración de ácidos volátiles de cadena corta y alcalinidad (*Moosbrugger et al.* 1992).

El procedimiento consiste en la valoración con HCl 0,1N de la muestra filtrada. Se determinan los volúmenes de valorante necesarios para alcanzar los puntos de pH 6,70, 5,90, 5,20 y 4,30 sucesivamente. Esto se realiza de manera automática mediante el equipo Methom 716 DMS Titrino. La concentración de los ácidos volátiles y de la alcalinidad de la muestra se calcula mediante un programa informático, basado en el equilibrio químico de las especies involucradas, tomando en cuenta, no sólo los AGV y los carbonatos, sino también los fosfatos, el amonio y los sulfuros.

3.7. Determinación de Nutrientes

Para la determinación de la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+), nitrito (N-NO_2^-), nitrato (N-NO_3^-) y fosfato (P-PO_4^{3-}), se ha empleado la metodología propuesta en el *Standard Methods* (APHA, AWWA, WEF, 2012). Los métodos seguidos en la determinación de estos nutrientes son los siguientes:

- Amonio: Método conforme con US EPA 350.1 y Standard Methods 4500-NH₃-G.
- Nitrito: Método conforme con US EPA 354.1 y Standard Methods 4500-NO₂-B.
- Nitrato: Método conforme con Standard Methods 4500-NO₃-H.
- Fosfato: Método conforme con US EPA 365.1 y Standard Methods 4500-P-F.

Estos procedimientos se han implementado en un analizador automático multiparamétrico selectivo (*Smartchem450* de AMS-Alliance).

3.8. Determinación de la Densidad Óptica

La densidad óptica se midió mediante un espectrofotómetro a 680 nm, ya que la longitud de onda dentro del rango máximo de absorbancia de la clorofila se encuentra entre 400-460 nm y 650-680 nm, recomendando 680 nm para *Chlorella sp* (Griffiths et al. 2011).

La medida de la densidad óptica se empleó para relacionarla con la concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) presentes en los cultivos (Pachés et al., 2018) .

3.9. Determinación de los Sólidos Suspendidos Totales y Volátiles

La determinación de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos totales volátiles (SSTV) se ha realizado mediante el método gravimétrico propuesto por el *Standard Methods* (APHA, AWWA, WEF, 2012), método 2540-D.

La metodología de determinación de sólidos suspendidos totales consiste en filtrar un volumen conocido de muestra con un filtro de policarbonato de 0,45 μm y proceder a la eliminación de la humedad de los sólidos retenidos en el filtro tras secar este a 105°C en una estufa. La diferencia de peso del filtro antes y después del filtrado representa la cantidad de sólidos que había contenido en el volumen filtrado.

Para la determinación de sólidos suspendidos volátiles se emplea la calcinación de los sólidos suspendidos totales a 550°C, la pérdida de peso corresponde a los sólidos suspendidos totales volátiles.

4. Resultados y discusión

4.1. Experimentos con condiciones controladas

En este apartado se van a analizar los resultados obtenidos en los experimentos realizados a escala de laboratorio. En ellos se ha analizado el posible estrés de un cultivo de microalgas de la especie *Chlorella sp.* debido a:

- i) Modo de operación.
- ii) Temperatura.
- iii) Concentración de nutrientes.
- iv) Competencia con bacterias amonioxidantes (AOB).

4.1.1. Influencia del modo de operación.

A continuación, se muestran y analizan los resultados obtenidos en los experimentos realizados en el laboratorio para estudiar el efecto del modo de operación sobre la producción de productos microbiológicos solubles (SMP), tanto glúcidos como proteínas.

- Experimento 1 (25°C en batch y en continuo para la especie *Chlorella*)

En la figura 3 se muestra la evolución de $SMP_{Glúcidos}$ en dos experimentos realizados a 25°C, pero con modos de operación distintos, uno trabajando en batch (izquierda) y otro en continuo (derecha), con un T.R. C. aproximado de 3 días.

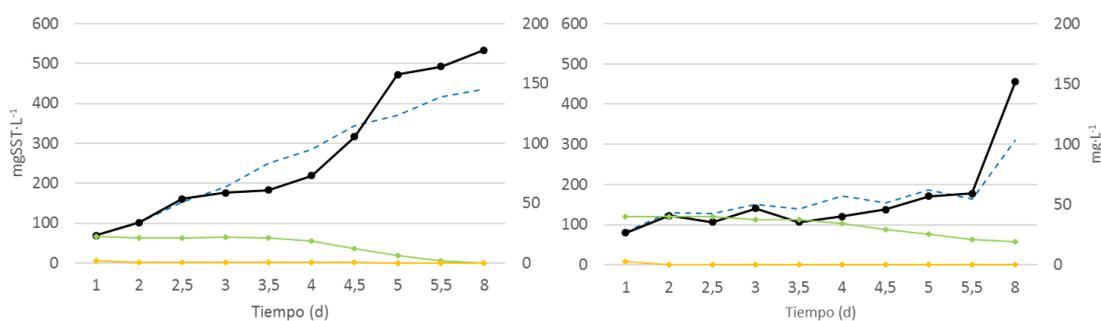


Figura 3: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo).
SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

En la figura 4 se muestra la evolución de $SMP_{Glúcidos}$, normalizado respecto a la biomasa, de ahora en adelante $SMP_{Glu,NOR}$, para los mismos experimentos.

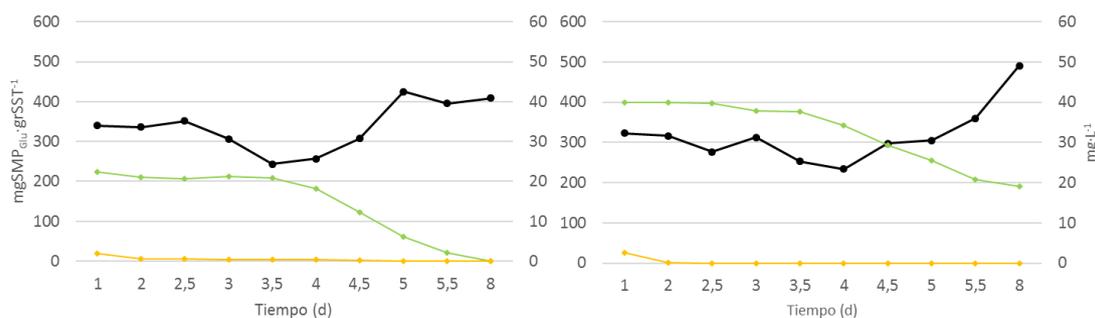


Figura 4: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo). SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

En la figura 3 se observa como el valor máximo de biomasa alcanzado para el experimento en batch fue de $400 \text{ mgSST} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que para el experimento funcionando en continuo fue de $200 \text{ mgSST} \cdot \text{L}^{-1}$. Esta diferencia en la producción de biomasa se debe a los distintos modos de operación de los reactores, ya que en el reactor en batch, la biomasa generada se fue acumulando, mientras que en el reactor funcionando en continuo se purgó, por lo que se extrajo parte de la biomasa del sistema.

En ambos casos, el fosfato se agotó al tercer día, mientras que el amonio se agotó en batch, pero no en continuo (figura 3).

Respecto a los valores de $SMP_{Glúcidos}$, se observa cómo la concentración aumentó a lo largo de todo el experimento en el caso de operar en batch. Durante los primeros días de experimento, el incremento de $SMP_{Glúcidos}$ siguió una tendencia constante debido a la interacción del cultivo con el medio, así como al crecimiento y degradación de la biomasa. Una vez se alcanzó una concentración de biomasa cercana a los $300 \text{ mgSST} \cdot \text{L}^{-1}$, coincidiendo con el descenso de la concentración de nitrógeno amoniacal, cambió la tendencia, observándose un incremento más rápido. Sin embargo, cuando la concentración de amonio bajó de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ volvió a cambiar la pendiente de crecimiento, siendo esta muy similar a la del inicio de experimento (figura 3).

En el caso del experimento en continuo, el incremento de $SMP_{Glúcidos}$ fue más paulatino, debido al lavado del reactor, éste mantuvo una evolución constante, aumentando hasta el último día.

En la figura 4 se observa como los valores de $SMP_{Glu,NOR}$ se mantuvieron aproximadamente constantes durante los primeros tres días de experimento, tanto en la operación en batch como en continuo. A partir del tercer día se produjo un descenso en torno al 30% en ambos casos. Sin embargo, en los últimos días de experimento, en ambos reactores aumentó la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$, volviendo a valores próximos al inicial en continuo y aumentando en torno al 15% en el caso del reactor operando en batch.

El experimento en batch sufrió un incremento en la producción de $SMP_{Glúcidos}$ respecto a la biomasa a partir del cuarto día, cuando la concentración de biomasa se encontraba cercana a

300 mgSST·L⁻¹ y comenzaba a descender la concentración de amonio. La producción de SMP_{Glúcidos} se estabilizó en los últimos días, cuando la concentración de amonio se encontraba por debajo de 10 mg·L⁻¹. Se ha estudiado que concentraciones inferiores a 10 - 13 mg·L⁻¹ limitan la velocidad de consumo de amonio por parte de las algas (Ruiz-Martínez *et al.*, 2014) y esto puede limitar la liberación de SMP_{Glúcidos}.

Parece ser que el funcionamiento en batch incrementa la producción y liberación de SMP_{Glúcidos}. Éste aumento podría deberse a la falta de renovación de la biomasa presente en el reactor, así como al mayor desarrollo de las microalgas. Una alta concentración de biomasa podría producir efecto de autosombreado en el reactor, que combinado con un descenso en la concentración de amonio, podría incrementar el estrés celular y propiciar el aumento de la producción y liberación de SMP_{Glúcidos}.

También se observa que cuando la concentración de amonio (NH₄⁺) se encontraba por debajo de 10 mg·L⁻¹ se redujo la velocidad de producción de SMP_{Glúcidos}. Esta estabilización en la producción podría deberse a que, ante la falta de nutrientes bajen las velocidades de crecimiento, síntesis y liberación de sustancias, ya que esto produce un gasto energético. Sin embargo, cuando no están limitadas por nutrientes (figura 4 derecha), si pueden desprenderse se sustancias bajo las mismas condiciones de estrés celular.

La estabilización de la producción y liberación de SMP_{Glúcidos} al medio bajo el estrés por falta de luz, combinada con una baja concentración de nutrientes, también pudo deberse a un cambio de metabolismo, de autótrofo a mixotrófico. Como señala Reynolds (2006) las microalgas ante la imposibilidad de obtener fuentes de energía puede modificar su metabolismo interno.

En la figura 5 se muestra la producción de SMP_{Proteínas} bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

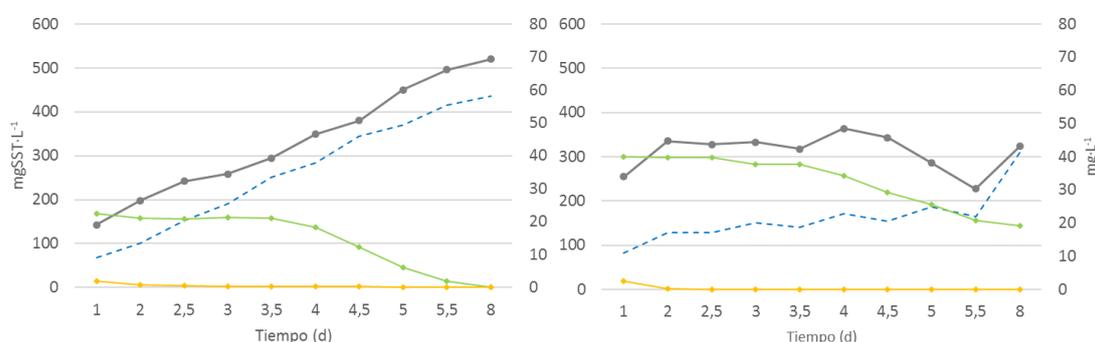


Figura 5: Evolución de la concentración de SMP_{Proteínas}, SST y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo). SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

En la figura 5 se observa cómo en el reactor funcionando en batch la producción y liberación de SMP_{Proteínas} siguió una tendencia constante de aumento a lo largo de todo el experimento.

En el caso del reactor en continuo, la concentración de $SMP_{Proteínas}$ se mantuvo en valores aproximadamente constante, debido al purgado del reactor, lo que conlleva un lavado de SMP y biomasa presentes. En los últimos días, cuando la concentración de nitrógeno amoniacal en el medio descendió, se redujo la concentración de $SMP_{Proteínas}$.

En la figura 6 se muestra la producción de $SMP_{Proteínas}$, normalizados respecto a la biomasa, de ahora en adelante $SMP_{Pro,NOR}$, para los mismos experimentos.

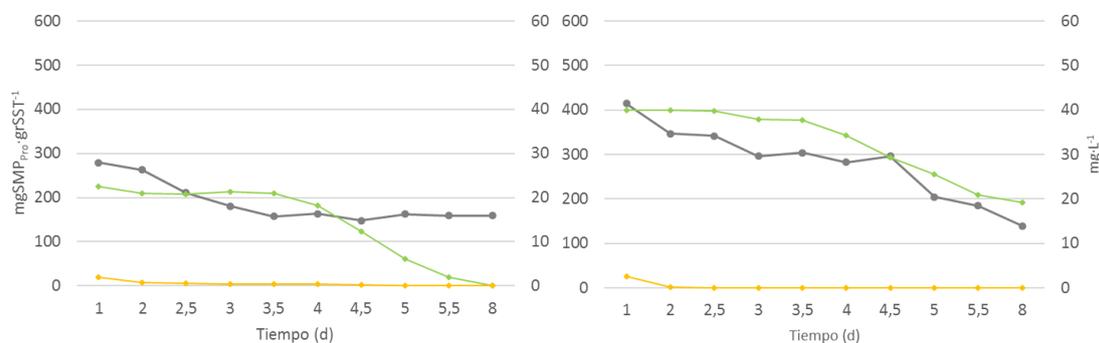


Figura 6: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo). SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

En el caso de los $SMP_{Pro,NOR}$ se observa cómo desde el primer día de experimento se produjo un descenso de la concentración, aproximadamente constante, en los dos experimentos.

La diferencia en el descenso de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ entre los dos reactores se debe a la diferencia en los modos de operación, como se ha explicado anteriormente. En el caso del reactor funcionando en batch esta reducción se vio atenuada por el hecho de no purgar el reactor, por lo que, aunque la concentración de $SMP_{Proteínas}$ aumentó, con relación a la biomasa se observó un descenso. En el reactor en continuo se observó un descenso más rápido, ya que parte de estas sustancias se eliminaron en el lavado. Debido a la menor velocidad en la síntesis y liberación de $SMP_{Proteínas}$, respecto a las sustancias glúcidas, no se equiparó la purga con la producción.

Los descensos de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ observados en la figura 6 podrían estar relacionados con el descenso en la concentración de nitrógeno amoniacal, principal fuente de nitrógeno para las microalgas en el cultivo. El nitrógeno tomado por las microalgas se emplea principalmente en la síntesis de proteínas, es por ello por lo que, la falta de este nutriente podría limitar la síntesis y liberación de proteínas al medio. Este efecto no se observa tan drásticamente como en el caso de los glúcidos debido a que las moléculas de proteínas son más complejas y su síntesis y liberación se ve prolongada en el tiempo.

