



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ETS INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS

TRABAJO DE FIN DE MASTER

Estudio de la competencia entre microalgas y bacterias
amonioxidantes en la eliminación de nutrientes del efluente
de un reactor anaerobio de membranas (AnMBR).

Presentado por

Montero Marqués, Paula Maria

Para la obtención del

Master Universitario en Ingeniería Ambiental

Curso: 2018/2019

Fecha: Abril-2019

Tutor: Dr. Ramón Barat Baviera

Cotutor: Josué González Camejo



CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	9
1.1	Contexto.....	9
2	ESTADO DEL ARTE.	13
2.1	Tecnologías sostenibles en la gestión de aguas residuales.....	13
2.1.1	Digestión anaerobia. AnMBR	13
2.1.2	Tratamiento de aguas residuales con microalgas	13
2.1.2.1	<i>Microalgas. Generalidades.....</i>	<i>15</i>
2.1.2.2	<i>Tipos de cultivo.....</i>	<i>16</i>
2.2	Depuración del efluente de un AnMBR mediante microalgas.....	18
2.2.1	Características del efluente.....	19
2.2.2	Factores que afectan el crecimiento de las algas y absorción de nutrientes	20
2.2.2.1	<i>Luz</i>	<i>20</i>
2.2.2.2	<i>Temperatura.....</i>	<i>21</i>
2.2.2.3	<i>pH</i>	<i>21</i>
2.2.2.4	<i>Oxígeno</i>	<i>22</i>
2.2.2.5	<i>Agitación</i>	<i>22</i>
2.2.2.6	<i>Nutrientes.....</i>	<i>22</i>
2.2.2.7	<i>Sulfuro</i>	<i>24</i>
2.2.2.8	<i>Competencia con otros organismos</i>	<i>24</i>
2.2.3	Competencia entre AOB y microalgas.....	25
2.2.3.1	<i>Nutrientes.....</i>	<i>25</i>
2.2.3.2	<i>Fotoinhibición.....</i>	<i>25</i>
2.2.3.3	<i>Temperatura.....</i>	<i>26</i>
2.2.3.4	<i>Tiempo de retención hidráulico.....</i>	<i>26</i>
2.2.4	Inhibición del proceso fotosintético en presencia de nitrito.	26
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1	Cultivo y alimento	30
4.2	Diseño de los experimentos.....	30
4.2.1	Configuración experimental.....	30
4.2.2	Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes	32
4.2.3	Ensayos de inhibición por NO ₂ (corto plazo)	33

4.2.4	Ensayos de inhibición por NO ₂ (largo plazo)	33
4.2.5	Ensayo de Tiempo de Retención Celular (TRC)	34
4.3	Métodos analíticos	37
4.3.1	Determinación de la densidad óptica (OD ₆₈₀)	37
4.3.2	Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)	37
4.3.1	Medición de nutrientes	38
4.4	Cálculos realizados	38
4.4.1	Productividad de biomasa	38
4.4.2	Velocidad de consumo y rendimiento de nutrientes	38
4.4.3	Velocidad de producción de oxígeno	39
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1	Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes	41
5.2	Ensayos de inhibición por NO ₂ ⁻ (corto plazo)	58
5.3	Ensayos de inhibición por NO ₂ ⁻ (largo plazo)	62
5.4	Ensayo de Tiempo de Retención Celular (TRC)	71
6	CONCLUSIONES	81
7	REFERENCIAS	83

Índice de tablas

Tabla 1: Composición química de las microalgas en base seca (<i>Becker, 2007</i>)	15
Tabla 2: Resumen de las características de los efluentes informados en estudios de tratamiento anaeróbica de aguas residuales urbanas (<i>Delgado Vela et al., 2015</i>)	19
Tabla 3: Tabla resumen de las condiciones de cada uno de los experimentos realizados.	36
Tabla 4: Rango de medida y método empleado para la medición de nutrientes. Smartchem 200	38
Tabla 5: Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes. Concentración de N-NO_2^- al comienzo de cada ensayo	41
Tabla 6: Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes (1.1-1.5). Resumen de resultados. ...	57
Tabla 7: Ensayos de inhibición por NO_2^- a largo plazo (3.1-3.3). Resumen de resultados	70
Tabla 8: Ensayo de tiempo de retención hidráulico. Resumen de resultados	79

Índice de figuras

Figura 1: Mapa físico. Cambio previsto de la escasez del agua de 2010 a 2050. (<i>UNESCO</i> , 2018)	9
Figura 2: Mapa físico. Relación entre las aguas residuales tratadas y las totales generadas (expresadas en porcentaje) en diferentes países. (<i>Sato et al.</i> 2013).....	10
Figura 3: Objetivos de desarrollo sostenible. Agenda 2030 aprobada por la Asamblea General de las Naciones Unidas.....	11
Figura 4: Sistema de cultivo abierto. Estanques de algas de alta velocidad.....	16
Figura 5: Sistemas cerrados. a) Tubular; b) De columna vertical; c) De placa plana	18
Figura 6: Diagrama de un MPBR	18
Figura 7: Evolución de la tasa fotosintética en función de la intensidad lumínica	21
Figura 8: efecto del pH sobre la concentración de amoníaco libre a 25°C.....	23
Figura 9: Diagrama de las interacciones simbióticas entre microalgas y bacterias heterótrofas en la depuración de aguas residuales (<i>Mujtaba & Lee</i> , 2016)	25
Figura 10: Metabolismo de las AOB.	25
Figura 11: Configuración Tipo 1: a) Configuración experimental; b) Esquema de iluminación ..	31
Figura 12: Configuración Tipo 2: a) Configuración experimental; b) Esquema de iluminación..	32
Figura 13: Recta de calibración empleada para el cálculo de los SSV en función de la OD ₆₈₀	37
Figura 14: Ensayo 1.1. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).	41
Figura 15: Ensayo 1.1. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR" A" (a) y en FBR" B" (b).	42
Figura 16: Ensayo 1.2. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).	44
Figura 17: Ensayo 1.2. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR" A" (a) y en FBR" B" (b).	46
Figura 18: Ensayo 1.3. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).	47
Figura 19: Ensayo 1.3. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR" A" (a) y en FBR" B" (b).	48
Figura 20: Ensayo 1.4. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).	50
Figura 21: Ensayo 1.4. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR" A" (a) y en FBR" B" (b).	51
Figura 22: Ensayo 1.5. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).	53
Figura 23: Ensayo 1.5. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR" A" (a) y en FBR" B" (b).	54

Figura 24: Ensayo 2.1. Evolución de la concentración de DO ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) en el FBR en presencia de diferentes concentraciones de NO_2^- (0, 5, 10 y 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); y relación entre la $\text{OPR}_{\text{MA,F}}^*$ y la concentración de NO_2^- (bajo)	59
Figura 25: Ensayo 2.2. Evolución de la concentración de DO ($\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) en el FBR en presencia de diferentes concentraciones de NO_2^- (0, 5, 10 y 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); y relación entre la $\text{OPR}_{\text{MA,F}}^*$ y la concentración de NO_2^- (bajo)	61
Figura 26: Ensayo 3.1. Evolución de la concentración de SSV ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para cada FBR.	62
Figura 27: Ensayo 3.1. Evolución de la concentración de N-NH_4^+ (izquierda) y NTs (derecha) en $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$	63
Figura 28: Ensayo 3.1. Evolución de la concentración de P-PO_4^{3-} en $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$	64
Figura 29: Ensayo 3.2. Evolución de la concentración de SSV ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para cada FBR.	65
Figura 30: Ensayo 3.2. Evolución de la concentración de N-NH_4^+ (izquierda) y NTs (derecha) en $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$	66
Figura 31: Ensayo 3.2. Evolución de la concentración de P-PO_4^{3-} en $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$	66
Figura 32: Ensayo 3.3. Evolución de la concentración de SSV ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para cada FBR.	67
Figura 33: Ensayo 3.3. Evolución de la concentración de N-NH_4^+ (izquierda) y NTs (derecha) en $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$	68
Figura 34: Ensayo 3.3. Evolución de la concentración de P-PO_4^{3-} en $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$	69
Figura 35: Ensayo 4.1. Productividad de biomasa ($\text{mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) en ambos FBR	71
Figura 36: Ensayo 4.1. Evolución de la velocidad de eliminación de NTs (izquierda) y N-NH_4^+ (derecha) en FBR" A" y FBR" B" ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	72
Figura 37: Ensayo 4.1. Evolución de la velocidad de eliminación de P-PO_4^{3-} en FBR" A" y FBR" B" ($\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	73
Figura 38: Ensayo 4.2.1. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).....	74
Figura 39: Ensayo 4.2.1. Evolución de la concentración de NTs, NO_x y P-PO_4^{3-} en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).....	75
Figura 40: Ensayo 4.2.2. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).....	76
Figura 41: Ensayo 4.2.2. Evolución de la concentración de NTs, NO_x y P-PO_4^{3-} en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).....	77

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto

La presión demográfica, el ritmo de desarrollo económico, los cambios en los patrones de consumo, la urbanización, el cambio climático y la contaminación ejercen una fuerte presión sobre el agua, incrementando el riesgo de sufrir escasez. Actualmente se estima que casi la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de sufrir escasez y, además, se espera que para 2050 la población aumente entre un 22 y un 32% respecto de la del 2017 (UNESCO, 2018).

La escasez de agua surge en el momento en el que la demanda supera los recursos hídricos. El consumo desmedido de este recurso ha incrementado, a nivel mundial, a un ritmo dos veces superior al aumento de la población en el siglo XX (FAO, 2013). Actualmente, numerosos países se encuentran en situación de escasez de agua y se prevé que la disponibilidad de agua superficial para 2050 será menor (Figura 1).