Por lo tanto, los resultados mostrados, en comparación con los $SMP_{Glúcidos}$ (figura 3 y 4), parecen sugerir que a producción y liberación de $SMP_{Proteínas}$ se produce por el propio metabolismo de las células, como en el caso de los $SMP_{Glúcidos}$. Sin embargo, difieren en el comportamiento observado bajo condiciones de estrés, en el que los $SMP_{Glúcidos}$ aumentan su producción, mientras que los $SMP_{Proteínas}$ siguen la misma tendencia.

En la figura 7 se muestra la evolución de la concentración de DQO_{SOL} a lo largo de todo el periodo de estudio.

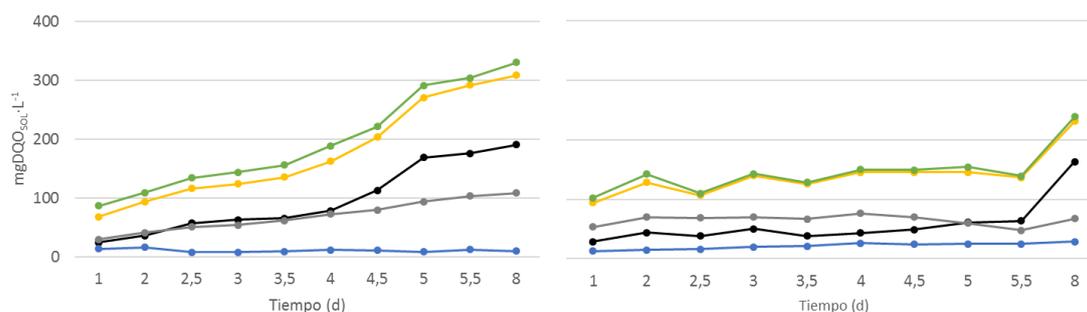


Figura 7: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} . A la izquierda (batch) y derecha (continuo). $DQO_{SOL,AGV}$ (azul), $DQO_{SOL,PRO}$ (gris), $DQO_{SOL,GLU}$ (negro), $DQO_{SOL,SUMA}$ (naranja) y $DQO_{SOL,MEDIDA}$ (verde).

Como se observa en la figura 7, la DQO_{SOL} del licor mezcla estaba formada principalmente por los SMP producidos y liberados por la biomasa presente en el cultivo, ya que la concentración de los AGV es baja. Tras un análisis de los datos obtenidos en los experimentos mediante la correlación de Pearson, se demostró una relación lineal entre concentración de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Proteínas}$ con la concentración de DQO_{SOL} (p -valor $< 0,05$).

Se debe tener en cuenta que los valores de $SMP_{Proteínas}$ y AGV en unidades de $mgDQO \cdot L^{-1}$ son una aproximación, debido a la diversidad de proteínas y ácidos existentes.

Observando esta figura se puede determinar que, en un cultivo de microalgas de estas características, en la que el influente proviene de un tratamiento anaerobio con una concentración de materia orgánica muy baja, la media de la DQO_{SOL} se puede considerar una medida indirecta de la concentración de SMP.

Además, se observa como la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Proteínas}$ siguió una tendencia muy similar a lo largo del cultivo. Sin embargo, estas dos se separaron cuando apareció un factor de estrés, en este caso, la concentración de biomasa, lo que conlleva una reducción de la intensidad de luz. Parece ser que, la segregación natural de SMP de la biomasa algal en condiciones normales, debida a su interacción con el medio, al crecimiento y degradación de la biomasa, está compuesta tanto por proteínas como por glúcidos. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, la segregación de $SMP_{Proteínas}$ sigue la misma tendencia, mientras que la de $SMP_{Glúcidos}$ aumenta. Por lo tanto, es posible que los SMP liberados bajo condiciones de estrés en el caso de la especie *Chlorella* estén formados principalmente por glúcidos, mientras que la segregación de proteínas siga una tendencia constante.

- Experimento 2 (30°C en batch y en continuo para la especie *Chlorella*)

En las figuras 8 y 9 se muestra la producción de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Glu,NOR}$ respectivamente en dos experimentos realizados a temperatura de 30°C, operando en batch (izquierda) y continuo (derecha), con un T.R.C. aproximado de 3 días.

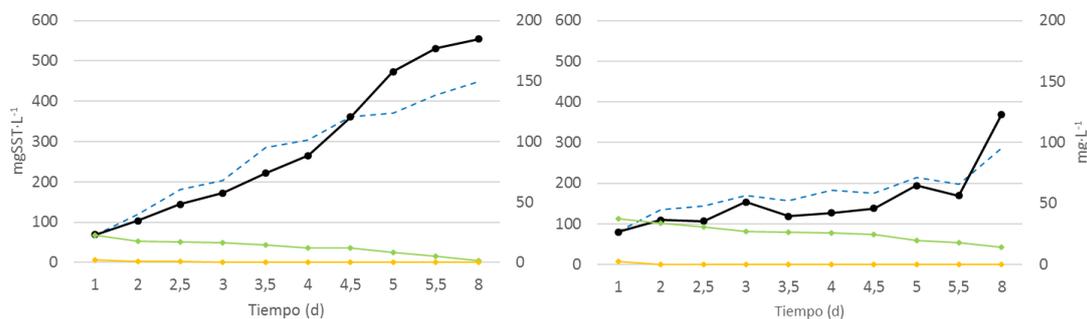


Figura 8: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo).
SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

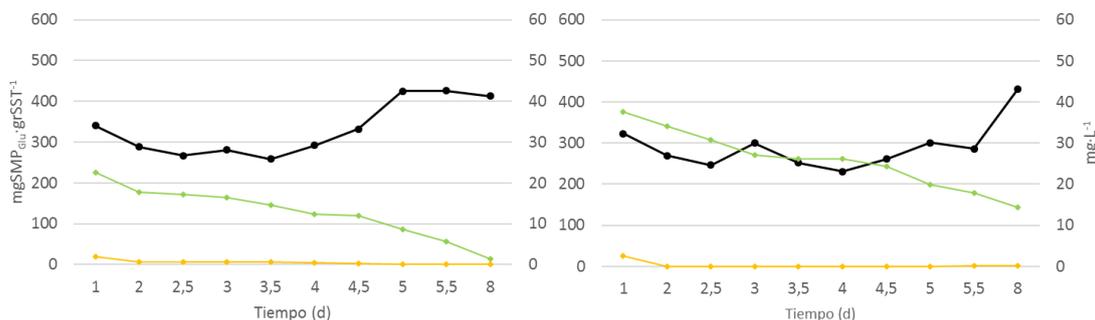


Figura 9: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo).
SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

En la figura 8 se observa cómo la concentración de biomasa medida en el reactor en batch alcanzó valores próximos a $450 \text{ mgSST} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que en continuo llegó a valores cercanos a $300 \text{ mgSST} \cdot \text{L}^{-1}$. Esta diferencia de productividad entre ambos reactores se debe a las distintas formas de operación, ya que en continuo se realizó una purga y lavado del reactor correspondiente a un TRC de 3 días.

En ambos casos, el fosfato se agotó en los primeros días de experimento, mientras que el amonio se agotó en batch, pero no en continuo.

En la figura 8 se observa cómo en el experimento en batch (figura 8 izquierda), la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ aumentó con una pendiente constante hasta el cuarto día. A partir de este día cambió, coincidiendo con un aumento de la concentración de biomasa hasta aproximadamente $300 \text{ mgSST} \cdot \text{L}^{-1}$. La tendencia de aumento cambió de nuevo, una vez comenzó a agotarse la concentración de nitrógeno amoniacal ($< 10 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$). En el caso del experimento funcionando en continuo, la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ aumentó en menor medida debido al lavado de SMP y biomasa del reactor mediante la purga de éste.

En la figura 9 se muestra la concentración de $SMP_{Gluc,NOR}$, se observa como durante los primeros días, la concentración se redujo en torno a un 25% en ambos casos. El reactor funcionando en batch aumentó su concentración a partir del cuarto día, incrementando su valor final en un 20% respecto al valor inicial medido. El aumento de la concentración de $SMP_{Gluc,NOR}$ se produjo una vez se alcanzaron concentraciones de biomasa próximas a $300 \text{ mgSST}\cdot\text{L}^{-1}$, coincidiendo con un descenso de la concentración de nutrientes. Estos valores se estabilizaron cuando la concentración de amonio bajó de $10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ en los últimos días. En el caso del experimento funcionando en continuo (figura 9 derecha) la concentración de $SMP_{Gluc,NOR}$ se mantuvo en valores aproximadamente constantes debido a la purga y lavado del reactor. Los valores constantes en el caso del funcionamiento en continuo indican que la producción de $SMP_{Glúcidos}$ respecto a la biomasa se mantiene constante bajo condiciones controladas.

Como ocurría en el experimento anterior, parece ser que la operación en batch aumenta la producción de $SMP_{Glúcidos}$ en el reactor, debido a que éste no se purga, lo que implica un acumulación de SMP y biomasa. La acumulación de biomasa implica una mayor producción y liberación de SMP por el propio metabolismo celular. El aumento observado durante el cuarto día de experimento (figura 8 izquierda), coincidió con un aumento de la biomasa y un descenso de la concentración de nutrientes. Los resultados obtenidos parecen sugerir que las altas concentraciones de biomasa propiciaron el autosombreado dentro del reactor, disminuyendo la intensidad lumínica que llegó a este y provocando un estrés celular que conllevó un aumento de la producción y liberación de SMP.

Además, el aumento en la segregación de $SMP_{Glúcidos}$ también coincidió con un descenso en la concentración de nutrientes provocando estrés sobre el cultivo. Sin embargo, cuando la concentración de amonio se redujo por debajo de $10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ la concentración de $SMP_{Gluc,NOR}$ se estabilizó. Este comportamiento coincide con lo observado en el experimento anterior.

Los comportamientos observados en este experimento son muy similares a los obtenidos en el experimento anterior, funcionando a 25°C . Estos resultados podrían indicar que el funcionamiento en batch implica una mayor producción y liberación de sustancias glúcidas al medio, debido a la acumulación de biomasa en el reactor.

En las figuras 10 y 11 se muestra la producción de $SMP_{Proteínas}$ y $SMP_{Pro,NOR}$ respectivamente en dos experimentos realizados $30^{\circ}C$.

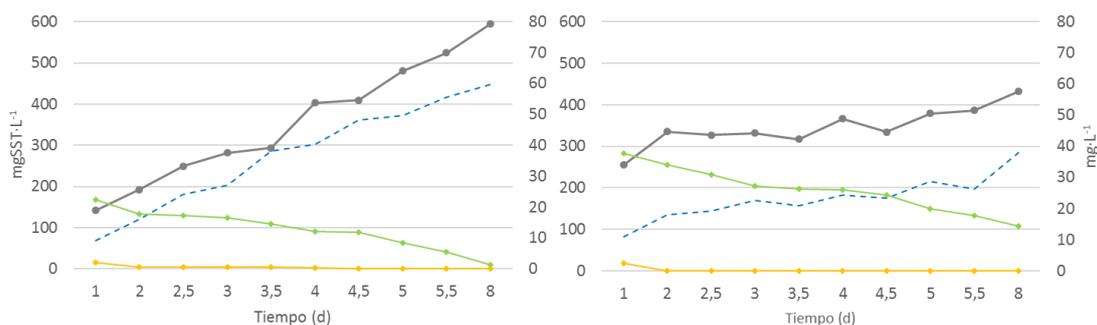


Figura 10: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo).
SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

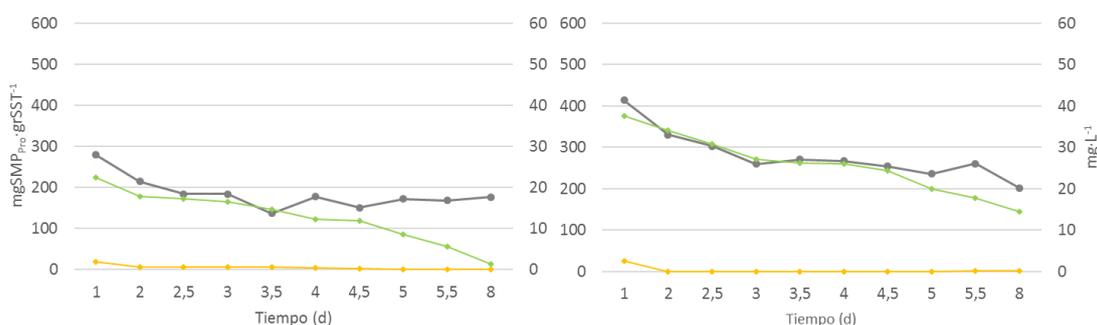


Figura 11: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (batch) y derecha (continuo).
SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

En este experimento se observa como el reactor funcionando en batch (figura 10 izquierda) siguió una tendencia de aumento constante a lo largo de todo el experimento en lo que respecta a la producción y liberación de $SMP_{Proteínas}$. Esto parece indicar que los $SMP_{Proteínas}$ no se producen en exceso y por eso su valor aumenta de forma prácticamente constante en caso de no realizarse un lavado de los reactores.

En el caso del reactor en continuo (figura 10 derecha), la concentración se mantuvo en valores aproximadamente constantes, aumentando ligeramente en los últimos días. La concentración de $SMP_{Proteínas}$ mantuvo unos valores constantes debido al lavado de SMP y biomasa presente en el reactor durante la purga de este, equiparándose la purga con la producción.

En el caso de los $SMP_{Pro,NOR}$ se observa cómo, en el experimento en batch, durante los primeros días de experimento se produjo un descenso de la concentración, manteniendo valores aproximadamente constantes durante el resto del experimento. En el experimento en continuo, la concentración se redujo durante todo el experimento.

La diferencia en el descenso de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ entre los dos reactores se debió a la diferencia en los modos de operación, como se ha explicado anteriormente. En el caso del batch, la reducción de concentración fue más paulatina por el hecho de no purgar el reactor, por lo que, aunque aumentó la concentración de $SMP_{Proteínas}$, el valor de esta frente a la biomasa presentó un descenso. El reactor en continuo presentó un descenso más rápido debido a la extracción de parte de las sustancias proteicas durante la purga y lavado del reactor. Esta extracción combinada con la reducida velocidad de síntesis y liberación de proteínas produjo que no se equiparara la purga con la producción.

Los descensos en la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ que se observan en la figura 11 podrían estar relacionados con los descensos de concentración de amonio, el cual es empleado como principal fuente de nitrógeno para las microalgas en la síntesis de proteínas. Por lo tanto, la falta de este elemento podría limitar la síntesis y liberación de proteínas en el medio.

Como se ha comentado en el experimento anterior, estos resultados parecen indicar que la síntesis y liberación de $SMP_{Proteínas}$ es propia del metabolismo celular y no se ve afectada por factores de estrés, a diferencia de lo que ocurre con los $SMP_{Glúcidos}$.

En la figura 12 se muestra la evolución de la concentración de DQO_{SOL} a lo largo de todo el periodo de estudio.

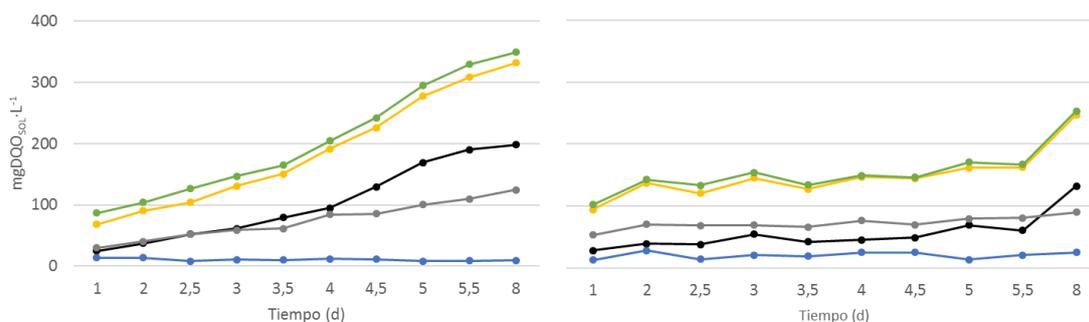


Figura 12: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} a la izquierda (batch) y derecha (continuo). $DQO_{SOL,AGV}$ (azul), $DQO_{SOL,PRO}$ (gris), $DQO_{SOL,GLU}$ (negro), $DQO_{SOL,SUMA}$ (naranja) y $DQO_{SOL, MEDIDA}$ (verde).

Como se observa en la figura 12, la DQO_{SOL} del licor mezcla está formada principalmente por los SMP producidos y liberados por la biomasa presente en el cultivo, observándose una relación lineal entre la concentración de SMP y DQO_{SOL} , por lo tanto, la media de la DQO_{SOL} se puede considerar una medida indirecta de la concentración de SMP.

Como en el experimento anterior, la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Proteínas}$ sigue una tendencia muy similar a lo largo del cultivo. Éstos se separaron cuando apareció un factor de estrés, en este caso estrés causado por altas concentraciones de biomasa en los reactores, provocando autosombreado y reduciendo la intensidad de luz en el cultivo. Por lo tanto, se vuelve a observar cómo, es posible que los SMP liberados bajo condiciones de estrés en el caso de la especie *Chlorella* estén formados principalmente por glúcidos, mientras que la segregación de proteínas se produzca exclusivamente durante el propio metabolismo.

4.1.2. Influencia de la temperatura.

- Operación en continuo a diferentes temperaturas para la especie *Chlorella*

En las figuras 13 y 14 se muestra la producción de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Glu,NOR}$ respectivamente en tres experimentos realizados a 25 (izquierda), 30 (derecha) y 35°C (abajo), trabajando en continuo, con un T.R.C. de tres días.

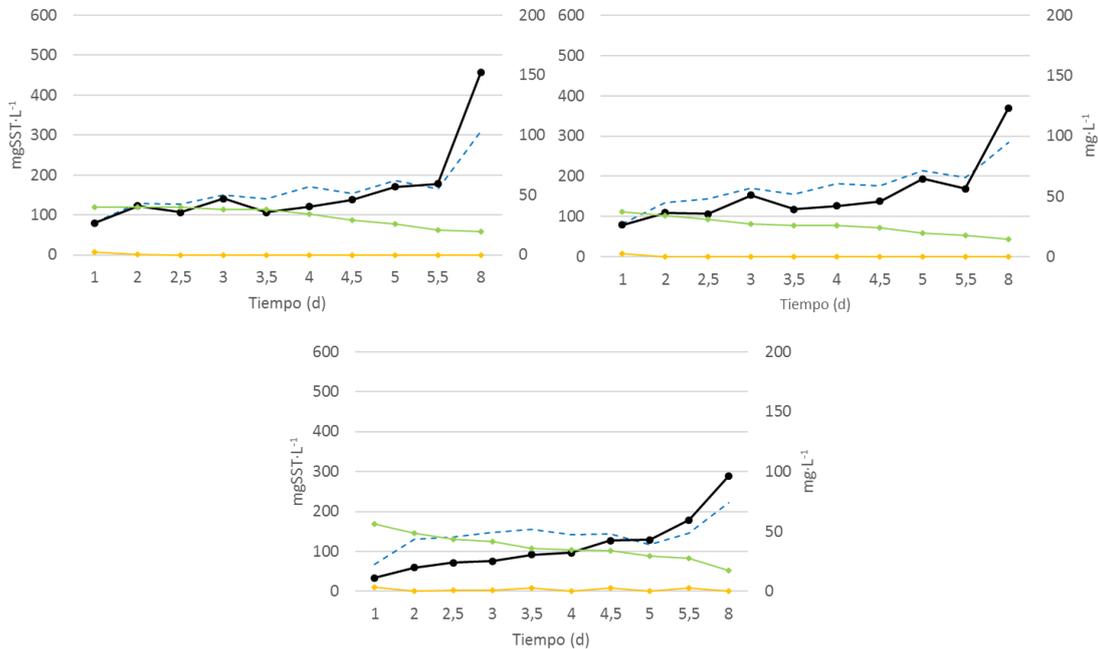


Figura 13: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes. A la izquierda arriba (25°C), derecha (30°C) y abajo (35°C). SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fósforo (amarillo).

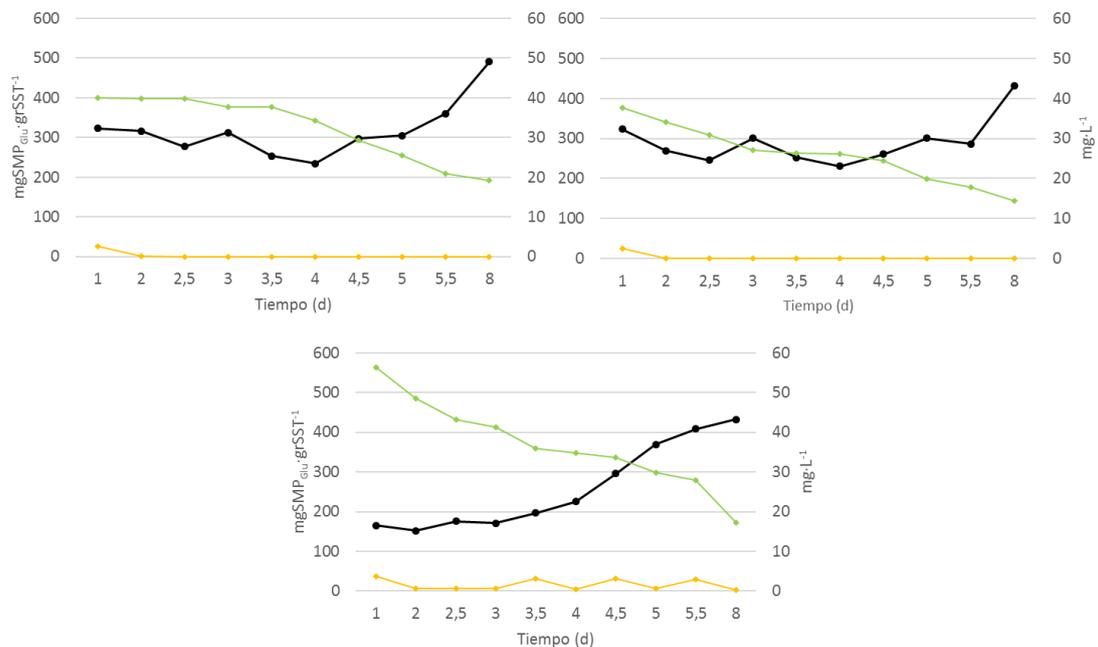


Figura 14: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda arriba (25°C), derecha (30°C) y abajo (35°C). SMP (negro), amonio (verde) y fósforo (amarillo).

Como se observa en la figura 13, las concentraciones de biomasa alcanzadas en los distintos experimentos fueron de $300 \text{ mgSST}\cdot\text{L}^{-1}$ a 25°C , $290 \text{ mgSST}\cdot\text{L}^{-1}$ a 30°C y $220 \text{ mgSST}\cdot\text{L}^{-1}$ a 35°C . La diferencia de producción se debió a las distintas concentraciones de partida, así como a la influencia de la temperatura en la productividad de la especie.

En todos los experimentos se agotó el fosfato, mientras que el amonio no se agotó en ninguno de los experimentos, llegando a valores comprendidos entre $15\text{-}20 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

En la figura 13 se observa como en los tres experimentos se produjo un aumento de la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ a lo largo de todo el experimento, alcanzando valores similares en los experimentos trabajando a 25 y 30°C . En el caso del reactor trabajando a 35°C se alcanzó un valor similar de concentración habiendo partido de un valor menor.

En la figura 14 se observa como la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glu,NOR}}$ se mantuvo aproximadamente constante en los experimentos trabajando a 25 y 30°C , manteniendo valores similares en ambos. En el caso del experimento trabajando a 35°C se observó un incremento de la concentración a lo largo de todo el experimento, observándose un cambio de tendencia en la producción a partir del cuarto día de experimento, aumentando la velocidad de producción. Se ha calculado una velocidad de producción y liberación de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ respecto a la biomasa 6 veces mayor en el caso de trabajar a 35°C respecto a 25 y 30°C .

Con los resultados obtenidos en este experimento parece ser que a temperatura de 25 y 30°C no se produjo estrés por temperatura en el cultivo, ya que no se vio incrementado la producción y liberación de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ respecto a la biomasa en ninguno de los casos. Sin embargo, en el rango óptimo superior de temperatura para el género *Chlorella sp.* ($30\text{-}35^\circ\text{C}$) (Pachés et al., 2018) parece ser que, si produjo estrés sobre el cultivo, en lo que a producción de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ se refiere.

Por el contrario, los rendimientos de eliminación de amonio fueron del 49% a 25°C , del 62% a 30°C y 70% a 35°C . Este aumento de rendimiento en el caso de trabajar a 35°C , condición que parece estresar al cultivo, incluso limitando su productividad, podría deberse a la presencia de fósforo en el reactor. Según Pachés et al. (2018) la presencia de fósforo en un cultivo de *Chlorella sp.* favorece la toma de compuestos de nitrógeno por parte de las microalgas.

En las figuras 15 y 16 se muestra la producción de $SMP_{Proteínas}$ y $SMP_{Pro,NOR}$ respectivamente en tres experimentos realizados a 25, 30 y 35°C, trabajando en continuo.

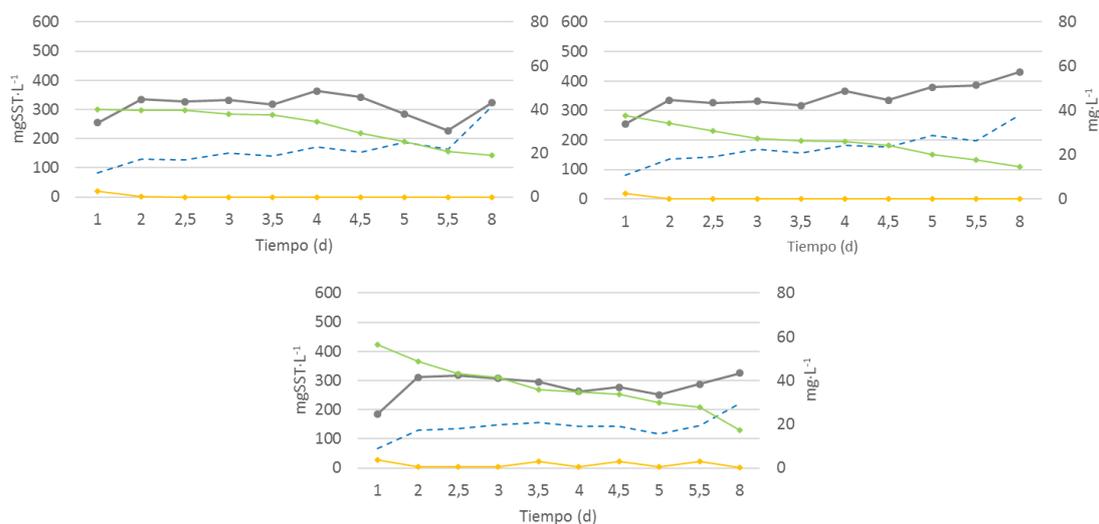


Figura 15: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes. A la izquierda (25°C), derecha (30°C) y abajo (35°C). SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fósforo (amarillo).

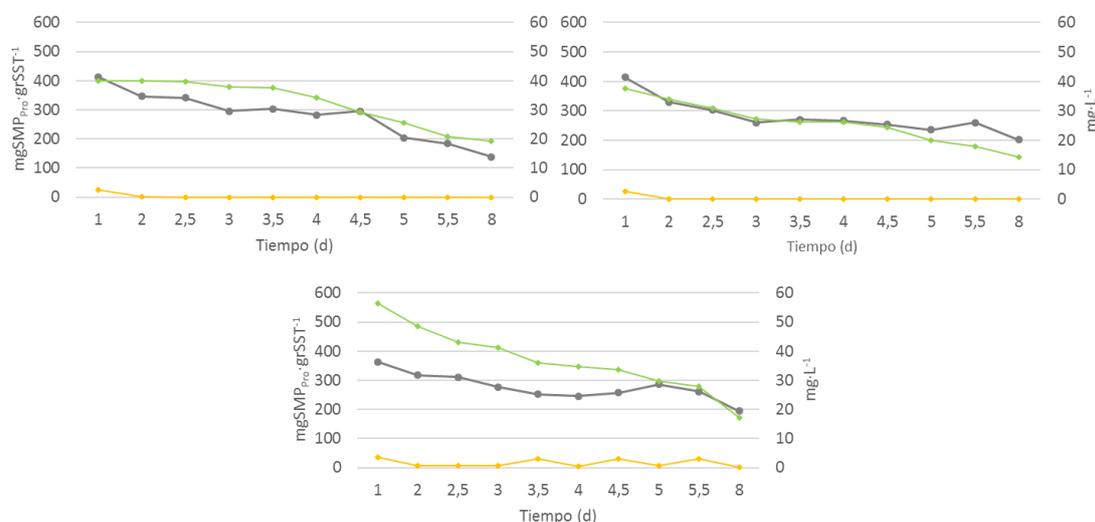


Figura 16: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (25°C), derecha (30°C) y abajo (35°C). SMP (negro), amonio (verde) y fósforo (amarillo).

En la figura 15 se observa como en los tres casos estudiados se produjo un aumento de la concentración de $SMP_{Proteínas}$ el primer día, coincidiendo con una velocidad mayor de producción de biomasa.

En la figura 16 se muestra como la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ se redujo a lo largo de todo el experimento en los tres casos estudiados. Esta reducción fue menos acusada en el caso del reactor trabajando a 35°C, mientras que a 25 y 30°C mantuvo un comportamiento similar.

Por lo tanto, durante el experimento, la concentración de sustancias proteicas se mantuvo aproximadamente constante (figura 15), esto se debió a la purga y lavado del reactor, equiparándose la purga con la producción.

Sin embargo, los $SMP_{Proteínas}$ respecto a la biomasa se redujeron, esto podría deberse a la reducción de la concentración de nitrógeno amoniacal en el medio. Éste es la principal fuente de nitrógeno de la biomasa algal y elemento principal en la síntesis de proteínas, por lo que una reducción de la concentración de nitrógeno podría limitar la segregación de sustancias proteicas al medio. En el caso del experimento a 35°C, los valores de $SMP_{Pro,NOR}$ sufrieron una menor reducción, esto podría deberse a la mayor concentración de nitrógeno amoniacal presente en el reactor, permitiendo una mayor velocidad de síntesis y liberación de proteínas.

Como en los experimentos estudiado anteriormente, se observa como la producción de $SMP_{Glúcidos}$ se produjo durante el propio metabolismo celular y se vio incrementado bajo condiciones de estrés. En el caso de los $SMP_{Proteínas}$, estos se producen exclusivamente durante el metabolismo celular propio y no se ve incrementado bajo condiciones de estrés, en este caso, estrés provocado por altas temperaturas.