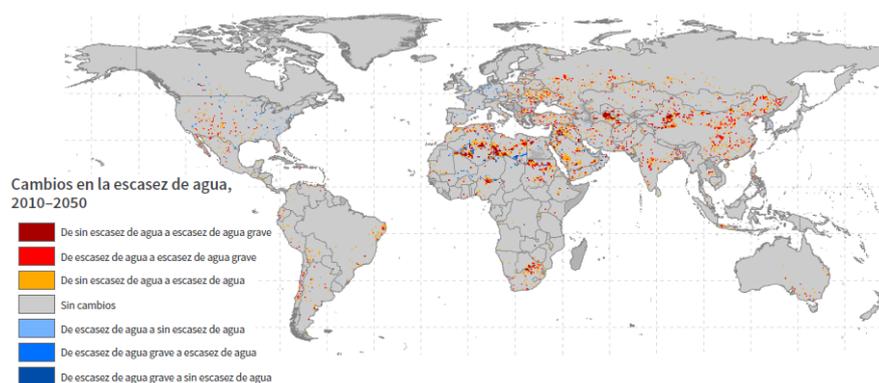


Figura 1: Mapa físico. Cambio previsto de la escasez del agua de 2010 a 2050. (UNESCO, 2018)

Por otro lado, la práctica intensiva de la actividad agrícola acentúa esta problemática. Se estima que el riego representa el 70% de las extracciones de agua potable (HLPE, 2015). Además, constituye una fuente de contaminación importante. Las prácticas agrícolas derivan en un exceso de nutrientes, principalmente nitratos y fosfatos, que terminan bien percolando, llegando a contaminar masas de agua subterránea o bien arrastrados por escorrentía superficial hacia corrientes de agua, ríos, lagos y estuarios.

A la contaminación del agua por nutrientes proveniente de la agricultura, se suma el vertido de aguas residuales sin tratar. Este hecho se traduce en un deterioro creciente de la calidad general del agua con impactos perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas (UNESCO, 2018). Empleando la clasificación de países por categorías económicas, se tiene que los países de ingresos altos tratan el 70% de las aguas residuales generadas, los países de ingresos medianos-altos el 38% y los de ingresos medianos bajos y bajos tratan el 28 y el 8% respectivamente (Figura 2).

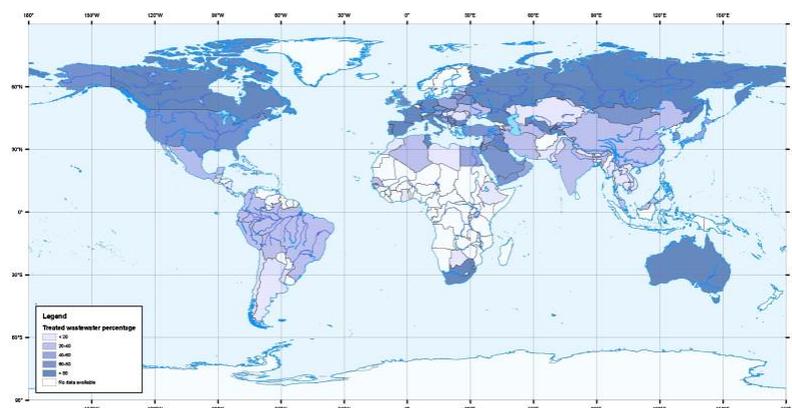


Figura 2: Mapa físico. Relación entre las aguas residuales tratadas y las totales generadas (expresadas en porcentaje) en diferentes países. (Sato et al. 2013)

Además, la escasez de agua es uno de los principales impactos potenciales del cambio climático. El clima está cambiando debido a las actividades humanas. Las emisiones de GEI entre 2000 y 2010 crecieron más que en las tres décadas previas. En 2010, el 35% de las emisiones fueron originadas por el sector energético, seguido de la silvicultura con un 24%, la industria con un 21% y el transporte y el sector de la construcción con un 14 y 6,4% respectivamente. Además, de las emisiones de GEI registradas en 2010, el 65% corresponden a dióxido de carbono. Con todo, las proyecciones de cambio climático prevén que las variaciones espaciales y temporales de las dinámicas del ciclo del agua empeorarán, produciendo una reducción de los recursos de aguas superficiales y subterráneas en la mayoría de las regiones subtropicales secas, agudizando la brecha entre la oferta y la demanda de agua. Este escenario podría cambiar si se llevan a cabo medidas enfocadas a reducir las emisiones de CO₂. Los sectores como el eléctrico y transporte tienen un gran potencial de mitigación siempre y cuando se adopte un enfoque holístico que combine medidas para reducir las emisiones netas, descarbonizar el suministro de energía y aumentar los sumideros de carbono terrestres (IPCC, 2014).

Debido a la situación en la que nos encontramos se están realizando esfuerzos, a través del desarrollo de políticas y objetivos, para abordar los desafíos a los que nos enfrentamos. En septiembre de 2015, la Asamblea General de las Naciones Unidas, aprobó la Agenda 2030 con el objetivo de transformar el paradigma de desarrollo actual, al desarrollo sostenible, inclusivo y con visión a largo plazo. Esta agenda se compone de un total de 17 objetivos (Figura 3) entre los cuales podemos destacar el objetivo 6. “Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos”; el objetivo 7. “Garantizar el acceso a una energía asequible, segura, sostenible y moderna para todos”; y el objetivo 12. “Garantizar modalidades de consumo y producción sostenibles”.



Figura 3: Objetivos de desarrollo sostenible. Agenda 2030 aprobada por la Asamblea General de las Naciones Unidas
Por otro lado, la Unión Europea, a través de la Directiva 2010/27/UE, puso en marcha la estrategia 20/20/20, la cual consiste en:

- Reducir un 20% las emisiones de gases de efecto invernadero
- Obtener el 20% de la energía de fuentes renovables
- Aumentar en un 20% la eficiencia energética

Según las últimas proyecciones realizadas por la EEA (European Environment Agency), muestran que las medidas encaminadas a la reducción de emisiones son insuficientes para cumplir el objetivo establecido en la Agenda 2030 (reducir el 40% de los GEI). Sin embargo, el objetivo para 2020 podría llegar a cumplirse, pero con un margen muy estrecho (21,9% de reducción).

En este contexto orientado a la economía circular, donde se busca un equilibrio entre el desarrollo económico, la protección de los recursos y la sostenibilidad ambiental, la gestión de las aguas residuales tiene un gran potencial para mitigar tanto la escasez de agua, como las emisiones de GEI. Para ello, deben contemplarse los siguientes aspectos:

- Enfocar el agua residual como una fuente alternativa de agua (reutilización para agua de riego/industria).
- Esforzarse en la recuperación de productos: directos tales como nutrientes (nitrógeno y fósforo); e indirectos (subproductos) obtenidos a través de diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales, como compost o biogás para la producción de energía.
- Considerar la simbiosis industrial: los residuos generados en las plantas de tratamiento de aguas residuales pueden constituir un recurso para otro tipo de industria. Actualmente existen multitud de estudios que proponen el empleo de microalgas para la depuración de aguas residuales con el objetivo de producir biomasa algal a partir de la cual se podría generar biodiesel (*Rawat et al., 2011, Pittman et al., 2011, Fazal et al., 2018, Kadir et al., 2018*).

2 ESTADO DEL ARTE.

2.1 Tecnologías sostenibles en la gestión de aguas residuales

2.1.1 Digestión anaerobia. AnMBR

Algunos de los inconvenientes que presentan los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales son la elevada demanda de energía debido a los sistemas de aireación; la producción de grandes cantidades de lodos, debido al alto rendimiento de los microorganismos implicados en los procesos de degradación de la materia orgánica; y el desaprovechamiento de los recursos potenciales disponibles en las aguas residuales (*Smith et al.* 2012).

Un enfoque sostenible frente al tratamiento de aguas residuales urbanas convencional, consiste en la aplicación de **tratamientos anaerobios** (*Giménez et al.* 2011). Los principales beneficios inherentes a este tipo de tratamiento incluyen una menor demanda de energía, ya que se evita el empleo de sistemas de aireación; la producción de biogás con capacidad de emplearse como energía limpia; y una menor producción de lodos debido al bajo rendimiento de los microorganismos involucrados (*Ho y Sung*, 2010).

Dado que los microorganismos involucrados en los tratamientos anaerobios crecen muy lentamente, se necesitan elevados tiempos de retención celular (TRC) para que el proceso de degradación de la materia orgánica se lleve a cabo de forma correcta. De este modo, los tiempos de retención hidráulicos (TRHs) deben ser elevados, traduciéndose en grandes volúmenes de trabajo y dificultando la implementación de este tipo de tratamientos (*Haandel y Lettinga*, 1994). Sin embargo, combinando los reactores anaerobios con la tecnología de membrana, resulta posible desacoplar el TRC del TRH, de forma que se reduce el volumen, logrando una alta concentración de biomasa y un efluente libre de sólidos. Este sistema recibe el nombre de reactor anaerobio de membrana (AnMBR) y se ha demostrado que, en aguas residuales resulta eficiente para obtener un efluente de calidad en cuanto a concentración de sólidos se refiere (*Huang et al.*, 2011, *Ruiz-Martínez et al.*, 2012).

El interés sobre la investigación del empleo de sistemas anaerobios de membrana (AnMBR) para la depuración de aguas residuales ha crecido sustancialmente durante los últimos años. Sin embargo, los procesos anaerobios apenas reducen la concentración de nutrientes en el agua residual, de modo que la concentración de nutrientes en el efluente de un AnMBR resulta elevada, dificultando el cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos en la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Por este motivo se hace necesario un tratamiento posterior para la eliminación de nitrógeno y fósforo antes de descargar en área sensibles (*Smith et al.* 2012).

2.1.2 Tratamiento de aguas residuales con microalgas

Los sistemas de tratamiento convencionales dificultan la eliminación conjunta de N y P y además, los procesos tales como nitrificación biológica-desnitrificación para la eliminación de

nitrógeno o la eliminación biológica de fósforo, requieren un aporte considerable de energía y materia orgánica de la que no se dispone en el efluente del reactor AnMBR (*Ruiz-Martinez et al.*, 2012).

Otra de las alternativas sostenibles para el tratamiento de aguas residuales frente a las técnicas convencionales consiste en la **eliminación de nutrientes mediante microalgas**. Los nutrientes presentes en el efluente de las aguas residuales son principalmente nitrógeno en forma de amonio, nitrito o nitrato; y fósforo en forma de ortofosfato (*Horan*, 1990). El vertido de aguas residuales con un tratamiento deficiente puede desencadenar el crecimiento descontrolado de algas en los sistemas receptores, es decir, eutrofización (*Corell*, 1998).

El tratamiento de aguas residuales mediante microalgas para eliminar nutrientes (N y P) y proporcionar oxígeno a las bacterias aerobias, fue propuesto en 1957 por *Oswald & Gotaas*. A raíz de esta propuesta comenzó a desarrollarse un interés significativo, principalmente en países como Australia, Estados Unidos, Tailandia, Taiwán y México (*Abdel-Raouf et al.*, 2012).

Debido a su capacidad fotosintética, este tipo de microorganismos convierte la energía solar en biomasa, actúan como sumidero de CO₂ y elimina el N y P presente en las aguas residuales ya que los emplean como fuente de nutrientes. Además, se ha demostrado que tienen capacidad para eliminar metales pesados y compuestos orgánicos tóxicos (*Rai et al.*, 1981). Algunas especies de algas son capaces de asimilar concentraciones significativas de iones metálicos de compuestos tóxicos a partir de soluciones acuosas (*Singh et al.*, 2012), pudiendo resultar como un método factible para la remediación de aguas residuales contaminadas con metales pesados.

El interés en los cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales se debe a que los sistemas de tratamiento convencionales presentan algunos aspectos susceptibles de mejora:

- La eficiencia del tratamiento depende del tipo de nutriente a eliminar;
- Los costes de operación son muy elevados
- Los procesos químicos a menudo conllevan una contaminación secundaria
- No se recuperan nutrientes potenciales como el nitrógeno y el fosfato presentes en las aguas residuales
- No se aprovechan los subproductos potenciales del tratamiento de las aguas residuales
 - Los ácidos grasos presentes en estos microorganismos se pueden extraer para obtención de **biocombustible** (*Guldhe et al.*, 2017), una opción muy atractiva por su carácter renovable y biodegradable.
 - La biomasa algal puede someterse al proceso de digestión anaerobia con el objetivo de producir **biogás** para la obtención de energía (*Ward et al.*, 2014).
 - Recientemente se ha estudiado, a escala laboratorio que, la combinación de fangos procedentes de depuradora con biomasa algal, para la obtención de **compost** presenta mayor valor agronómico que el compost convencional, debido a su mayor contenido en nutrientes (*Ruiz-Barriga*, 2018).

Como ejemplo, *Arbib et al. (2014)*, estudiaron la capacidad de tres microalgas verdes: *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* y *Scenedesmus* en la eliminación de nutrientes. Los resultados indicaron una eficiencia de eliminación de nutrientes superior al 90% para N inorgánico y 98% de P. inorgánico.

2.1.2.1 Microalgas. Generalidades

Las microalgas son organismos unicelulares capaces de sobrevivir individualmente, en cadena o en agrupaciones (*Kiepper, 2013*). En ficología aplicada, el término microalga incluye a las algas microscópicas en sentido estricto, así como a las bacterias con capacidad para realizar el proceso de fotosíntesis oxigénica, conocidas como Cianobacteria (*Richmond, 2004*).

Generalmente, las microalgas son organismos fotoautótrofos, sin embargo, las rutas metabólicas son diferentes en cada tipo de alga. Según su metabolismo, las algas pueden clasificarse del siguiente modo (*Brennan & Owende, 2010*):

- Fotoautótrofas: obtienen la energía proveniente de la luz solar y su fuente de carbono es inorgánica.
- Fotoheterótrofas: Obtienen la energía proveniente de la luz solar y su fuente de carbono es orgánica.
- Mixotróficas: Emplea fuentes de carbono tanto inorgánico como orgánico. Obtienen la energía de la luz solar.
- Heterótrofas: Tienen la capacidad de desarrollarse en ausencia de luz. Tanto la energía como la fuente de carbono proviene de compuestos orgánicos.

Dado que se han realizado muchos análisis de la composición química de las algas a lo largo del tiempo, la siguiente tabla muestra una visión general de los principales componentes (*Becker, 2007*).

Tabla 1: Composición química de las microalgas en base seca (*Becker, 2007*)

Alga	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25-30	4–7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51–58	12–17	14–22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena Gracilis</i>	39–61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Oblicuo del scenedesmus</i>	50–56	10–17	12-14
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33–64	11-21
<i>Arthrospira maxima</i>	60–71	13-16	6-7
<i>Espirulina platensis</i>	46–63	8–14	4-9
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

2.1.2.2 Tipos de cultivo

Los sistemas de cultivo de microalgas se pueden clasificar principalmente en dos grupos: sistemas abiertos y sistemas cerrados. La diferencia principal entre estos grupos es el grado de exposición al ambiente exterior.

- *Sistemas abiertos*

Los cultivos mixtos de microalgas y bacterias para el tratamiento de aguas residuales se cultivan en estanques de algas de alta velocidad (HRAP). Debido a la gran cantidad de biomasa algal necesaria para la producción de biocombustibles, se propuso emplear las aguas residuales como medio de cultivo para la producción de microalgas a gran escala, empleando HRAP (Oswald & Golueke, 1960).

Este tipo de estanque suele construirse en hormigón con forma ovalada y escasa profundidad, de entre 0,3 y 0,4m. De esta forma se consigue proporcionar, a todo el volumen de cultivo, suficiente luz solar para permitir llevar a cabo el proceso de fotosíntesis de todas las células de microalgas. La mezcla y circulación del cultivo de microalgas por la pista de rodadura se lleva a cabo mediante ruedas de paletas. La agitación, promueve el crecimiento de las algas, evita la sedimentación y favorece la transferencia de masa de oxígeno con la atmosfera (stripping).

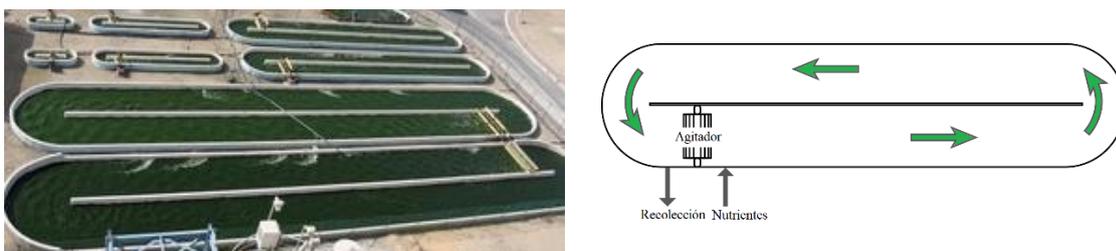


Figura 4: Sistema de cultivo abierto. Estanques de algas de alta velocidad

Se trata de sistemas fáciles de operar, construir y diseñar. Sin embargo, presentan varios inconvenientes, ya que, al estar expuestos a la intemperie, la eficiencia del tratamiento de aguas residuales puede verse afectada por la intensidad de la luz, la temperatura, el pH y la contaminación (Delgadillo-Mirquez et al. 2016). Los requerimientos de espacio son muy elevados (Acién et al., 2016).

- *Fotobiorreactores (FBR)*

Los sistemas cerrados son ventajosos frente al sistema abierto ya que reducen la contaminación del cultivo; permiten la selección de especies de microalga; permiten controlar variables tales como el pH, la temperatura, la luz, concentración de CO₂, etc.; disminuyen las pérdidas por evaporación; y logran trabajar con mayores concentraciones de biomasa.

Este tipo de sistemas se construyen en materiales translucidos tales como plástico, metacrilato o vidrio con el objetivo maximizar la penetración de la luz solar en el interior de los reactores. Se diseñan principalmente para la producción controlada de biomasa en condiciones sin intercambio directo de gases y contaminantes con el ambiente exterior. Dentro de este

sistema, se han diseñado diversos tipos de FBR tales como FBR tubulares, de columna vertical o de placa plana (Figura 5).

- *Tubulares*

Se trata de uno de los tipos de FBR más adecuado para el cultivo de biomasa al aire libre. Suele construirse por una matriz tubos de vidrio o de plástico que permiten la penetración y distribución uniforme de la luz. La matriz puede ser vertical, horizontal, inclinada o cónica. El cultivo se recircula con una bomba o con un sistema tipo airlift. Velocidades inferiores a $0,35\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, pueden provocar el colapso del cultivo (*Molina et al.*, 2001).

La principal ventaja de este tipo de FBR es que, gracias a la gran superficie expuesta a la iluminación, resulta adecuado para cultivos al aire libre, obteniendo productividades de biomasa elevadas y resultando relativamente baratos. Sin embargo, debido a su configuración, pueden producirse gradientes de pH, O_2 y CO_2 a lo largo de los tubos; la transferencia de masa de oxígeno es deficiente, lo que puede provocar la inhibición de las algas si la concentración de oxígeno es superior al 400%; la limpieza de los tubos debido a la adhesión de las microalgas a las paredes del FBR resulta dificultosa; y, además, los requisitos de espacios son elevados. Por otro lado, mediante la instalación de mezcladores estáticos, consigue aumentarse la eficiencia de transferencia de oxígeno (*Ugwu & Ogbonna*, 2002).

- *De columna vertical*

Una alternativa a los FBR tubulares consiste en FBR de columna vertical. Las dimensiones óptimas de este tipo de FBR son aproximadamente 0,2m de diámetro y 4m de altura (*Miron et al.*, 1999). Están dotados de un sistema de desgasificación en la parte inferior a través del cual se introduce el aire necesario para garantizar una mezcla completa y se elimina el exceso de oxígeno producido en el proceso de fotosíntesis.

Este tipo de FBR son compactos, de bajo coste energético, fáciles de sobre escalar y de operar con una única especie de cultivo. Sin embargo, su construcción requiere materiales sofisticados y al sobre escalarlo, se reduce la superficie de iluminación.

- *De placa plana*

En cuanto a los FBR de placa plana, presentan la gran ventaja de disponer de una gran superficie de iluminación. Así, resulta adecuado para cultivos al aire libre debido a la elevada eficiencia fotosintética. Se obtienen altas productividades de biomasa, y la transferencia de oxígeno es adecuada. Sin embargo, presenta algunas desventajas ya que requiere muchos compartimentos y materiales de soporte y dificulta el control de la temperatura (*Ugwu & Uchiyama*, 2008).