En la figura 17 se muestra la evolución de la concentración de DQO_{SOL} a lo largo de todo el periodo de estudio.

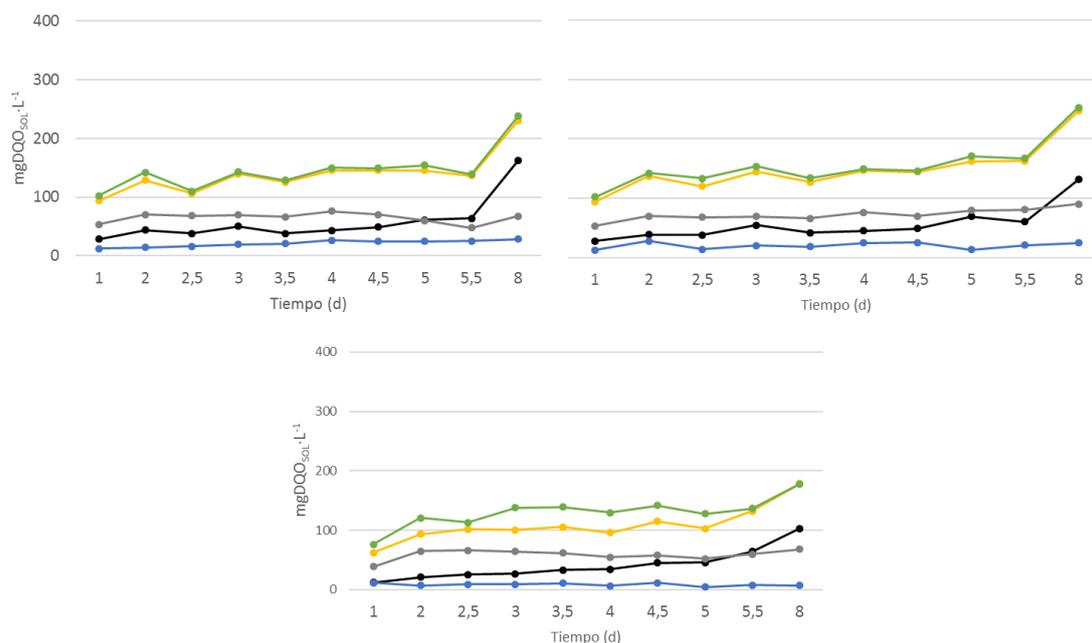


Figura 17: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} a la izquierda arriba (25°C), derecha (30°C) y abajo (35°C). $DQO_{SOL,AGV}$ (azul), $DQO_{SOL,PRO}$ (gris), $DQO_{SOL,GLU}$ (negro), $DQO_{SOL,SUMA}$ (naranja) y $DQO_{SOL,MEDIDA}$ (verde).

En este caso también se observa como la DQO_{SOL} medida coincide en términos generales la DQO_{SOL} suma de los $SMP_{Glúcidos}$, $SMP_{Proteínas}$ y Ácidos Grasos Volátiles (AGV). Además, mediante un análisis estadístico se demostró una relación lineal entre la producción de SMP y DQO_{SOL} (p -valor $< 0,05$).

También se observa una vez más que, los SMP producidos bajo condiciones de estrés están formados principalmente por sustancias glúcidas, ya que su concentración aumenta bajo estas condiciones, mientras que los $SMP_{Proteínas}$ evolucionan por el propio metabolismo celular.

- **Experimento 4 (cambios de temperatura de 25 a 35°C durante 4h diarias)**

En este experimento se sembraron dos reactores con el mismo inóculo y las mismas condiciones de operación, pero en uno de ellos mantuvo la temperatura de 25°C durante todo el tiempo que duró el experimento, mientras que el otro sufría incrementos de temperatura de 10°C (hasta 35°C) durante 4 horas al día.

En las figuras 18 y 19 se muestra la producción de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Glu,NOR}$ respectivamente en estos dos experimentos a 25°C (TC) (izquierda) e intervalos diarios de 4 horas a 35°C (IT) (derecha), trabajando en continuo.

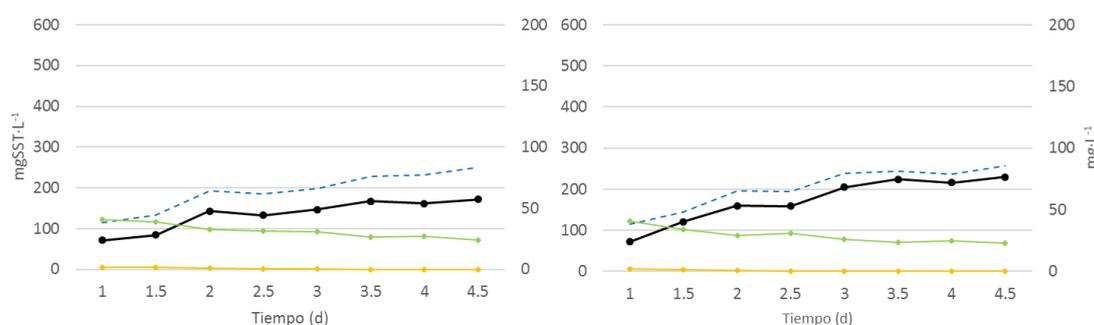


Figura 18: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes. A la izquierda (TC) y derecha (IT).
SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

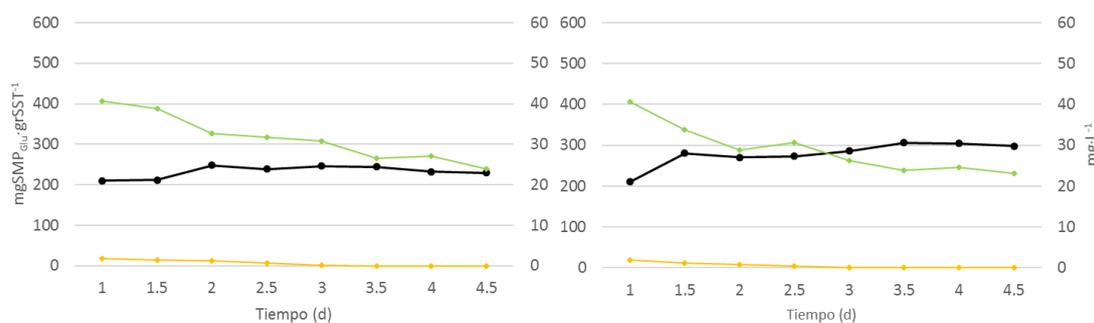


Figura 19: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (TC) y derecha (IT).
SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

Como se observa en la figura 18, la evolución de la biomasa siguió tendencias similares, alcanzando valores en torno a $250 mgSST \cdot L^{-1}$ en ambos casos al final del experimento.

La evolución de la concentración de nutrientes fue similar en ambos reactores, reduciéndose ligeramente más rápido en el caso del reactor que sufrió incrementos de la temperatura a intervalos de 4h, aunque alcanzaron los mismos valores finales. En ambos casos, el fosfato se agotó el tercer día, mientras que el amonio no se agotó y varió entre $40-20 mgN-NH_4^+ \cdot L^{-1}$.

Como se observa en la figura 18, la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ siguió una tendencia de aumento constante a lo largo de todo el experimento. El reactor que funcionó con intervalos de temperatura experimentó un mayor incremento respecto al reactor funcionando a temperatura constante.

Respecto a lo observado en la figura 19, la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ se mantuvo constante, en el caso del reactor funcionando a temperatura constante, durante todo el experimento. Sin embargo, el reactor funcionando con intervalos de temperatura si que sufrió un incremento en la concentración, en torno a un 25% respecto al valor inicial (figura 19 derecha).

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que, como se ha observado en el experimento anterior, la temperatura situada en el rango óptimo superior para el genero *Chlorella sp.* genera estrés celular en la biomasa algal. Un incremento de temperatura en 10°C (hasta alcanzar 35°C), aunque sea con intervalos de poco tiempo, genera estrés en el cultivo, dando como resultado un aumento en la producción y liberación de $SMP_{Glúcidos}$.

En las figuras 20 y 21 se muestra la producción de $SMP_{Proteínas}$ y $SMP_{Pro,NOR}$ respectivamente en experimentos realizados a 25°C e intervalos diarios de 4 horas a 35°C, trabajando en continuo.

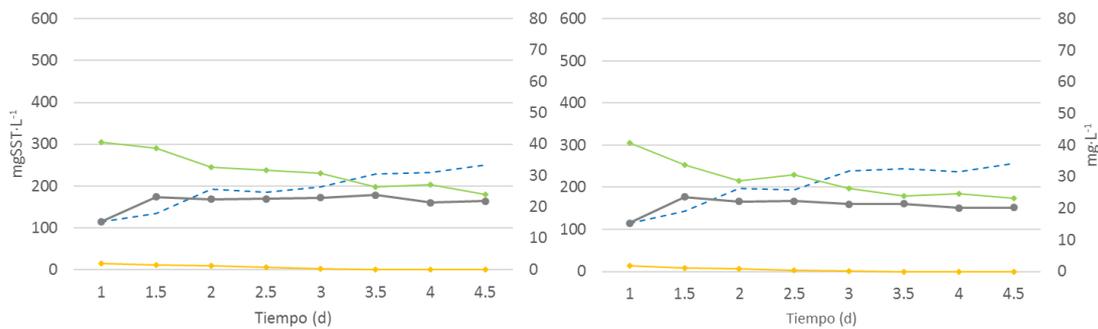


Figura 20: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes. A la izquierda (TC) y derecha (IT). SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

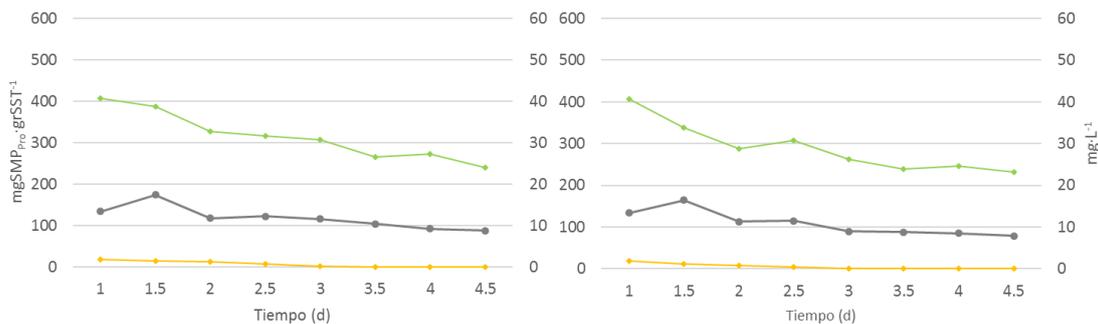


Figura 21: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (TC) y derecha (IT). SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

En el caso de los $SMP_{Proteínas}$ se observa cómo ambos experimentos mantuvieron valores constantes a lo largo de todo el período de estudio (figura 20).

Respecto a los $SMP_{Pro,NOR}$ se observa un descenso conforme van pasando los días en ambos experimentos, manteniendo un comportamiento similar (figura 21).

Los valores constante de $SMP_{Proteínas}$ mostrados en la figura 20 se debieron al funcionamiento en continuo de los reactores, ya que estos fueron sometidos a una purga y lavado correspondiente a un TRC de tres días. Se puede observar como la extracción de parte de los SMP liberados corresponde con la producción.

Respectos a los $SMP_{Pro,NOR}$ se produjo una reducción en ambos casos, esta coincidió en su tendencia con la reducción de nitrógeno amoniacal en el reactor. Como ya se ha comentado a lo largo del presente trabajo, el nitrógeno es fundamental en la síntesis y liberación de proteínas, por lo tanto, conforme fue reduciendo la concentración de nitrógeno en el reactor, se redujo la segregación de sustancias proteicas al medio. Además la lenta velocidad de síntesis de esta provocan que sus efectos sean más prolongados en el tiempo.

En la figura 22 se muestra la evolución de la concentración de DQO_{SOL} a lo largo de todo el periodo de estudio.

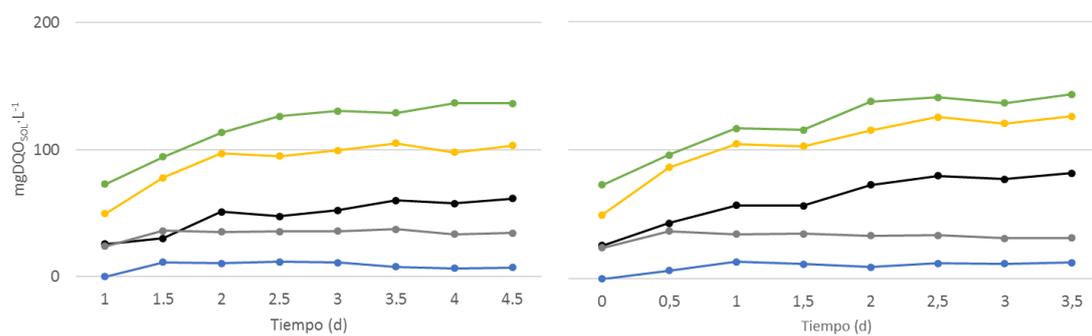


Figura 22: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} a la izquierda (TC) y derecha (IT). $DQO_{SOL,AGV}$ (azul), $DQO_{SOL,PRO}$ (gris), $DQO_{SOL,GLU}$ (negro), $DQO_{SOL,SUMA}$ (naranja) y $DQO_{SOL, MEDIDA}$ (verde).

Por último, se muestran los resultados obtenidos en las medidas de DQO_{SOL} realizadas al licor mezcla. La concentración de DQO_{SOL} medida tiene valores muy similares a la suma de los $SMP_{Glúcidos}$, $SMP_{Proteínas}$ y AGV, por lo tanto, la DQO_{SOL} es una buena medida indirecta de los SMP contenidos en un cultivo de estas características.

4.1.3. Influencia de la concentración de nutrientes en la producción de SMP.

- Experimento 5 (reactores con diferente concentración de nutrientes)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados en el laboratorio, para estudiar el efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción SMP, tanto glúcidos como proteínas. Estos experimentos se realizaron a raíz de observar cómo podía afectar la disponibilidad de nutrientes al estrés y la producción de SMP en los experimentos estudiados anteriormente sobre el efecto de la temperatura.

En las figuras 23 y 24 se muestra la evolución de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Glu,NOR}$ en un experimento realizado a 25°C, con un reactor dotado con una alta concentración inicial de nutrientes (EN) (55,2 mgN-NH₄⁺·L⁻¹ y 3,52 mg P-PO₄³⁻·L⁻¹) y otro con menor concentración inicial de nutrientes (DN) (26,3 mgN-NH₄⁺·L⁻¹ y 1,62 mgP-PO₄³⁻·L⁻¹).

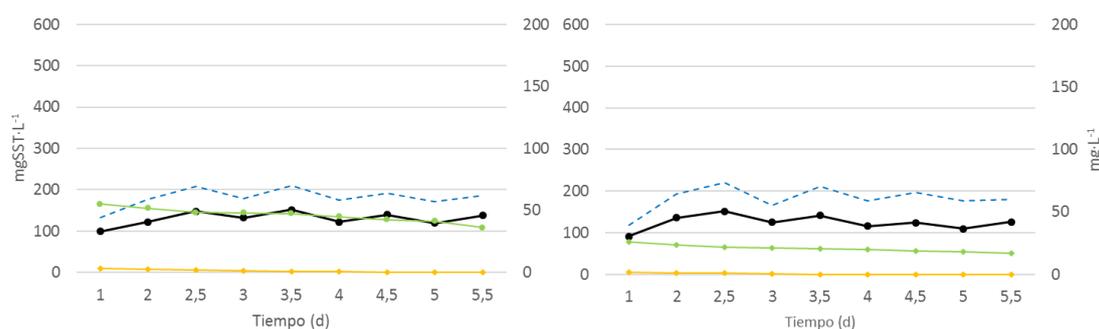


Figura 23: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes. A la izquierda (EN) y derecha (DN).
SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fofato (amarillo).