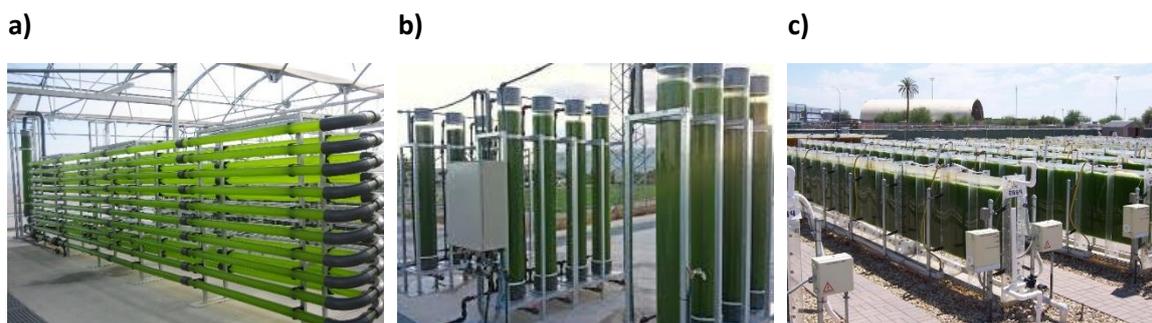


Figura 5: Sistemas cerrados. a) Tubular; b) De columna vertical; c) De placa plana

- *Fotobiorreactores de membrana (MPBR)*

Una de las limitaciones de los FBR es que restringe su aplicación para la producción de biomasa debido al lavado de las microalgas (*Tang et al., 2012*). Generalmente, las concentraciones alcanzadas en estos cultivos son muy bajas. Debido al reducido tamaño de las microalgas, permanecen en suspensión de forma que no es posible desacoplar el TRC del TRH. Una solución novedosa para solventar este inconveniente consiste en el acoplamiento de una membrana al fotobiorreactor con el objetivo de retener la biomasa. Este sistema recibe el nombre de fotobiorreactor de membrana (MPBR). Se ha demostrado que el MPBR es capaz de operar con una mayor carga de nutrientes y conseguir una mayor productividad de biomasa que los FBR (*Bilad et al., 2014*).

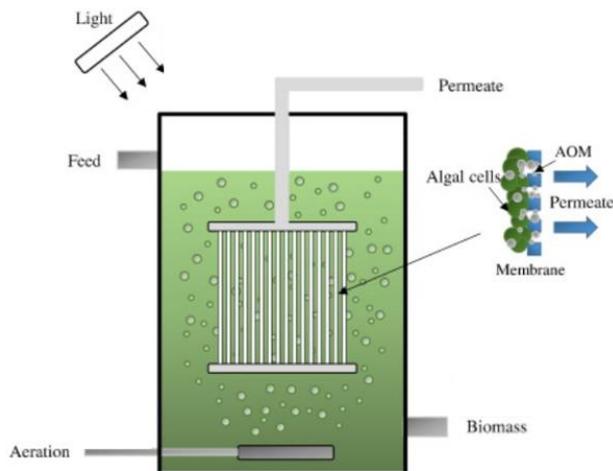


Figura 6: Diagrama de un MPBR

2.2 Depuración del efluente de un AnMBR mediante microalgas.

Los cultivos de microalgas ofrecen una solución sostenible para los tratamientos terciarios, debido a su elevada capacidad para eliminar compuestos inorgánicos de nitrógeno y fósforo, presentes en las aguas residuales (*Blier et al., 1995*).

Arbib et al., (2013) evaluó el rendimiento a escala piloto de eliminación de N y P de un agua residual real, entre un FBR tubular y HRAP. Tanto la productividad como la eliminación de nutrientes fue superior en el FBR tubular. Además, en este FBR las concentraciones de

nutrientes se mantuvieron por debajo del límite establecido en la Directiva 91/271/CEE. Sin embargo, tuvieron problemas de bioincrustación en las paredes del FBR.

Un sistema novedoso consiste en la depuración del efluente de un AnMBR mediante microalgas.

Ruiz-Martínez et al. (2012) evaluaron el rendimiento de eliminación de nutrientes del efluente de un AnMBR mediante un cultivo mixto microalgas a escala laboratorio en un FBR convencional, obteniendo un rendimiento de eliminación del 67,2% para el amonio y del 97,8% para el ortofosfato. Dado que se emplearon aguas residuales reales, los resultados del estudio le confieren una gran robustez, pudiendo determinar la factibilidad del empleo de un sistema de cultivo mixto de microalgas para la eliminación de nutrientes de un AnMBR.

Por otro lado, *Viruela et al. (2016)* evaluaron el rendimiento de eliminación de nutrientes del efluente de un AnMBR, a escala piloto, de tres FBR de placa plana. Observaron una disminución significativa en la productividad de la biomasa a temperaturas inferiores a 20°C y que la irradiancia afectó al rendimiento de eliminación de nutrientes. Dado que el lavado de la biomasa es un factor limitante, indicaron que el empleo de un MPBR podría mejorar el rendimiento del proceso.

La literatura disponible sobre la depuración de efluentes de AnMBR mediante microalgas es escasa. Se necesitan realizar investigaciones sobre los factores que pueden afectar a este tipo de procesos tales como las características del efluente y las interacciones entre los organismos presentes en el cultivo.

2.2.1 Características del efluente

En cuanto a sólidos, diferentes estudios muestran que la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) en el efluente de un AnMBR para el tratamiento de aguas residuales es despreciable (*Huang et al., 2011; Gimenez et al., 2011; Gouveia et al., 2015*).

Respecto a los nutrientes, como se ha comentado en el apartado 2.1.1, la concentración de amonio y fosfato puede ser elevada. Por otro lado, la concentración de sulfatos varía según el tipo de afluente. Durante el tratamiento anaerobio, las bacterias reductoras de sulfato reducen el sulfato a sulfuro y gas sulfuro de hidrógeno, compuestos corrosivos, malolientes y peligrosos para la salud. Por otra parte, el proceso de metanogénesis convierte el carbono orgánico en productos gaseosos (dióxido de carbono y metano) y productos disueltos (ácidos orgánicos y metano). Debido a que la solubilidad del metano aumenta al disminuir la temperatura, la concentración de este compuesto en el afluente variará según el clima. Así, las características de los efluentes de AnMBR obtenidas de diferentes estudios se muestran en la siguiente tabla (*Delgado Vela et al., 2015*).

Tabla 2: Resumen de las características de los efluentes informados en estudios de tratamiento anaeróbica de aguas residuales urbanas (*Delgado Vela et al., 2015*)

Compuesto	Media desviación estándar
Amonio ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)	36±17
Fosfato ($\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$)	6±7

Compuesto	Media desviación estándar
<i>Sulfuro (mgDQO·L⁻¹)</i>	62±83
<i>Metano (mgDQO·L⁻¹)</i>	91±50
<i>DQO soluble (mgDQO·L⁻¹)</i>	99±46

2.2.2 Factores que afectan el crecimiento de las algas y absorción de nutrientes

Las condiciones óptimas de crecimiento y rendimiento son diferentes para cada especie de microalga, sin embargo, los factores influyentes en su metabolismo son comunes. Además de por la disponibilidad de nutrientes, el crecimiento y la absorción de compuestos inorgánicos se pueden ver afectados por interacciones complejas entre factores físicos como el pH, la intensidad de la luz, la temperatura... o por factores bióticos tales como la concentración de microalgas (Darley, 1982). A continuación, se comenta como afectan cada uno de estos factores:

2.2.2.1 Luz

Dado que las microalgas empleadas en depuración de aguas residuales son organismos fotoautótrofos, la luz es un factor determinante para su crecimiento. Para realizar el proceso de fotosíntesis emplean la radiación fotosintética activa (PAR, por sus siglas en inglés), la cual comprende la fracción del espectro de luz con longitud de onda entre 400 y 700nm. Esta fracción corresponde aproximadamente a un 40% de la radiación solar total.

La velocidad del proceso de fotosíntesis depende de la intensidad lumínica. La velocidad es proporcional a la intensidad lumínica hasta alcanzar una intensidad óptima para la cual la velocidad del proceso es máxima. Por debajo de esta intensidad el cultivo se encuentra en condiciones de fotolimitación. Por encima de la intensidad óptima, se produce un descenso de la velocidad de fotosíntesis y por tanto un descenso del rendimiento algal. A este proceso se le denomina fotoinhibición. La curva característica del crecimiento algal frente a la intensidad lumínica se muestra en la Figura 7. Además, intensidades de luz demasiado altas pueden aumentar la temperatura del cultivo, acentuando la inhibición del proceso de fotosíntesis e incluso llegando a dañar los pigmentos (Koç & Anderson, 2010). En el estudio elaborado a escala de laboratorio por González-Camejo *et al.* (2018) se evaluó el rendimiento de *Scenedesmus* en la eliminación de nutrientes en aguas residuales a tres intensidades de luz (45, 85 y 125 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) observando que el aumento de la intensidad de la luz favoreció el crecimiento de las microalgas.

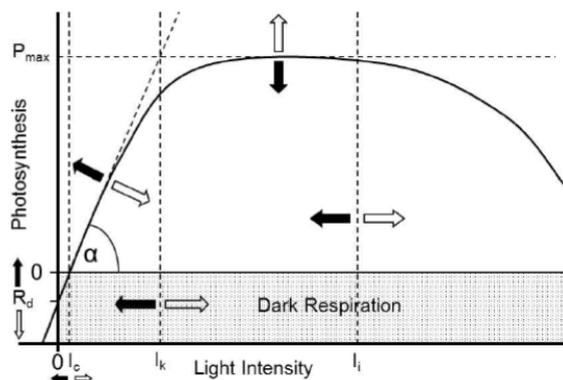


Figura 7: Evolución de la tasa fotosintética en función de la intensidad lumínica

Otro factor que considerar es que, al aumentar la profundidad, la intensidad lumínica se atenúa, especialmente en cultivos densos (Znad *et al.*, 2012).

2.2.2.2 Temperatura

La temperatura también es un factor fundamental en el crecimiento de las microalgas.

La productividad de las microalgas aumenta al aumentar la temperatura del cultivo, hasta alcanzar un valor de temperatura óptimo, por encima del cual se reduce la productividad o incluso mueren (Hindersin, 2013).

La temperatura óptima de un cultivo varía según el tipo de microalga que se emplee. Sin embargo, en las zonas frías las temperaturas de las especies autóctonas suelen estar comprendidas entre 18 y 21°C, mientras que, en climas templados, el rango varía entre 25 y 35°C. Por otro lado, temperaturas por encima de 35°C pueden influir de forma negativa en el crecimiento de algunas especies (Chinnasamy *et al.*, 2009).

2.2.2.3 pH

El pH es un factor capaz de influir en los procesos bioquímicos asociados con el crecimiento y el metabolismo de las algas. El pH óptimo varía en función de la especie de microalga, sin embargo, de forma general, los pH óptimos varían de 7 a 9 (Richmond, 1986). Concretamente el pH óptimo para la especie de microalga *Chlorella sp.* Se encuentra entre 6,3-7,5 (Huo *et al.*, 2012).

Hay que tener en cuenta que el proceso de fotosíntesis influye en el pH del medio ya que conlleva la fijación de CO₂ por parte de las microalgas, incrementando el valor del pH del medio debido a la acumulación de OH⁻. Sin embargo, el pH puede reducirse mediante la adición de CO₂ (Arbib *et al.*, 2013).

Valores elevados de pH también afectan la biodisponibilidad de los nutrientes (García, 2000). Valores de pH superiores a 9 pueden promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por stripping a la atmósfera, así como la precipitación química de fósforo por de sales de calcio.

2.2.2.4 Oxígeno

Durante el proceso de fotosíntesis las microalgas producen oxígeno aumentando la concentración de oxígeno disuelto en el cultivo. Resulta necesario controlar el nivel de saturación de oxígeno ya que niveles por encima de 400% la saturación del aire ($0,2247 \text{ molO}_2\text{m}^{-3}$ a 20°C) pueden inhibir el proceso de fijación de carbono (Aiba, 1982). Por otro lado, una concentración elevada de OD combinada con altos niveles de irradiancia, propician la aparición de radicales libres que resultan tóxicos y causan daños en las membranas de las microalgas. Por este motivo un aspecto importante en el diseño de los fotobiorreactores es el establecer unas dimensiones y proporciones adecuadas para no permitir la acumulación de concentraciones de oxígeno que puedan resultar inhibitorias (Rubio *et al.*, 1999).

2.2.2.5 Agitación

Resulta necesario proporcionar una mezcla eficiente para evitar gradientes de luz, de concentración de nutrientes e incluso de temperatura. Además, se debe considerar el efecto de sombreado (Carvalho *et al.*, 2006). En cultivos densos, las regiones donde las microalgas reciben suficiente luz suelen ser poco profundas (2-5cm), por lo que es necesario una mezcla correcta para proporcionar a las células una exposición promedio uniforme (Becker, 1994).

Sin embargo, la intensidad de la mezcla debe ser adecuada ya que el nivel de tolerancia de la intensidad de agitación varía en función de la especie de microalga. Por un lado, valores insuficientes favorecen la sedimentación y aparición de condiciones anaerobias, produciendo el deterioro celular de las microalgas y reduciendo la productividad; mientras que por otro lado, una agitación excesiva puede producir daños en las células de estos microorganismos debido al estrés mecánico-fluido (Camacho *et al.*, 2000).

2.2.2.6 Nutrientes

En el caso de las microalgas de ruta metabólica autótrofa, los principales nutrientes que necesitan para su desarrollo son los siguientes:

- *Carbono*

En la mayoría de las especies, aproximadamente el 50% de la biomasa algal se encuentra compuesta de carbono (Richmond, 2004). El proceso de fotosíntesis se lleva a cabo mediante la fijación de carbono inorgánico. Las microalgas pueden emplear tanto CO_2 como HCO_3^- , mostrando preferencia por el HCO_3^- ya que resulta más fácil de asimilar. Sin embargo, la productividad de las microalgas es superior empleando CO_2 y, además, la variación en la concentración de CO_2 genera menores alteraciones del pH en comparación con el HCO_3^- . De esta forma, para obtener mayores productividades, controlar el pH y asegurar la disponibilidad de carbono inorgánico en el medio, en los FBR de microalgas se suele inyectar CO_2 . (Carvalho *et al.*, 2006).

- *Nitrógeno*

Se trata del segundo elemento más abundante en la biomasa algal. El contenido de nitrógeno generalmente supone entre el 1 y el 10% del peso seco (Richmond, 2004). Las microalgas son capaces de asimilar nitrógeno en forma de nitrato, nitrito y amonio principalmente, pero

también en forma orgánica, como urea o aminoácidos. En el tratamiento de aguas residuales con microalgas, resulta importante estudiar el mecanismo de eliminación de nitrógeno por parte de las microalgas.

Hii et al. (2011) observaron la preferencia del amonio como fuente de nitrógeno frente a nitrato de la especie *Nannochloropsis* sp. El nitrato es absorbido por mecanismos activos y debe ser previamente reducido a amonio; por tanto, consume energía. Por otro lado, la asimilación y absorción del amonio se realiza directamente, con lo que consume menos energía en comparación con las otras fuentes (*Markou et al.*, 2014).

Cuando se emplean microalgas para la depuración de aguas residuales, se debe tener en cuenta la toxicidad del amoniaco libre. El amonio es una molécula de alta solubilidad. El equilibrio entre la forma de amonio ionizada (NH_4^+) y amoniaco libre (NH_3) depende principalmente del pH, a pH superiores a 9,25 ($=\text{pK}$ a 25°C), la especie dominante es amoniaco libre. El amoniaco libre a concentraciones relativamente bajas de $2\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, puede difundirse de forma pasiva en las células de las microalgas alcanzando concentraciones intracelulares que pueden llegar a ser tóxicas (*Azov y Goldman*, 1982). En la siguiente figura se muestra el efecto del pH sobre la concentración de amoniaco libre.

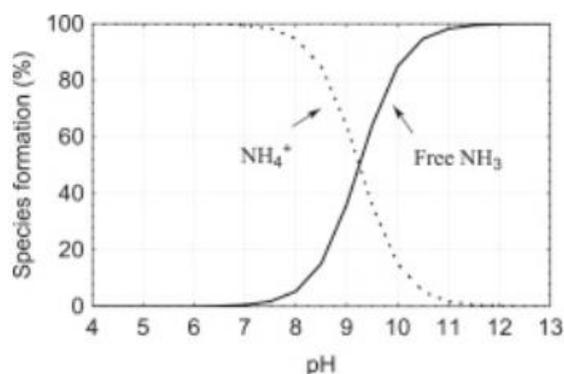


Figura 8: efecto del pH sobre la concentración de amoniaco libre a 25°C

Como se ha comentado anteriormente, el efluente de un AnMBR para el tratamiento de aguas residuales se caracteriza, entre otros, por un alto contenido de nitrógeno. Dado que a pH próximos a 9, la aparición de radicales libres de amonio puede inhibir el proceso de fotosíntesis, se debe prestar especial atención al control de este parámetro.

- Fوسفato

Junto con el nitrógeno, el fósforo es un macronutriente esencial para el crecimiento de las algas que se requiere para fabricar constituyentes celulares como fosfolípidos, nucleótidos y ácidos nucleicos. Su contenido en biomasa varía de 0,05 a 3,3% (*Richmond*, 2004).

Las microalgas y cianobacterias son capaces de almacenar el fósforo intracelularmente en forma de polifosfato (*Powell et al.*, 2009). Estos microorganismos pueden emplear el polifosfato almacenado cuando el fosfato en el cultivo se ha agotado. Según *Power et al.* (2011) existen dos mecanismos de eliminación de fósforo: (i) "sobrecompensación" que se produce en condiciones en las que los microorganismos se encuentran con períodos largos en

ausencia de fósforo, de modo que un aumento posterior de la concentración de este componente conlleva a una tasa de almacenamiento elevada; (ii) “captación de lujo” donde las microalgas almacenan grandes cantidades de fósforo sin necesidad de una etapa previa de inanición.

No obstante, factores como el pH, la concentración de fosforo total, la temperatura o la ausencia de iones de potasio, sodio o magnesio, pueden ralentizar la toma de fosfato por parte de las microalgas (Choi *et al.*, 2015).

2.2.2.7 Sulfuro

Para el tratamiento del efluente de un AnMBR mediante microalgas, se debe tener en cuenta que, en el proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica, se encuentran presente microorganismos que llevan a cabo la reducción de sulfato a sulfuro y gas sulfuro. Se tiene conocimiento de que el sulfuro puede inhibir el proceso de fotosíntesis debido a que dificulta el flujo de electrones entre el fotosistema II y el fotosistema I (Miller & Rebout, 2004).

Oren *et al.* (1979) observó que en presencia de luz a 600nm, el sulfuro inhibió el transporte de electrones fotosintéticos entre el agua y el fotosistema II en las cianobacterias *Aphanothece halophytica* y *Synechococcus 6311*. Por otro lado, González-Sánchez & Posten (2017) observaron que, a un pH de 8, concentraciones de sulfuro superiores a 200 mg·L⁻¹ inhibían el crecimiento de la especie *Chlorella sp.* En el estudio realizado por González-Camejo *et al.* (2017) se evaluó el efecto del sulfuro sobre el crecimiento de las especies *Chlorella* y *Scendesmus* observando que, a corto plazo, una concentración de 50 mg·L⁻¹ de sulfuro inhibía por completo a ambas especies. Además, la presencia de sulfuro favoreció el crecimiento de *Chlorella* frente a *Scendesmus* debido a su mayor resistencia al sulfuro (González-Sánchez & Posten, 2017).

2.2.2.8 Competencia con otros organismos

En hábitat naturales, las poblaciones de microorganismos que habitan en un ambiente común pueden competir por la toma de nutrientes u otros recursos. Algunas poblaciones excretan sustancias químicas que pueden resultar inhibitorias para otros microorganismos presentes. La competencia entre dos especies puede expulsar a otra especie de su hábitat común (Passarge *et al.*, 2006).

En la depuración de aguas residuales, las interacciones entre microalgas y bacterias pueden ser beneficiosas o perjudiciales. Según lo revisado por Unnithan & Smith (2014), las algas pueden promover el desarrollo de las bacterias produciendo factores de crecimiento o inhibirlo produciendo toxinas y del mismo modo, las bacterias pueden inhibir o promover el crecimiento de las algas. En un cultivo mixto en el que se encuentran presentes microalgas y bacterias heterótrofas, gracias a sus diferencias metabólicas, se produce un efecto simbiótico entre ambos microorganismos de forma que, el oxígeno producido por las microalgas debido es empleado por las bacterias para llevar a cabo la oxidación de compuestos orgánicos, que a su vez genera CO₂ que emplean las microalgas como fuente de carbono (Mujtaba & Lee, 2016).

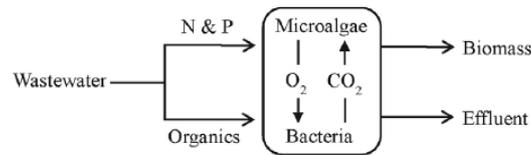


Figura 9: Diagrama de las interacciones simbióticas entre microalgas y bacterias heterótrofas en la depuración de aguas residuales (Mujtaba & Lee, 2016)

En el caso de la eliminación de nutrientes mediante microalgas del efluente de un AnMBR, las elevadas concentraciones de amonio pueden favorecer la proliferación de organismos autótrofos tales como las bacterias amoniooxidantes (AOB). En este caso las AOB consumirían el oxígeno producido por las microalgas, sin embargo, estas no producen ningún compuesto que favorezca el desarrollo de las microalgas (Figura 10). Además, dado que ambos microorganismos emplean el amonio como fuente de nitrógeno, podrían competir por la toma de este sustrato.