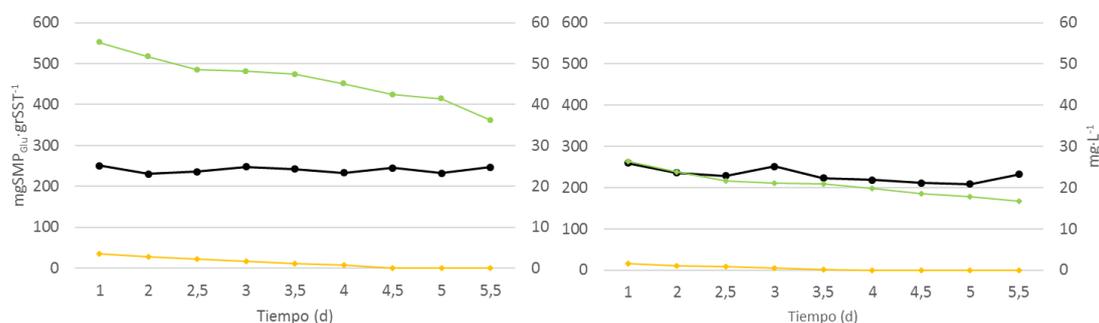


Figura 24: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (EN) y derecha (DN).
SMP (negro), amonio (verde) y fofato (amarillo).

Como se muestra en la figura 23, la concentración de biomasa algal alcanzada por ambos reactores es similar, aproximadamente 200 mgSST·L⁻¹.

En ambos casos los rendimientos de eliminación de amonio totales fueron del 40% en cada caso, produciéndose una mayor eliminación de la concentración de amonio neta en el caso del reactor trabajando con una elevada concentración de nutrientes.

Respecto a la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ ambos reactores siguieron una tendencia similar, manteniendo valores aproximadamente constantes durante todo el experimento (figura 23).

En el caso de los $SMP_{Glú,NOR}$ los valores también se mantuvieron constantes a lo largo del experimento, no observándose diferencias entre ambos reactores (figura 24).

En este experimento, la biomasa sufrió un desarrollo menor que en los anteriores debido a que se trabajó con un TRC de dos días, por lo tanto, la biomasa purgada se equiparó a la biomasa producida.

Respecto a los nutrientes, en ninguno de los dos ensayos se produjo estrés por falta de nutrientes, ya que, aunque uno de los reactores tenía menor concentración, el amonio se mantuvo en todo momento en torno a los $20 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ (Ruiz-Martínez *et al.*, 2014). Por otro lado, a mayor concentración de amonio y en presencia de fósforo, se produjo una mayor eliminación de nutrientes neta en el reactor (Pachés *et al.*, 2018).

En este caso, ambos reactores trabajaron a 25°C , una temperatura que ha resultado no provocar estrés por temperatura. Por lo tanto, parece ser que bajo estas condiciones de operación: trabajando en batch, con menores concentraciones de biomasa, reduciendo así el autosombreado en el reactor, a una temperatura de 25°C y sin tener valores de nutrientes limitantes o inhibitorios, la producción y liberación de $SMP_{Glúcidos}$ se mantiene en valores constantes.

En la figura 25 y 26 se muestra la evolución de $SMPP_{Proteínas}$ y $SMPP_{Pro,NOR}$ para los ensayos descritos anteriormente.

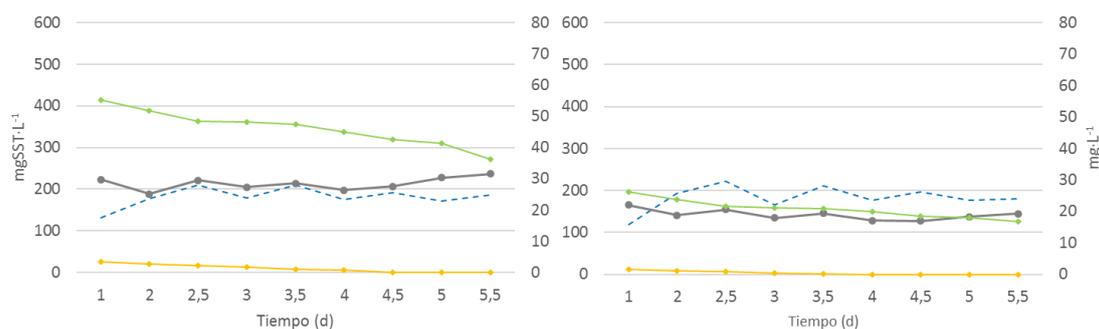


Figura 25: Evolución de la concentración de $SMPP_{Proteínas}$, SST y nutrientes. A la izquierda (TC) y derecha (IT).
SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

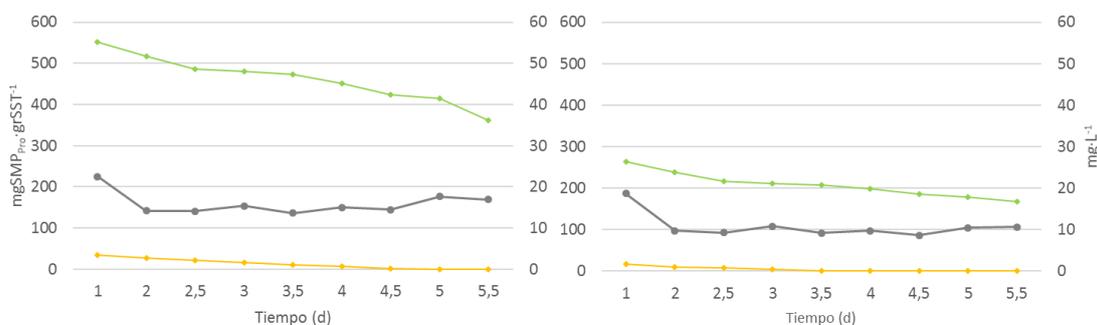


Figura 26: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (EN) y derecha (DN). SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

Los valores de $SMP_{Proteínas}$ se mantuvieron constantes a lo largo de todo el experimento, no observándose cambios en el comportamiento (figura 25).

En el caso de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ se observa cómo se produjo una mayor reducción en el reactor funcionando con menor concentración de nutrientes (18% más) durante el período en el que se trabajó en estas condiciones (figura 26).

En el caso de los $SMP_{Proteínas}$, su concentración se mantiene constante debido a que la purga y extracción de estas sustancias se iguala a la producción dentro del reactor.

Por otro lado, la mayor reducción de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ en el caso de trabajar con menor concentración de nutrientes podría ser debida a la menor concentración de nitrógeno amoniacal, limitando así la síntesis y liberación de proteínas al medio.

En la figura 27 se muestra la evolución de la concentración de DQO_{SOL} a lo largo de todo el periodo de estudio.

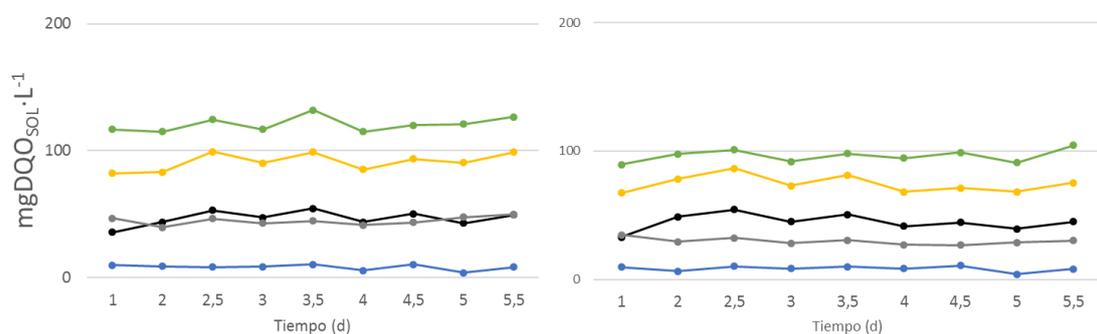


Figura 27: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} a la izquierda (EN) y derecha (DN). $DQO_{SOL,AGV}$ (azul), $DQO_{SOL,PRO}$ (gris), $DQO_{SOL,GLU}$ (negro), $DQO_{SOL,SUMA}$ (naranja) y $DQO_{SOL, MEDIDA}$ (verde).

Una vez más se observa como la DQO_{SOL} del licor mezcla estaba formada principalmente por los SMP producidos y liberados por la biomasa presente en el cultivo (figura 27), existiendo una relación lineal, analizada mediante la correlación de Pearson, entre los valores de concentración de SMP , tanto glúcidos como proteínas, y la DQO_{SOL} (p-valor < 0,05).

En este caso, se observa como la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Proteínas}$ sigue una tendencia muy similar a lo largo de todo el experimento, ya que no intervienen condiciones de estrés en el cultivo, por lo que ambos se segregan bajo condiciones normales, debido a su interacción con el medio y al crecimiento y degradación de la biomasa.

4.1.4. Influencia de la competencia con AOB sobre la producción de SMP.

- Experimento 6 (competencia con bacterias amoniooxidantes)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados en el laboratorio, para estudiar el efecto de la competencia con bacterias amoniooxidantes sobre la producción de SMP.

La figura 28 y 29 muestran la evolución de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Glu,NOR}$ en un experimento realizado a 25°C, con un reactor con dosificación de alitiourea (inhibiendo el crecimiento de bacterias amoniooxidantes) (CA) y otro sin dosificación de alitiourea (evolucionando la competencia entre bacterias amoniooxidantes y microalgas de manera natural) (SA).

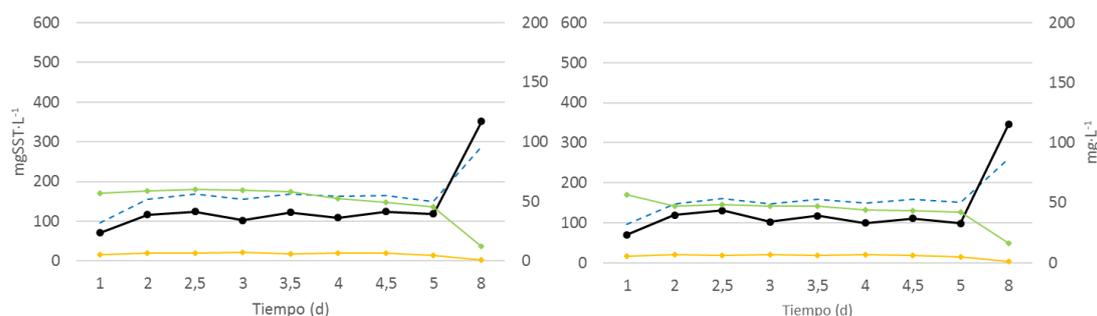


Figura 28: Evolución de la concentración de $SMP_{Glúcidos}$, SST y nutrientes. A la izquierda (CA) y derecha (SA).
SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

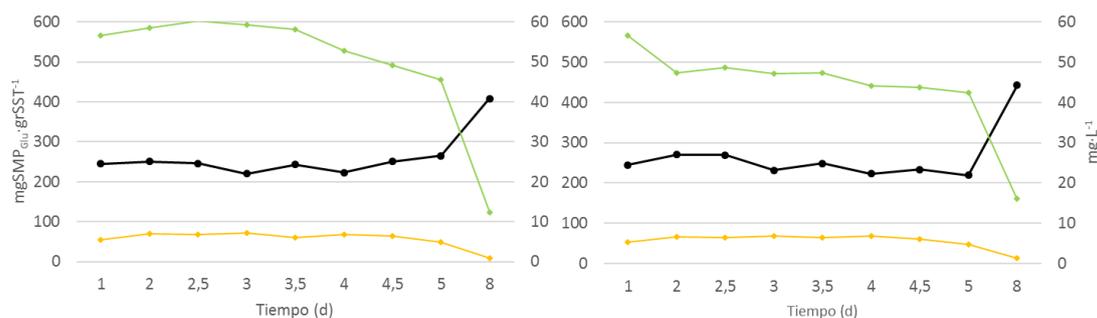


Figura 29: Evolución de la concentración de $SMP_{Glu,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (CA) y derecha (SA).
SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

Respecto a la concentración de biomasa algal en los reactores, se observa como en el reactor con dosificación de alitiourea se produjo un desarrollo mayor (170 mgSST·L⁻¹) respecto al reactor funcionando sin dosificación de alitiourea (150 mgSST·L⁻¹).

Los rendimientos de eliminación de nutrientes fueron similares en ambos experimentos, en torno a un 85% en el caso del fosfato y un 75% en el caso del amonio.

La concentración $SMP_{Glúcidos}$ a lo largo del experimento se mantuvo aproximadamente constante en ambos reactores, con un ligero aumento (figura 28).

Respecto a la concentración de $SMP_{Glú,NOR}$ se mantiene en torno a los $250 \text{ mgSMP}_{Glú} \cdot \text{grSST}^{-1}$, ya que tanto la biomasa algal como los $SMP_{Glúcidos}$ se mantiene constantes (figura 29).

La concentración de $SMP_{Glúcidos}$ se mantuvo constante en el reactor debido a la purga de este, produciéndose un lavado de SMP y biomasa.

Por lo tanto, parece ser que cuando existe competencia con bacterias amoniooxidantes en un reactor, no se ve afectada la producción y liberación de $SMP_{Glúcidos}$ para el período de tiempo estudiado. Sin embargo, a largo plazo, las diferencias entre ambos reactores, bajo estas condiciones, podrían ser mayores ya que se podría producir una mayor proliferación de bacterias nitrificantes (González-Camejo *et al.*, 2018), ya que estas presentan un período de adaptación y crecimiento más dilatado en el tiempo.

En las figuras 30 y 31 se muestra la evolución de $SMP_{Proteínas}$ y $SMP_{Pro,NOR}$ bajo las mismas condiciones que antes.