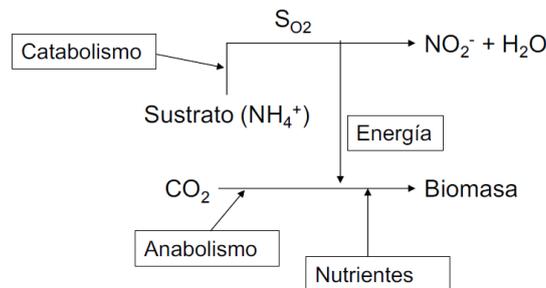


Figura 10: Metabolismo de las AOB.

2.2.3 Competencia entre AOB y microalgas

La nitrificación, es decir, el proceso de oxidación de amonio a nitrito o nitrato se compone de dos etapas llevadas a cabo por las bacterias oxidantes de amonio (AOB) y las oxidantes de nitrito (NOB). Las AOB emplean el amonio disuelto en las aguas residuales como fuente de electrones para oxidarlo a nitrito, el cual es empleado por las NOB para la oxidación a nitrato.

2.2.3.1 Nutrientes

Dado que tanto las microalgas como las AOB emplean amonio como fuente de nitrógeno existe una competencia por la toma de este compuesto. Existen estudios que indican que la presencia de microalgas produce una inhibición significativa de la nitrificación y, por tanto, una disminución de la población bacteriana nitrificante (Choi *et al.*, 2015). Además, el estudio realizado por Marcilhac *et al.*, 2014 reveló que la competencia por la toma de fósforo entre AOB y microalgas favorece a las microalgas.

2.2.3.2 Fotoinhibición

En el estudio realizado por Vergara *et al.*, 2016 se observó que la irradiación de luz a más de $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ redujo la actividad nitrificante bacteriana. Sin embargo, a elevadas concentraciones de microalgas, el autosombreado producido en el interior del fotobiorreactor hace que la intensidad media del cultivo suela ser bastante inferior. A modo de ejemplo, *Jebali*

et al. (2018) obtuvo una intensidad media en el rango 125,5 – 262,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en un cultivo de *Scenedesmus* sp.

Otro aspecto importante para evaluar la competencia entre AOB y bacterias, es que a elevadas concentraciones de oxígeno y en presencia de luz, se pueden inducir daños en las células de las AOB, es decir, fotooxidación (Prosser, 1990) de forma que, bajo estas condiciones, la competencia favorecería a las microalgas (González-Camejo *et al.*, 2018).

2.2.3.3 Temperatura

Las interacciones entre bacterias y microalgas pueden variar en función de la especie y depender de las condiciones ambientales. En cultivos mixtos, es posible que un aumento de temperatura facilite la proliferación de bacterias ya que aumentan exponencialmente su velocidad de crecimiento (Jiménez, 2010). En el estudio realizado por González-Camejo *et al.* (2018) se observó que el aumento de temperatura en un cultivo mixto de microalgas y bacterias produjo un incremento de la concentración de bacterias nitrificantes y la acumulación de nitrito.

2.2.3.4 Tiempo de retención hidráulico

Además, el tiempo de retención hidráulico (TRH) puede suponer un papel importante en la competencia. Las bacterias presentan un crecimiento mayor a temperatura ambiente (20-25 °C), por lo que, teóricamente, a TRH bajos la competencia favorece el desarrollo de éstas, mientras que a TRH altos, podrían verse favorecidas las microalgas.

2.2.4 Inhibición del proceso fotosintético en presencia de nitrito.

Se tiene conocimiento de que el nitrito puede producir un efecto inhibitorio sobre las microalgas. Yang *et al.* (2004) observaron que el crecimiento de la especie de microalga *Botryococcus braunii* disminuyó a una concentración de 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrito, quedando completamente inhibido a 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; sin embargo, una vez se consumió el nitrito del cultivo, las microalgas volvieron a crecer rápidamente. Chen *et al.* (2011) estudiaron el efecto del nitrito sobre la especie *Microcystis aeruginosa* y descubrieron que el aumento de la concentración de nitrito aumentó el estrés oxidativo, dañando la membrana celular y reduciendo el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, Abe *et al.* (2002) observó que la especie *Trentepohlia aurea* creció de forma adecuada a levadas concentraciones de nitrito (< 141 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Estos estudios se llevaron a cabo añadiendo nitrito de forma artificial al cultivo, sin tener en cuenta las interacciones entre los microorganismos presentes. Si bien es cierto que resulta necesario conocer la posible inhibición por nitrito de las microalgas, también se debe profundizar en el estudio de los factores que intervienen en el proceso de nitrificación y los organismos encargados de llevarlo a cabo.

La depuración de efluentes de AnMBR mediante microalgas parece una técnica prometedora para la eliminación de nutrientes de aguas residuales y producción de biomasa. Sin embargo, actualmente la literatura científica sobre el tratamiento de aguas residuales con cultivos mixtos de microalgas y bacterias es bastante escasa. El presente trabajo final de máster surge

de la necesidad de ampliar los conocimientos sobre este tipo de tratamiento de forma que aumente su competitividad frente a los sistemas convencionales. Para ello, se plantea estudiar la competencia entre microalgas y AOB para el tratamiento del efluente de un AnMBR que trata aguas residuales reales, teniendo en cuenta las interacciones entre las especies naturales que habitan en este tipo de medio. Dado que la aplicación de cultivos de microalgas a escala industrial está sujeta a las condiciones ambientales, la aparición de AOB puede verse favorecida y, en consecuencia, puede aumentar la concentración de nitrito del medio. Por este motivo, resulta necesario investigar el efecto inhibitorio del nitrito sobre las microalgas

Así, este estudio puede usarse como base para el sobre-escalado de la tecnología de tratamiento de efluentes de AnMBR mediante MPBR.

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en estudiar los efectos de la competencia entre microalgas y AOB. Para ello se han planteado los siguientes **objetivos específicos**, desarrollados a través de experimentos realizados a escala laboratorio:

- Evaluar el efecto de la inhibición de la nitrificación sobre el rendimiento de las microalgas.
- Evaluar el efecto de la acumulación de nitrito sobre el metabolismo de las microalgas.
- Evaluar el efecto del tiempo de retención celular sobre el rendimiento de las microalgas.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo y alimento

El grupo de investigación CALAGUA, formado por personal del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente de la Universidad Politécnica de Valencia y del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Valencia, viene trabajando durante tres décadas en el estudio integral de los procesos biológicos y físico/químicos que tienen lugar en una EDAR.

Actualmente, en la EDAR de la Cuenca del Carraixet (Alboraya, Valencia), el grupo CALAGUA opera una planta a escala piloto para la depuración del efluente de un sistema AnMBR a partir de MPBR. Esta planta se encuentra constituida por 2 FBRs de placa plana de 1,15 m de altura, 2 m de ancho y 0,10 m de profundidad (235 L de volumen útil cada uno). El alimento de los MPBR (efluente de AnMBR) está caracterizado por una despreciable concentración de sólidos, pero alta concentración de nutrientes. Concretamente, durante el período de ejecución de los ensayos (enero-abril de 2018) la concentración de NTs del efluente del AnMBR fue de $50,29 \pm 7,46 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ (principalmente en forma de amonio) y la de fosfato de $4,11 \pm 0,87 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$. De modo que el objetivo principal de los fotobiorreactores es eliminar nutrientes mediante el empleo de microalgas.

En todos los ensayos llevados a cabo, el inóculo procedía de la planta piloto MPBR. Durante el período de estudio, el género predominante de microalga fue *Chlorella*.

4.2 Diseño de los experimentos

Para alcanzar los objetivos mencionados anteriormente, se realizaron, a escala laboratorio, 4 tipos de ensayos:

1. Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes
2. Ensayos de inhibición por NO_2 (corto plazo)
3. Ensayos de inhibición por NO_2 (largo plazo)
4. Ensayo de Tiempo de Retención Celular (TRC)

La puesta en marcha de los experimentos se llevó a cabo en el interior de una cámara climatizada de la marca comercial Ineltec (CM-29210). La temperatura en el interior de la cámara fue constante durante la duración de los experimentos e igual a 27°C .

4.2.1 Configuración experimental

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon 2 tipos de configuraciones de FBR:

- Tipo 1: Para llevar a cabo los experimentos 1, 3 y 4
- Tipo 2: Para realizar el experimento 2.

A continuación, se explican de forma detallada ambas configuraciones.

- *Configuración Tipo 1*

En estos experimentos se emplearon dos FBR cilíndricos de 8 L de capacidad. Durante los experimentos, éstos se encontraban cerrados en la parte superior a excepción de pequeñas oberturas que permitían el alojamiento de las sondas en el interior de los FBR.

Para lograr una homogeneización adecuada del licor mezcla y evitar la creación de biofilms en las paredes de los FBR, el licor mezcla se agitó, empleando una soplante EAD pumps modelo XH10 O4 P1, mediante cuatro difusores de burbuja fina colocados en forma de cruz en el fondo de los FBR. El caudal de aire inyectado fue de $0,78 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$.

Para la medición de pH y T se empleó un medidor multiparamétrico (Consort C3050) de forma que, a través de un software, los datos se registraron de forma continua en un ordenador personal.

La regulación del aporte de carbono inorgánico se realizó a través de una electroválvula conectada a una caja de relés empleando como variable de control el pH. El valor de consigna establecido para el pH fue de 7,5 de modo que, cuando se registraba un valor superior al de consigna, se inyectaba un pequeño caudal de CO_2 . Este aporte se realizaba por la parte superior del FBR a través de un difusor esférico de burbuja fina.

Como fuente lumínica, se instalaron cinco tubos LED (Trilux) (9 w) ubicados de forma vertical alrededor de cada uno de los FBR. Para una correcta disposición de los tubos LED e idéntica intensidad lumínica recibida en cada FBR, se midieron valores de radiación fotosintética activa (PAR) en las paredes de los FBR. Dicha medición se realizó mediante un sensor PAR cuántico (apogee instrument). La intensidad lumínica recibida en la superficie de cada FBR fue de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

En la Figura 11 se muestra el montaje de esta configuración, así como el esquema de iluminación.

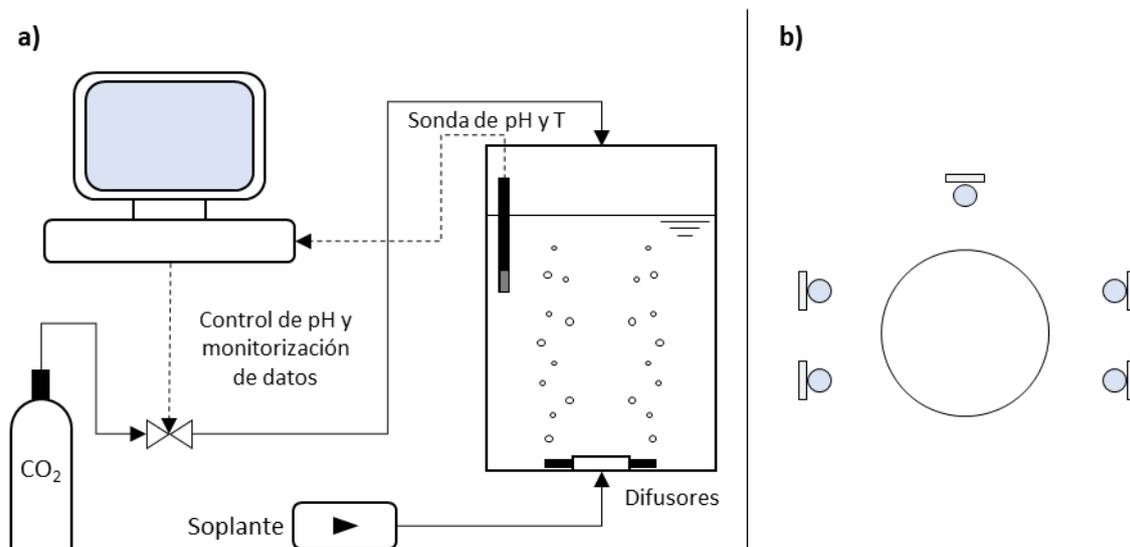


Figura 11: Configuración Tipo 1: a) Configuración experimental; b) Esquema de iluminación

- **Configuración 2**

Para la realización de los ensayos de inhibición por nitrito a corto plazo, se configuró un respirómetro simple compuesto por: un FBR cilíndrico de metacrilato de 500 mL de capacidad; sonda de oxígeno disuelto (marca comercial WTW, Oxi 330i); medidor multiparamétrico (Consort C3050) para la medición de pH y temperatura; difusor esférico de burbuja fina a través del cual se realizaba el aporte de CO₂ proveniente de una bala de almacenamiento (99%pureza CO₂); sistema de luz compuesto por 2 lámparas fluorescentes de la marca comercial SevenON (11 w) proporcionando una intensidad lumínica en la superficie del reactor de 200 μmol·m⁻²·s⁻¹; y un sistema magnético de mezcla funcionando a velocidad constante.

En cuanto al sistema de monitorización, ambas sondas se conectaron a un ordenador personal de forma que se registraron datos de pH, T y DO a lo largo de todo el experimento. La regulación del aporte de carbono inorgánico se realizó a través de una electroválvula conectada a una caja de relés y se empleó como variable de control el pH. El valor de consigna establecido para el pH fue de 7,5 de modo que, cuando se registraba un valor superior al de consigna, se inyectaba un pequeño caudal de CO₂.

En la Figura 12 se muestra el montaje de esta configuración, así como el esquema de iluminación.

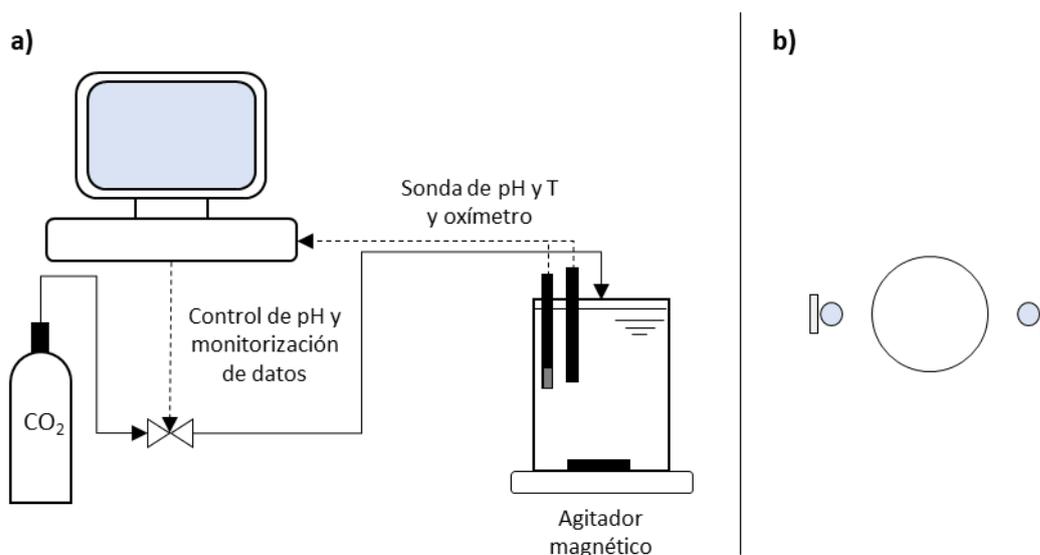


Figura 12: Configuración Tipo 2: a) Configuración experimental; b) Esquema de iluminación

4.2.2 Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes

Este experimento se compone de un total de 5 ensayos, de 1 día de duración cada uno.,

Se empleó la configuración tipo 1. Los FBR se llenaron con 8L de licor mezcla y se operaron en batch. Uno de los FBR se empleó como control (en adelante FBR "A") compuesto únicamente por cultivo y alimento para el funcionamiento normal, mientras que en el otro (en adelante FBR "B") además del cultivo y alimento se añadió alitiourea (ATU), a una concentración de 10 mg·L⁻¹ en el FBR, con el objetivo de inhibir la nitrificación, ya que la ATU inhibe la oxidación del amonio a nitrito (Ginestet et al. 1998).

Se tomaron muestras de 30 mL de volumen de ambos FBR a lo largo de todo el ensayo para determinar la densidad óptica a 680 nm (OD_{680}) y las concentraciones de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$ y $P-PO_4^{3-}$. La toma de muestras se programó de forma que la frecuencia disminuyera a medida que avanzaba el ensayo, es decir, la primera muestra se tomaba a los 5 minutos desde el comienzo del ensayo, la siguiente a los 20, 40, 60, 90 minutos, etc. de forma que, en caso de producirse grandes variaciones de concentración al inicio de cada ensayo, estas podrían quedar registradas.

El análisis de los resultados se realizó a través del cálculo de las velocidades de consumo de nutrientes y de la producción de sólidos en cada uno de los FBR.

4.2.3 Ensayos de inhibición por NO_2 (corto plazo)

Se trata de ensayos respirométricos. Este experimento se compone de dos tipos de ensayos que se diferencian por la composición del licor mezcla: En el primer ensayo el licor mezcla se compuso al 100% de cultivo, mientras que, en el segundo, se compuso de un 50% de cultivo y un 50% de alimento. Este segundo ensayo se realizó con el objetivo de asegurar la disponibilidad de nutrientes y evitar el efecto de sombreado, los cuales podrían afectar a la producción de oxígeno por parte de las microalgas.

A su vez, cada uno de estos ensayos se compone de 4 ensayos, en los que se analizó la posible inhibición por nitrito a 0, 5, 10 y 20 mg $N-NO_2 \cdot L^{-1}$.

Para su ejecución se empleó la configuración tipo 2. Los FBR se llenaron con 400 mL de licor mezcla y se midió la concentración de oxígeno disuelto durante 15 minutos cada 10 seg. Para ensayar las diferentes concentraciones de nitrito, se empleó la disolución patrón de NO_2 ($1000 \mu gNO_2 \cdot mL^{-1}$) de la marca comercial VWR Chemicals.

Para la evaluación del efecto inhibitorio del NO_2 a corto plazo, se calculó la velocidad de producción de oxígeno (apartado 4.4.3).

4.2.4 Ensayos de inhibición por NO_2 (largo plazo)

Este experimento se compone de 3 ensayos en los que evaluó la inhibición por nitrito a largo plazo frente a una concentración de 5, 10 y 20 mg $N-NO_2 \cdot L^{-1}$ cuya duración fue de 4, 6 y 5 días, respectivamente.

Se empleo la configuración tipo 1. Los FBR se llenaron con 4,5 L de licor mezcla y se operaron en semi-continuo estableciendo un TRH de 3 días.

El licor mezcla se componía de:

- 3 L de cultivo
- 45 mL de ATU
- Para FBR" B", se añadió el volumen necesario de patrón para alcanzar la concentración de nitrito deseada y para FBR" A" se añadió el mismo volumen de patrón pero de agua destilada.
- Alimento hasta llenar los 4,5 L

Para mantener el TRH de 3 días, se programaron purgas diarias de 1,5 L. A continuación se reemplazó el volumen con alimento procedente de planta, agregando el volumen de ATU y patrón de nitrito (FBR" B") o agua destilada (FBR" A"). De esta forma, se mantuvo la concentración de nitrito deseada, así como la de de ATU, de modo que el proceso de nitrificación quedada inhibido durante todo el ensayo en ambos FBR.

Se tomaron muestras de 30 mL de volumen de cada FBR diariamente, antes de realizar cada purga. De las muestras se midió la OD_{680} y la concentración de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$ y $P-PO_4^{-3}$.

El análisis de resultados se realizó a través de la comparación de ambos FBR de la productividad de biomasa, la eliminación de amonio y la eliminación de nitrógeno total soluble.

4.2.5 Ensayo de Tiempo de Retención Celular (TRC)

Este experimento se compone de un ensayo de 11 días de duración, en los que se evaluó la competencia entre microalgas y bacterias en la eliminación de nutrientes, entre un reactor operado a TRC de 2 días (FBR" A"), y otro reactor (FBR" B") operado con un TRC de 4,5 días. Dado que se trata de sistemas sin retención de biomasa, el TRC y TRH coinciden.

Para llevar a cabo este experimento, se empleó la configuración de FBR tipo 1. Los FBR se llenaron con 8 L de licor mezcla y se operaron en semi-continuo. Para la puesta en marcha de ambos FBR, el licor mezcla se componía de 5 L de cultivo y 3 L de alimento.