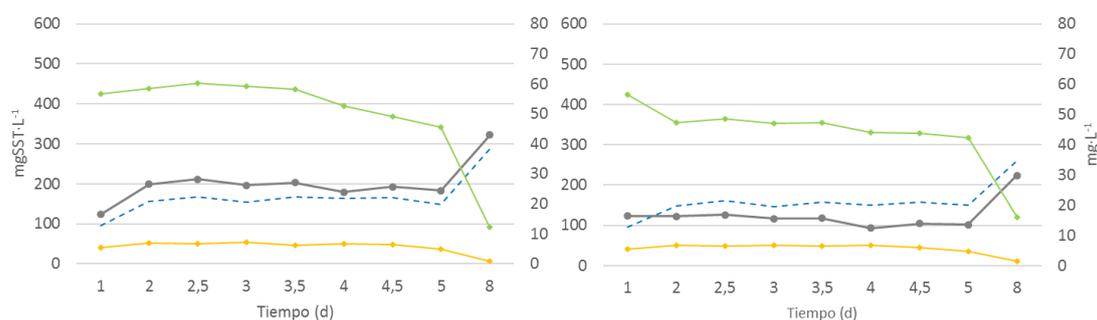


Figura 30: Evolución de la concentración de $SMP_{Proteínas}$, SST y nutrientes. A la izquierda (TC) y derecha (IT). SMP (negro), SST (azul), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

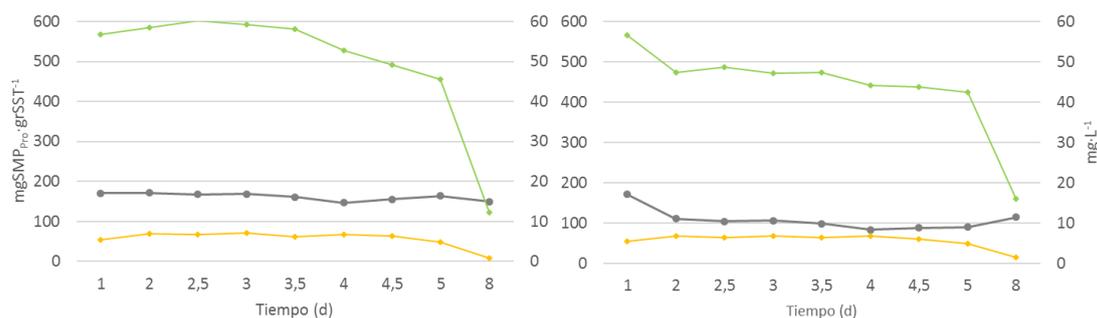


Figura 31: Evolución de la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ y nutrientes. A la izquierda (TC) y derecha (IT). SMP (negro), amonio (verde) y fosfato (amarillo).

La concentración de $SMP_{Proteínas}$ aumentó durante el primer día de experimento en el caso del experimento con dosificación de alitiourea (figura 30 izquierda), manteniendo valores constantes a lo largo del resto de días. En el caso del reactor sin dosificación de alitiourea, las concentraciones se mantuvieron constantes durante todo el experimento (figura 30 derecha).

Como se observa en la figura 31, en el caso del reactor funcionando con dosificación de alitiourea la concentración de $SMP_{PRO,NOR}$ se mantuvo constante a lo largo del experimento, mientras que el reactor sin dosificación de alitiourea sufrió un descenso durante el primer día de experimento, coincidiendo con un gran descenso en la concentración de nitrógeno amoniacal (figura 31 derecha).

En el caso del aumento de la concentración de $SMP_{Proteínas}$ en el reactor funcionando con dosificación de alitiourea, el aumento parece estar relacionado con el rápido aumento de la biomasa algal durante el primer día.

El descenso de la concentración de $SMP_{PRO,NOR}$ experimentado por el reactor sin alitiourea podría deberse al descenso en la concentración de nitrógeno amoniacal en el reactor, ya que el nitrógeno es el principal elemento en la síntesis y liberación de proteínas. Un descenso de la concentración de nitrógeno puede disminuir la toma de éste por parte de las celular y limitar la liberación de sustancias proteicas al medio.

En la figura 32 se muestra la evolución de la concentración de DQO_{SOL} a lo largo de todo el periodo de estudio.

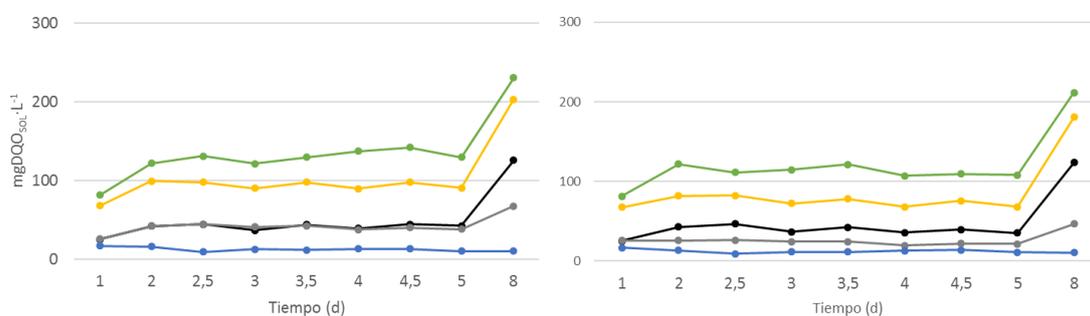


Figura 32: Evolución de la concentración de DQO_{SOL} . A la izquierda (FBR-1) y derecha (FBR-2). $DQO_{SOL,AGV}$ (azul), $DQO_{SOL,PRO}$ (gris), $DQO_{SOL,GLU}$ (negro), $DQO_{SOL,SUMA}$ (naranja) y $DQO_{SOL, MEDIDA}$ (verde).

Una vez más, como se observa en la figura 32, la DQO_{SOL} medida está formada principalmente por los SMP producidos y liberados por la biomasa presente en el cultivo, además se observa una relación lineal entre la concentración de SMP y DQO_{SOL} (p -valor < 0,05).

4.2. Seguimiento de la planta piloto

En la figura 33 y 34 se muestra la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ y $SMP_{Glú,NOR}$ en el FBR de la EDAR de la cuenca del Carraixet en muestras tomadas en días alternos a diferentes horas: 09:00 h (A), 13:00 h (B) y 17:00 h (C). También se muestran las concentraciones de las distintas formas nitrógeno (amonio, nitrito y nitrato) y fosfato.

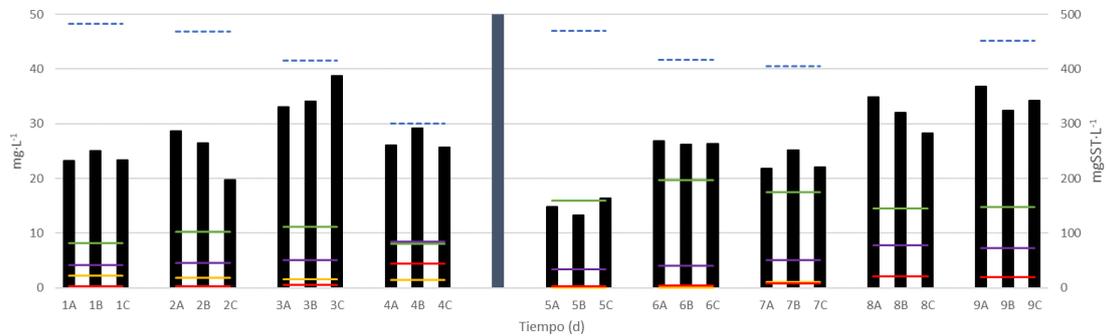


Figura 33: Concentración de $SMP_{Glúcidos}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet. SMP (negro), SSV (azul), amonio (verde), fosfato (amarillo), nitrito (rojo) y nitrato (morado)

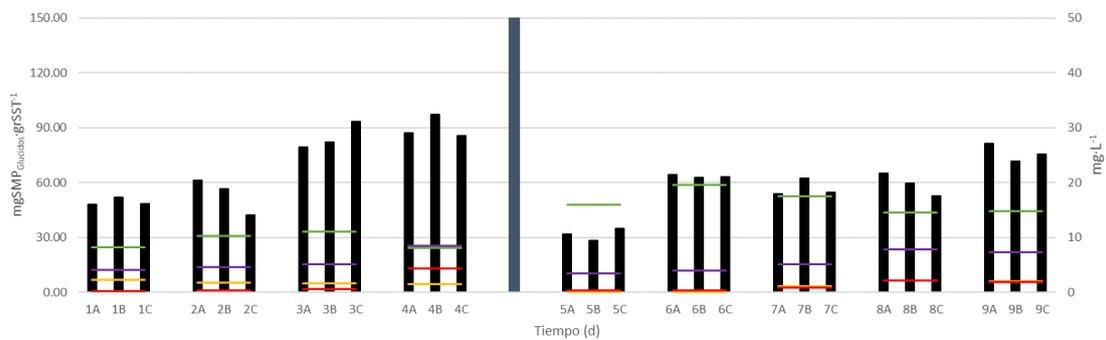


Figura 34: Concentración de $SMP_{Glú,NOR}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet. SMP (negro), amonio (verde), fosfato (amarillo), nitrito (rojo) y nitrato (morado)

En esta figura también se muestran las intensidades lumínicas máximas y medias para el día de la toma de muestras y el día anterior.

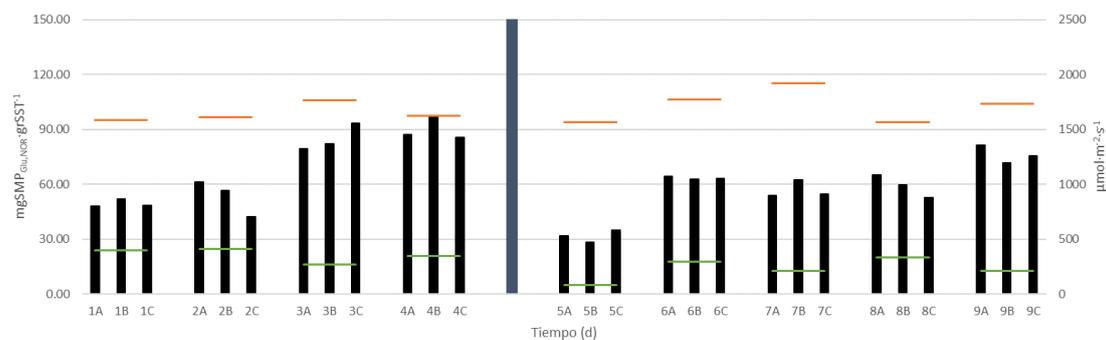


Figura 35: Concentración de $SMP_{Glú,NOR}$ e intensidad lumínica en el FBR de la EDAR del Carraixet. SMP (negro), $I_{0,MED}$ (verde) y $I_{0,MAX}$ (naranja)

La línea azul que se muestra en las gráficas separa las muestras tomadas en dos siembras distintas realizadas en el FBR.

En el caso del primer período de estudio del reactor se observa como la concentración de biomasa fue descendiendo desde $480 \text{ mgSST}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta alcanzar unos $300 \text{ mgSST}\cdot\text{L}^{-1}$, día en el cual bajaron los rendimientos de depuración (datos no mostrados), procediéndose al vaciado y resiembra del reactor objeto de estudio. Durante este periodo se observa cómo la concentración de nitrito fue aumentando, alcanzando en el último día valores similares a la concentración de nitrógeno amoniacal ($6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Esto es indicativo de la proliferación de bacterias amoniooxidantes en el reactor que genera una competencia con las microalgas por la toma de nutrientes, lo que suele provocar una reducción de los rendimientos de depuración (González-Camejo *et al.*, 2018). Respecto al resto de nutrientes medidos, los valores se mantuvieron constantes a lo largo del seguimiento. La concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ fue aumentando conforme el cultivo se fue desarrollando y comenzaron a proliferar las bacterias amoniooxidantes. Conforme aumentó el desarrollo de AOB, descendió la concentración de biomasa algal y aumentó la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ en el fotobiorreactor de membranas.

La intensidad lumínica registrada durante el seguimiento en este periodo mantuvo valores muy similares, por lo que parece que esta no jugó un papel determinante en los resultados obtenidos sobre la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$. Tampoco se observa una tendencia clara en las muestras a lo largo de día, cuando cabría esperar un aumento de la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ durante las horas del mediodía, cuando mayor es la intensidad lumínica y, en consecuencia, mayor actividad fotosintética.

La concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ se fue incrementando con el paso de los días, partiendo de un valor de $25 \text{ mgSMP}_{\text{Glúcidos}}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta valores de $37 \text{ mgSMP}_{\text{Glúcidos}}\cdot\text{L}^{-1}$. El aumento de la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$ podría ser debido al estrés generado por la proliferación de bacterias amoniooxidantes (AOB), que se puede observar por el aumento de nitrito en el reactor. Este aumento se produce hasta el último día muestreado, en el cual descendió la biomasa y la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glúcidos}}$, sin embargo, la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glu,NOR}}$ aumentó. Este aumento de la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glu,NOR}}$ podría deberse al descenso de la biomasa, ya que cuando se desarrolla la competencia con AOB, bajan las velocidades de crecimiento, por lo tanto, no se compensa la purga con la nueva producción. Además, la presencia de bacterias nitrificantes podría provocar estrés en el cultivo (González-Camejo *et al.*, 2018), incrementando así la concentración de $\text{SMP}_{\text{Glu,NOR}}$.

En el caso de del segundo periodo estudiado, tras una siembra nueva, la concentración de biomasa se mantuvo más o menos constante a lo largo de todo el experimento, con valores situados entre 400 y $500 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$.

Respecto a la concentración de nutrientes, los valores de amonio fueron ligeramente superiores a los encontrados en el primer período de estudios, situándose en valores comprendidos entre 15 y $20 \text{ mgN-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$. El fosfato se encuentra en todo momento por debajo de $2 \text{ mgP-PO}_4^{3-}\cdot\text{L}^{-1}$ y el nitrato por debajo de $10 \text{ mgN-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$, valores muy similares a

los encontrados en el seguimiento anterior. Por otro lado, el nitrito registró valores por debajo del primer periodo, aunque aumentando días después de finalizar el seguimiento, con las mismas consecuencias.

La intensidad lumínica sí que sufrió mayores variaciones en el segundo seguimiento realizado, aunque no parece ser determinante en los resultados de $SMP_{Glúcidos}$ obtenidos. En este segundo seguimiento, igual que en el anterior, no se observan diferencias en las muestras tomadas a lo largo del día.

En este caso, la concentración de $SMP_{Glúcidos}$ también fue incrementándose con el paso de los días, partiendo de un valor de $15 \text{ mgSMP}_{Glúcidos} \cdot \text{L}^{-1}$ hasta unos $37 \text{ mgSMP}_{Glúcidos} \cdot \text{L}^{-1}$. Este aumento, aunque menor que el anterior, podría ser debido al estrés por la presencia y proliferación de bacterias amoniooxidantes (AOB), como se observa en el aumento de la concentración de nitrito en el reactor. Los $SMP_{Glú,NOR}$, aunque ligeramente, también aumentaron, por lo que el aumento de $SMP_{Glúcidos}$ no está relacionado con la acumulación de biomasa, provocando zonas oscuras en el reactor, sino probablemente, por el estrés generado por la presencia de AOB. Las diferencias observadas en la competencia con bacterias amoniooxidantes respecto a los resultados obtenidos en laboratorio pueden ser debidos al tiempo de estudio, ya que las AOB presentan un tiempo de adaptación y desarrollo más prologando en el tiempo que las microalgas.

En la figura 36 y 37 se muestra la concentración de $SMP_{Proteínas}$ y $SMP_{Pro,NOR}$ en el FBR en muestras tomadas en días alternos a diferentes horas: 09:00 h (A), 13:00 h (B) y 17:00 h (C). También se muestran las concentraciones de las distintas fracciones de nitrógeno inorgánico (amonio, nitrito y nitrato) y fosfato.

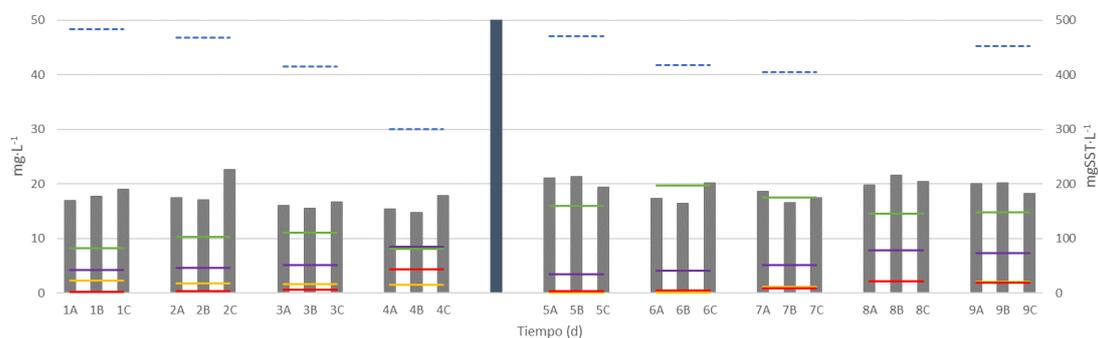


Figura 36: Concentración de $SMP_{Proteínas}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet. SMP (gris), SST (azul), amonio (verde), fosfato (amarillo), nitrito (rojo) y nitrato (morado)

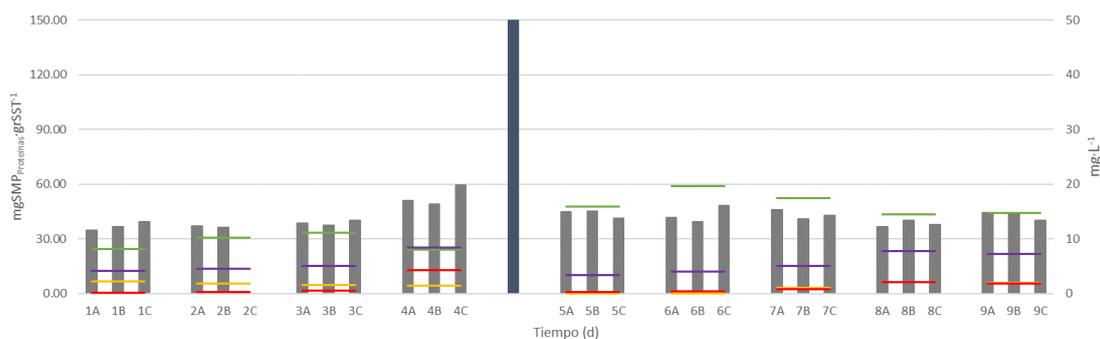


Figura 37: Concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ en el FBR de la EDAR del Carraixet. SMP (gris), amonio (verde), fosfato (amarillo), nitrito (rojo) y nitrato (morado)

En la figura 38 se muestra la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ en el FBR en muestras tomadas en días alternos a diferentes horas: 09:00 h (A), 13:00 h (B) y 17:00 h (C). También se muestran las intensidades lumínicas máximas y medias para el día de la toma de muestras y el día anterior.

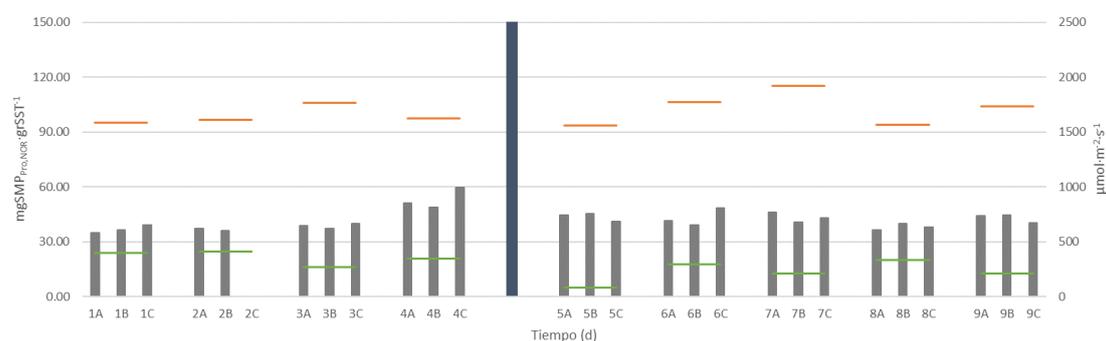


Figura 38: Concentración de $SMP_{Pro,NOR}$ e intensidad lumínica en el FBR de la EDAR del Carraixet. SMP (gris), $I_{0,MED}$ (verde) y $I_{0,MAX}$ (naranja)

Respecto a la concentración de $SMP_{Proteínas}$, para la primera parte del seguimiento, se observa como la concentración de $SMP_{Proteínas}$ mantuvo valores aproximadamente constantes, en torno a $18 \text{ mgSMP}_{Proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$. También se mantuvo constante la concentración de $SMP_{Pro,NOR}$, en valores de $35 \text{ mgSMP}_{Pro} \cdot \text{grSST}^{-1}$. El último días estos valores aumentaron en torno a un 25%.

Durante la segunda parte del seguimiento realizado, la concentración de $SMP_{Proteínas}$ también se mantuvo constante en torno a $18 \text{ mgSMP}_{Proteínas} \cdot \text{L}^{-1}$.

Los valores de $SMP_{Glúcidos}$ aumentaron conforme evolucionó el cultivo, viéndose afectado cuando apareció un factor de estrés, en este caso la proliferación y competencia con las bacterias amonioxidantes (AOB). En el caso de los $SMP_{Proteínas}$, su concentración se mantuvo prácticamente constante a lo largo del seguimiento, aun cuando apareció un factor de estrés, únicamente se observó un aumento cuando descendió la biomasa. Es por ello que los resultados obtenidos en el seguimiento realizado en la planta piloto son muy similares a los obtenidos en los experimentos realizados a escala de laboratorio en lo que a proporción de glúcidos y proteínas se refiere.

Tanto en el caso de los $SMP_{Proteínas}$, como en el caso de los $SMP_{Glúcidos}$, no se observan diferencias significativas en las distintas muestras tomadas a lo largo de un mismo día.

En la figura 39 se muestra la concentración de DQO_{SOL} en los distintos días de seguimiento de la planta piloto, se muestra la medida tomada directamente y la suma de los SMP y AGV.

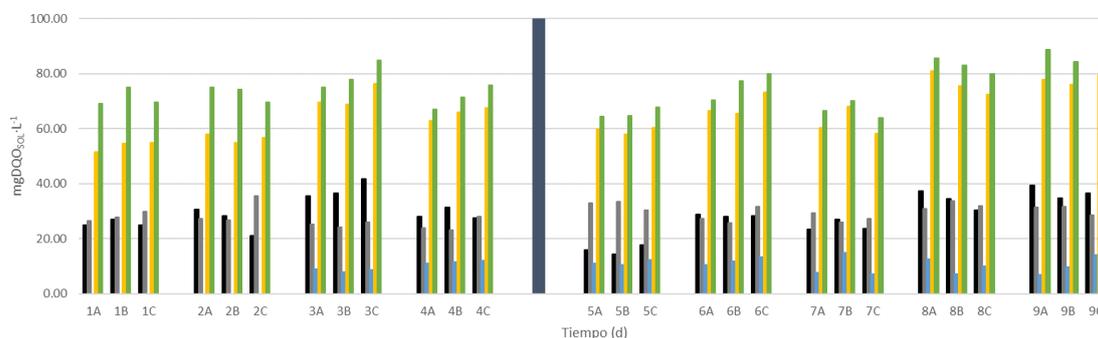


Figura 39: Concentración de DQO_{SOL} en el FBR de la EDAR del Carraixet. $DQO_{SOL,GLU}$ (negro), $DQO_{SOL,PRO}$ (gris), $DQO_{SOL,AGV}$ (azul), $DQO_{SOL,SUMA}$ (amarillo) y $DQO_{SOL,MEDIDA}$ (verde)

Como se observa en la figura 39, la DQO_{SOL} del licor mezcla estaba formada principalmente por los SMP producidos y liberados por la biomasa presente en el fotobiorreactor. La diferencia entre la DQO medida y la calculada debe deberse a la materia orgánica no biodegradable que entra al sistema con el alimento. En los dos primeros días mostrados, la diferencia entre la $DQO_{SOL,SUMA}$ y la $DQO_{SOL,MEDIDA}$ es también debida a los Ácidos Grasos Volátiles (AGV), los cuales no se midieron.

Los datos mostrados en la figura 39 han sido analizados estadísticamente mediante la correlación de Pearson, dando como resultado una relación lineal entre la concentración de SMP y la concentración de DQO_{SOL} presente en el fotobiorreactor (p -valor < 0,05).

Observando esta figura se puede determinar que, en un cultivo de microalgas de estas características la media de la DQO_{SOL} se puede considerar una medida indirecta de la concentración de SMP. Además, considerando que el deterioro del cultivo de microalgas en planta piloto, en cuanto a la eliminación de nutrientes y producción de biomasa, se produjo cuando se aumentó la cantidad de SMP, las concentraciones de DQO_{SOL} dentro del reactor pueden ayudar como parámetro de control del proceso, buscando que sean lo más bajas posibles, optimizando así el proceso de depuración y filtración.

Aunque la afección de los factores de estrés sobre el proceso de filtración no ha sido estudiada en el presente trabajo, es de esperar que la disminución de la concentración de DQO_{SOL} (es decir, SMP) facilite el proceso de filtración de la planta MPBR.

5. Conclusiones

Tras la realización de diversos experimentos a escala de laboratorio para conocer las condiciones que producen mayor producción y liberación de SMP en un cultivo de microalgas de la especie *Chlorella* con agua residual tratada anaeróbicamente, se extrajeron las siguientes conclusiones.

- Bajo condiciones de estrés, aumentó principalmente la producción de SMP_{Glúcidos}, mientras que los SMP_{Proteínas} mantuvieron comportamiento similares bajo condiciones normales que bajo condiciones de estrés.
- El funcionamiento en batch incrementó la acumulación de SMP, debido a la acumulación de biomasa en el reactor.
- El comportamiento observado, en lo referido a producción y liberación de SMP, fue similar a temperaturas de 25 y 30°C.
- A temperaturas por encima de 30°C se produjo un evidente estrés por temperatura sobre el cultivo, incrementando en gran medida la liberación de SMP_{Glúcidos}.
- Altas concentraciones de biomasa en el reactor ($>300 \text{ mgSST} \cdot \text{L}^{-1}$) provocaron un aumento en la producción y liberación de SMP_{Glúcidos} debido al efecto de autosombreado que se produjo en el cultivo.
- La disponibilidad de nutrientes en el reactor modulo la producción y liberación de SMP_{Glúcidos}, observándose una limitación de la producción y liberación de estos con bajas concentraciones de nutrientes.
- La limitación por nitrógeno en el reactor disminuyó la síntesis y liberación de SMP_{Proteínas} en el reactor.
- No se han observado evidencias de que la competencia con bacterias amonioxidantes supongan un factor de estrés en un cultivo de microalgas a corto plazo (escala de laboratorio), pero sí a medio plazo (escala piloto).
- Existe una relación lineal entre la concentración de SMP producidos y liberados por la biomasa y la concentración de DQO_{SOL}. Por lo tanto, se puede considerar que, en un cultivo de microalgas de estas características, la medida de DQO_{SOL} es una medida indirecta de la concentración de SMP.

Respecto al seguimiento realizado en el fotobiorreactor situado en la EDAR de la Cuenca del Carraixet para el muestreo y análisis de los SMP presentes en el cultivo, se han obtenido las siguientes conclusiones.

- Como en los resultados obtenidos en los experimentos a escala de laboratorio, se ha observado que la excreción de SMP_{Proteínas} se produjo durante el propio metabolismo de las microalgas y los factores de estrés no incrementaron su producción, a diferencia de lo que ocurre con los SMP_{Glúcidos}.
- No se produjeron variaciones significativas en la producción de SMP a lo largo de un mismo día.
- La competencia con bacterias amoniooxidantes produjo estrés sobre el cultivo, incrementando en gran medida la producción y liberación de SMP_{Glúcidos} en el medio, a diferencia de los resultados obtenidos en los experimentos de laboratorio.
- Con el avance del tiempo aumentó la concentración de SMP en el reactor.
- Se debería estudiar la posible inhibición del crecimiento de las microalgas con diferentes concentraciones de nitrito (NO₂).

Con los resultados obtenidos a escala de laboratorio se puede determinar que las mejores condiciones de operación en un fotobiorreactor con *Chlorella sp.*, para minimizar el estrés y con ello la producción y liberación de SMP al medio son las siguientes.

- Comparar batch y continuo.
- Trabajar a temperaturas en torno a 30°C.
- Controlar la concentración de biomasa para evitar el efecto de autosombreado en el cultivo, lo que puede provocar estrés celular debido a las bajas intensidades de luz que recibe la biomasa presente en el reactor.
- Trabajar con concentraciones bajas de nutrientes, para limitar el desarrollo de la biomasa, así como limitar la producción y liberación de SMP al medio cuando existen factores de estrés que actúan sobre el cultivo.

6. Bibliografía

- Ahmed, Z., Cho, J., Lim, B. R., Song, K. G., & Ahn, K. H. (2007). Effects os sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, *287*, 211-218.
- Alcántara, C., Posadas, E., Guieysse, B., & Muñoz, R. (2015). *Handbook of marine microalgae*. (K. S.K., Ed.) Boston: Academic Press.
- Angelakis, A. N., Bontoux, L., & Lazarova, V. (2003). Challenges and perspectives for water recycling and reuse in EU conuntries. *Water Science & Technology*, *3*, 59-68.
- APHA-AWWA-WPCG. (2012). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 22th (364 ed.). Washington DC: American Public Health Association.
- Araujo, G. S., Matos, L. J., Gonçalves, L. R., Fernandes, F. A., & Farias, W. R. (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology*, *102*, 5248-5250.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., & Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wasterwater tertiary treatment, CO2 bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, *49*, 465-474.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., & Perales, J. A. (2013). Effect of pH control by mans of flue gas addition on three different photo-bioreactors treating urban wastewater in long-term operation. *Ecological Engineering*, *57*, 226-235.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., & Perales, J. A. (2013). Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a hight rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecological Engineering*, *52*, 143-153.
- Azov, Y., & Shelef, G. (1987). The effect of pH on the performance of high-rate oxidation ponds. *Water Sciences & Technology*, *19*, 381-383.
- Barker, D. J., & Stuckey, D. C. (1999). A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research*, *33*, 3063-3082.
- Bi, X. D., Zhang, S. L., Dai, W., Xing, K. Z., & Yang, F. (2013). Effects of lead(II) on the extracellular polysaccharide (EPS) production and colony formation of cultures *Microcystis aeruginosa*. *Water Science & Technology*, *67*, 803-809.
- Bilad, M., Discart, V., Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., & Vankelecom, I. (2014). Coupled cultivation and pre-harversting of microalgae in a membrane photobioreactors (MPBR). *Bioresource Technology*, *155*, 410-417.
- Boero, V. J., Eckeenfelder, W. W., & Bowers, A. R. (1991). Soluble microbial product formation in biological systems. *Water Science & Technology*, *23*, 1067-1076.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing and extractionsof biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 557-577.

- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *19*, 360-369.
- Carpenter, M., Robertson, J., & Skierkowski, P. (1989). Biodegradation of an oily bilge waste using algae. En *Biotreatment, The use of microorganisms in the treatment of hazardous materials and hazardous wastes* (págs. 141-150). The Hazardous Materials Control Research Institute.
- Chen, C.-Y., Chang, H.-W., Kao, P.-C., Pan, J.-L., & Chang, J.-S. (2012). Biosorption of cadmium by CO₂-fixing microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, *105*, 74-80.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. CRC press.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., & Das, K. C. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *International Journal of Molecular Science*, *10*, 518-532.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*, 294-306.
- Choi, H., & Lee, S. (2015). Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *38*, 761-766.
- Chudoba, J. (1985). Quantitative estimation in COD units of refractory organic compounds produced by activated sludge microorganisms. *Water Research*, *19*, 37-43.
- Cordell, D., Drangent, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Globe Environmental Change*, *19*, 292-305.
- Crespi Rosell, M., & Huertas López, J. A. (1986). Determinación simplificada de la demanda química de oxígeno por el método del dicromato.
- Darley, M. W. (1982). *Algal Biology: A physiological Approach*. En J. F. Wilkinson, *Basic microbiology* (Vol. 9). Oxford, UK: Black well Scientific Publications.
- Darley, W. M. (1982). *Algal biology: a physiological approach*. *Basic Microbiology*, *9*, 30-52.
- Darnall, D. W., Greene, B., Henzl, M. T., Hosea, J. M., McPherson, R. A., Sneddon, J., & Alexander, M. D. (1986). Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass. *Environmental Science & Technology*, *20*, 206-208.
- De la Noüe, J., & De Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*, *6*, 725-770.
- De la Noüe, J., Laliberté, G., & Proulx, D. (1992). Algae and waste water. *Journal of Applied Phycology*, *4*, 247-254.
- De Pauw, N., & Van Vaerenbergh, E. (1983). Microalgal wastewater treatment systems: potential and limits. *Phytodepuration and the Employment of the Biomass Produced*, 211-287.
- de Vree, J. H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for Biofuels*, *8*, 215-226.

- de Wilt, A., Butkovskiy, A., Tuantet, K., Leal, L., Fernandes, T., Langenhoff, A., & Zeeman, G. (2016). Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal of Hazardous Materials*, 304, 84-92.
- Drews, A. (2010). Membrane fouling in membrane bioreactors characterization, contradictions, causes and cures. *Journal of Membrane Science*, 253, 1-28.
- Drews, A., Lee, C. H., & Kraume, M. (2006). Membrane fouling: A review on the role of EPS. *Desalination*, 200, 186-188.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and the related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Fernandez-Alba, A. R. (2006). Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. *CEIM; Dirección General de Universidades e Investigación*.
- Fogg, G. E., & Nalewajko, C. (1962). Extracellular release-glycollic acid. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, 157, 381-382.
- Fogg, G. E., & Thake, B. (1987). *Algal cultures and phytoplankton ecology*. University of Wisconsin Press.
- González-Camejo, J., Barat, R., Ruano, M., Seco, A., & Ferrer, J. (2018). Outdoor flat-panel membrane photobioreactor to treat the effluent of an anaerobic membrane bioreactor. Influence of operating, design and environmental conditions. *Water Science & Technology*, 78, 195-206.
- González-Camejo, J., Serna García, R., Viruela, A., Pachés, M., Durán, F., Robles, A., . . . Seco, A. (2017). Short and long-term experiments on the effect of sulphide on microalgae cultivation in tertiary sewage treatment. *Bioresource Technology*, 244, 15-22.
- Griffiths, M. J., Garcin, C., Van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 119-123.
- Guterstam, B., & Todd, J. (1990). Ecological engineering for wastewater treatment and its application in New England and Sweden. *Ambio*, 19, 173-175.
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Perspectives on microalgal CO₂ emission mitigations systems: A review. *Biotechnology Advances*, 29, 189-198.
- Honda, R., Boonnorat, J., Chiemchaisri, C., Chiemchaisri, W., & Yamamoto, K. (2012). Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *Bioresource Technology*, 125, 59-64.
- Huo, S., Wang, Z., Zhu, S., Zhou, W., Dong, R., & Yuan, Z. (2012). Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. *Bioresource Technology*, 121, 76-82.
- Judd, S., & Judd, C. (2011). *The MBR book: Principles and applications of membrane bioreactors in water and wastewater treatment* (2^a ed.). Elsevier.
- Kessel, M., & Eloff, J. N. (1975). The ultrastructure and development of the colonial sheath of *Microcystis marginata*. *Archives of Microbiology*, 106, 209-214.

- Kleerebezem, R., & Van Loosdrecht, M. C. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current opinion in biotechnology*, *18*, 207-212.
- Kuo, W. C. (1993). Production of soluble microbial chelators and their impact on anaerobic treatment. *Doctoral Thesis*. Iowa City: University of Iowa.
- Lau, P. S., Tam, N. F., & Wong, Y. S. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, *89*, 59-66.
- Lavoie, A., & De la Noüe, J. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach of wastewater biological tertiary treatment). *Water Research*, *19*, 1437-1442.
- Lee, H., Amy, G., Cho, J., Yoon, Y., Moon, S. H., & Kim, I. S. (2001). Cleaning strategies for flux recovery of an ultrafiltration membrane fouled by natural organic matter. *Water Research*, *35*, 3301-3308.
- Li, M., Zhu, W., Gao, L., & Lin, L. (2013). Changes in extracellular polysaccharide content and morphology of *Microcystis aeruginosa* at different specific growth rates. *Journal of Applied Phycology*, *25*, 1023-1030.
- Lin, H., Xie, K., Mahendran, B., Bagley, D., & Leung, K. (2009). Sludge properties and their effects on membrane fouling in submerged anaerobic membrane bioreactors (SAnMBR). *Water Research*, *43*, 3827-3837.
- Liu, Y., & Fang, H. H. (2003). Influence of Extracellular Polymeric Substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *33*, 237-273.
- Low, S., Ong, S., & Ng, H. (2016). Characterization of membrane fouling in submerged ceramic membrane photobioreactors fed with effluent from membrane bioreactors. *Chemical Engineering Journal*, *290*, 91-102.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265-275.
- Luján Facundo, M. J. (2016). Influencia de la Aplicación de Ultrasonidos en la Limpieza de Membranas de Ultrafiltración Empleadas en Separación de Proteínas de la Industria Lactea. *Tesis Doctoral*. Valencia: Universitat Politècnica de Valencia.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*, *15*, 377-390.
- Mamais, D., Noutsopoulos, C., Dimipoulou, A., Stasinakis, A., & Lekkas, T. (2014). Wastewater treatment process impact on energy savings and greenhouse gas emissions. *Water Science & Technology*, *71*, 303-308.
- Mara, D. D., & Pearson, H. (1986). Artificial freshwater environment: waste stabilization ponds. *Biotechnology*, *8*, 177-206.
- Marbelia, L., Bilad, M., Passaris, I., Discart, V., Vandamme, D., Beuckels, A., . . . Vankelecom, I. (2014). Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresource Technology*, *163*, 228-235.

- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Research*, *65*, 186-202.
- Mata, T. M., Almeida, R., & Caetano, N. (2013). Effect of the culture nutrients on the biomass and lipid productivities of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Chemical Engineering*, *32*, 973-978.
- Matamoros, V., Gutiérrez, R., Ferrer, I., García, J., & Bayona, J. M. (2015). Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, *288*, 34-42.
- Meng, F., Zhang, S., Oh, Y., Zhou, Z., Shin, H. S., & Chae, S. R. (2017). Fouling in membranes bioreactors: An updated review. *Water Research*, *114*, 151-180.
- Moawad, S. K. (1968). Inhibition of coliform bacteria by algal population in microoxidation ponds. *Environ*, *10*, 106-112.
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Acien Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, *20*, 491-515.
- Moosbrugger, R. E., Wentzel, M. C., Ekama, G. A., & Marais, G. (1992). Simple titration procedures to determine H₂CO₃ alkalinity and short chain fatty acid concentrations in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate, and sulphide weak acids/bases. WRC Report No. TT57/92. *Water Research Commission*. Pretoria, South Africa.
- Morales-Amaral, M. d., Gómez-Serrano, C., Acien, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2015). Outdoor production of *Scenedesmus* sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source. *Algal Research*, *12*, 99-108.
- Mulder, J. (2012). *Basic Principles of Membrane Technology*. Springer Science & Business Media.
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants. *Water Research*, *40*, 2799-2815.
- Murphy, J. M., Sexton, D. M., Jenkins, G. J., Boorman, P. M., Booth, B. B., Brown, C. C., . . . Wood, R. A. (2009). *UK climate projections science report: Climate change projections*. Exeter: Met Office Hadley Centre.
- Namkung, E., & Rittmann, B. E. (1986). Soluble microbial products (SMP) formation kinetics by biofilm. *Water Research*, *20*, 795-806.
- Noguera, D. R., Araki, N., & Rittmann, B. E. (1994). Soluble microbial products (SMP) in anaerobic chemostats. *Biotechnology and Bioengineering*, *44*, 1040-1047.
- Nouha, K., Kumar, R. S., Balasubramanian, S., & Tyagi, R. D. (2018). Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of Environmental Sciences*, 225-245.

- Olguín, E. J. (2012). Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30, 1031-1046.
- Oswald, W. J., & Gotaas, H. B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions American Society of Civil Engineers*, 122, 73-105.
- Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., . . . Fuglestvedt, J. (2014). *Climate Change 2014: Synthesis report contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (R. Pachauri, & L. Meyer, Edits.) Geneva, Switzerland: IPPC.
- Pachés, M., Martínez-Guijarro, R., González-Camejo, J., Seco, A., & Barat, R. (2018). Selecting the most suitable microalgae species to treat the effluent from an anaerobic membrane bioreactor. *Environmental Technology*.
- Park, J., Jin, H., Lim, B., Park, K., & Lee, K. (2010). Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101, 8649-8657.
- Patsios, S., & Karabelas, A. (2011). An investigation of the long-term filtration performance of a membrane bioreactor (MBR): the role of specific organic fractions. *Journal of Membrane Science*, 253, 102-115.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356.
- Plude, J. L., Parker, D. L., Schommer, O. J., Timmerman, R. J., Hagstrom, S. A., Joers, J. M., & Hnask, R. (1991). Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. *Applied and environmental microbiology*, 57, 1696-1700.
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9, 165-177.
- Pretel, R., Robles, A., Ruano, M., Seco, A., & Ferrer, J. (2016). Economic and environmental sustainability of submerged anaerobic MBR-based (AnMBR-based) technology as compared to aerobic-based technologies for moderate-/high-loader urban wastewater treatment. *Journal of Environmental Management*, 166, 45-54.
- Pritchard, G. G., Griffin, W. J., & Whittingham, C. P. (1962). The effect of carbon dioxide concentration, light intensity and isonicotinic acid hydrazide on the photosynthetic production of glycolic acid by *Chlorella*. *Journal of Experimental Botany*, 13, 176-184.
- Pulz, O., & Scheibnbogen, K. (1998). Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. *Bioprocess and algae reactor technology*, 59, 123-152.
- Rai, L. C., Gaur, J. P., & Kumar, H. D. (1981). Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Reviews*, 56, 99-151.
- Reynolds, C. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.

- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, *102*, 100-112.
- Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P. D., Arbib, Z., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., & Perales, J. A. (2013). Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae un urban wastewater: Prediction from a batch experiment. *Bioresource Technology*, *127*, 456-463.
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Pachés, M., Seco, A., & Ferrer, J. (2014). Mixed microalgae culture for ammonium removal in the absence of phosphorus: Effect of phosphorus supplementation and process modeling. *Process Biochemistry*, *49*, 2249-2257.
- Shen, H., Niu, Y., Xie, P., Tao, M., & Yang, X. (2011). Morphological and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* as a result of interactions with heterotrophic bacteria. *Freshwater Biology*, *56*, 1065-1080.
- Smeaton, J. R., & Elliot, W. H. (1967). Selective releases of ribonuclease-inhibitor from *Bacillus subtilis* cells by cold shock treatment. *Biochemical and biophysical research communications*, *26*, 75-81.
- Smith, P. J., Vigneswaran, S., Ngo, H. H., Ben-Aim, R., & Nguyen, H. (2006). A new approach to backwash initiation in membrane systems. *Journal of Membrane Science*, *278*, 381-389.
- Sweity, A., Ying, W., Belfer, S., Oron, G., & Herzberg, M. (2011). pH effects on the adherence and fouling propensity of extracellular polymeric substances in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, *378*, 186-193.
- Talbot, P., & De la Noüe, J. (1993). Tertiary treatment of wastewater eith *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Research*, *27*, 153-159.
- UNESCO. (2015). *WATER FOR A SUSTAINABLE WORLD. The United Nations World Water Development Report*. París, Francia: UNESCO.
- Viruela, A., Murgui, M., Gómez-Gil, T., Durán, F., Robles, A., Ruano, M., . . . Seco, A. (2016). Water resource recovery by means of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors using the effluent from anaerobic membrane bioreactor fed with pre-treated sewage. *Bioresource Technology*, *218*, 447-454.
- Walsh, C. L., Blenkinsop, S., Fowler, H. J., Burton, A., Dawson, R. J., Glenis, V., . . . Kilsby, C. (2016). Adaptation of water resource systems to an uncertain future. *Hydrology and Earth System Sciences*, *20*, 1869-1884.
- Wang, B., Lan, C., & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, *30*, 904-912.
- Wang, Z., Wu, Z., & Tang, S. (2009). Extracellular polymeric substances properties and their effects of membrane fouling in a submerged membrane bioreactor. *Water Research*, *43*, 2504-2512.

- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H. C. (1999). What are the bacterial extracellular polymeric substances? En *Microbial extracellular polymeric substances* (págs. 1-19). Berlin: Springer.
- Wright, P. J., & Weber, J. H. (1991). Bisorption of inorganic tin and methylin compounds by estuarine macroalgae. *Environmental Science & Technology*, 25, 287-294.
- Wu, X. F., & Kosaric, N. (1991). Removal of organochlorine compounds in an upflow flocculated algae phobioreactor. *Water Science & Technology*, 24, 221-232.
- Xu, M., Li, P., Tang, T., & Hu, Z. (2015). Roles of SRT and HRT of an algal membrane bioreactor system with a tanks-in-series configuration for secondary wastewater effluent polishing. *Ecological Engineering*, 85, 257-264.
- Yang, Z. T., & Guo, S. H. (2008). Energy trapping in power transmission though a circular cylindrical elastic shell by finite piezoelectric transducers. *Ultrasonics*, 48, 716-723.
- Yang, Z., & Kong, F. (2013). Abiotic in colony formation: effects of nutrition and light on extracellular polysaccharide production and cell aggregates og *Microcystis aeruginosa*. *Chinese Journal of Oceanology and Limonology*, 31, 796-802.
- Yang, Z., Liu, Y., Ge, J., Wang, W., Chen, Y., & Montagnes, D. (2010). Aggregate formation and polysaccharide content of *Chlorella pyrenoidosa* Chick (Chlorophyta) in response to simulated nutrient stress. *Bioresource Technology*, 101, 8336-8341.
- Yee, N., Benning, L. G., Phoenix, V. R., & Ferris, F. G. (2004). Characterization of metal-cyanobacteria sorptionreactions: A combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation. *Environmental Science & Technology*, 38, 775-782.
- Znad, H., Naderi, G., Ang, H., & Tade, M. (2012). CO2 biomitigation and biofuel production usgin microalgae: photobioreactors development and future direction. *Advances in Chemical Engineering*, 229-244.
- Zou, N., & Richmond, A. (1999). A effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and on EPA in *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biotechnology*, 70, 351-356.
- Zsirai, T., Buzatu, P., Aerts, P., & Judd, S. (2012). Efficacy of relaxation, backflushing, chemical cleaning and clogging removal for an immersed hollow fibre membrane bioreactor. *Water Research*, 46, 4499-4507.