Para mantener los TRC de 2 y 4,5 días, se programaron purgas diarias de 4 y 1,8 L respectivamente. A continuación, se reemplazó el volumen purgado con alimento procedente de planta.

La evaluación de la competencia frente a distintos TRC se realizó por un lado, a largo plazo, es decir, mediante el análisis de las muestras diarias tomadas durante los 11 días de ensayo; y por otro lado, a corto plazo, mediante ensayos de velocidad de consumo de nutrientes:

- A largo plazo: Se tomaron muestras de 30 mL de volumen de cada FBR diariamente, antes de realizar cada purga. De las muestras se midió la OD_{680} y la concentración de $N-NH_4^+$, $N-NO_2^-$, $N-NO_3^-$ y $P-PO_4^{-3}$. El análisis de resultados se realizó a través de la comparación de ambos FBR de la productividad de biomasa; la eliminación de amonio, nitrógeno total soluble y fosfato; y la producción de NO_2^- y NO_3^- con el objetivo de evaluar el proceso de nitrificación.
- A corto plazo: Se programaron 2 ensayos de velocidad de consumo: uno a los dos días de la puesta en marcha del experimento y otro al final. La toma de muestras y el

análisis de los resultados se realizaron de forma análoga a la explicada en el apartado 4.2.1.

A continuación, se presenta un resumen de las condiciones de cada uno de los experimentos realizados (Tabla 3).

Tabla 3: Tabla resumen de las condiciones de cada uno de los experimentos realizados.

Experimento	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4	
	<i>FBR</i> "A"	<i>FBR</i> "B"	<i>Exp.2.1</i>	<i>Exp.2.2</i>	<i>FBR</i> "A"	<i>FBR</i> "B"	<i>FBR</i> "A"	<i>FBR</i> "B"
<i>Objetivo</i>	Evaluar el efecto de la inhibición de la nitrificación sobre el rendimiento de las microalgas		Evaluar el efecto de la acumulación de nitrito sobre el metabolismo de las microalgas				Evaluar el efecto del tiempo de retención celular sobre el rendimiento de las microalgas	
<i>Numero de ensayos</i>	5		4		3		1 ¹	
<i>Duración</i>	1 día		15 minutos		Ensayo 1: 4 días Ensayo 2: 6 días Ensayo 3: 5 días		11 días	
<i>Volumen de trabajo</i>	8 L		0,4 L		4 L			
<i>Modo de operación</i>	Batch		Batch		Semi-continuo		Semi-continuo	
<i>Inóculo</i>	4 L cultivo 4 L alimento		0,4 L cultivo 0,2 L alimento		3 L cultivo 1,5 alimento ²		5 L cultivo 3 L alimento	
<i>TRC</i> ³	-		-		3 días		2 días 4,5 días	
<i>Concentración de ATU (mg·L⁻¹)</i>	-		-		10		-	
<i>Concentración de NO₂⁻ (mgN·L⁻¹)</i>	-		0, 5, 10 y 20		-		5, 10, 20	

¹ Durante el tiempo de ensayo, se realizaron dos ensayos, de 1 día de duración cada uno, para determinar la velocidad de consumo de nutrientes.

² En este volumen se encuentra incluido el volumen de ATU (45ml) y de patrón de NO₂⁻ (para cada ensayo varía en función de la concentración de NO₂⁻ deseada).

³ Dado que se trata de sistemas sin retención de biomasa, el TRC y TRH coinciden.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Determinación de la densidad óptica (OD_{680})

La OD se midió a través de un espectrofotómetro de la marca comercial Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-Vis. Se determinó la OD de las muestras a 680nm (OD_{680}). Se realizaron las mediciones por duplicado obteniendo la media de ambas como resultado final.

4.3.2 Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Dado que la OD_{680} se encuentra relacionada con la concentración de microalgas (*Pachés et al., 2018*), la determinación de los SSV se realizó empleando una recta de calibración que relaciona ambos parámetros. Para ello se tomaron muestras con diferente concentración de microalgas de las cuales se midió la OD_{680} (apartado 4.3.1) y la concentración de SSV a través del método gravimétrico definido por Standard Methods (APHA, AWWA, WEF, 2005). Este último procedimiento se desarrolla del siguiente modo:

- i) Se realiza una filtración por vacío de una alícuota de volumen conocido por un filtro de policarbonato y tamaño de poro de 0,45 μm .
- ii) Se deposita el filtro en una cápsula y se introduce en una estufa a 150 ° C para eliminar toda la humedad. El residuo que queda después de la evaporación corresponde a los SST.
- iii) Para la determinación de los SSV, se introduce el filtro que contiene los SST en una mufla a 550 ° C. La disminución de residuo en el filtro corresponde a los SSV.
- iv) Una vez la cápsula se enfría, se añaden unas gotas de carbonato amónico ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) para regenerar el carbonato de magnesio. A continuación, se introduce en una estufa a 105 ° C para evaporar el exceso de humedad.

La recta de calibración obtenida para el cálculo de los SSV de cada muestra se muestra en la Figura 13:

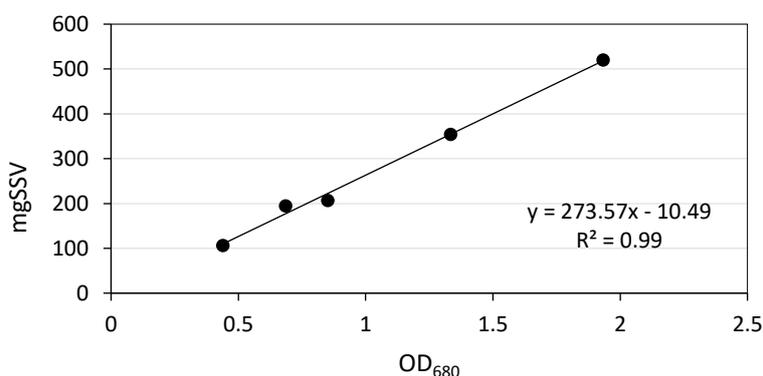


Figura 13: Recta de calibración empleada para el cálculo de los SSV en función de la OD_{680}

4.3.1 Medición de nutrientes

Los nutrientes analizados fueron amonio ($N-NH_4^+$), nitrito ($N-NO_2^-$), nitrato ($N-NO_3^-$) y fosfato ($P-PO_4^{3-}$). Para su determinación se empleó el analizador automático Smartchem 200. Los rangos de concentración de nutrientes y métodos de medida que emplea este analizador se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4: Rango de medida y método empleado para la medición de nutrientes. Smartchem 200

Nutriente	Rango de medida	Método
$N-NH_4^+$	1 – 7,77 mgN L ⁻¹	US EPA 350.1 y Standard Methods 4500-NH3-G
$N-NO_2^-$	0 – 6,00 mgN L ⁻¹	US EPA 354.1 y Standard Methods 4500-NO2-B
$N-NO_3^-$	0 – 10,165 mgN L ⁻¹	(*) Standard Methods 4500-NO3
$P-PO_4^{3-}$	0 – 3,20 mgP L ⁻¹	US EPA 365.1 y Standard Methods 4500-P-F

(*): El valor que proporciona el método corresponde a la suma de NO_2^- y NO_3^- .

4.4 Cálculos realizados

4.4.1 Productividad de biomasa

La productividad de biomasa se ha calculado del siguiente modo:

$$Productividad (mgSSV \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}) = \frac{V_P \times SSV_x}{V_R} \quad (Ec. 1)$$

Donde SSV_x (mgL⁻¹) es la concentración de SSV en el momento de la toma de muestra (t_x), SSV_0 es la concentración en el momento inicial (t_0), V_R es el volumen del reactor (L) y V_P el volumen de purga (L·d⁻¹).

4.4.2 Velocidad de consumo y rendimiento de nutrientes

Este parámetro se ha calculado para evaluar la variación de nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$), nitrito ($N-NO_2^-$), nitrato ($N-NO_3^-$) y fosfato ($P-PO_4^{3-}$)

La velocidad de consumo de nutrientes se ha calculado del siguiente modo:

$$V[X] (mgX \cdot gSSV^{-1} d^{-1}) = \frac{X_x - X_0}{SSV \cdot (t_x - t_0)} \quad (Ec. 2)$$

Donde X_x (mgL⁻¹) es la concentración de nutrientes en el momento de toma de la muestra (t_x) y X_0 es la concentración de nutrientes en el momento inicial (t_0).

El rendimiento de eliminación se ha determinado de la siguiente forma:

$$Eliminación [X](\%) = \left(1 - \frac{X_0}{X_x}\right) \times 100 \quad (Ec. 3)$$

4.4.3 Velocidad de producción de oxígeno

La dinámica de la concentración de oxígeno disuelto (OD) puede representarse mediante la siguiente expresión:

$$\frac{dDO}{dt} (\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = \text{OTR} + \text{OPR} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde OTR corresponde a la tasa de transferencia de oxígeno (Oxygen Transfer Rate) o stripping y OPR corresponde a la tasa de producción de oxígeno (Oxygen Production Rate) y

En cuanto a la OTR, se define del siguiente modo:

$$\text{OTR} = K_{La} \cdot (DO - DO_{SAT}) \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde K_{La} se define como el coeficiente de transferencia del oxígeno disuelto del agua a la atmósfera (d^{-1}); DO_{SAT} ($\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) es la concentración de saturación de DO en el medio acuoso.

Por otro lado, teóricamente la OPR se compone de los siguientes parámetros (Rossi et al., 2018):

$$\text{OPR} = \text{OPR}_{MA,F} + \text{OPR}_{MA,R} + \text{OPR}_{NIT} + \text{OPR}_{HB} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

- $\text{OPR}_{MA,F}$ corresponde a la producción de oxígeno por parte de las microalgas debido al proceso de fotosíntesis;
- $\text{OPR}_{MA,R}$ corresponde al consumo de oxígeno por la propia respiración de las microalgas (valor negativo);
- OPR_{NIT} corresponde al consumo de oxígeno debido al proceso de nitrificación llevado a cabo por las AOB (valor negativo);
- OPR_{HB} corresponde al consumo de oxígeno debido a la actividad de las bacterias heterótrofas (valor negativo).

Así, sustituyendo la ecuación 5 y 6 en la ecuación 4:

$$\frac{dDO}{dt} = K_{La} \cdot (DO - DO_{SAT}) + \text{OPR}_{MA,P} + \text{OPR}_{MA,R} + \text{OPR}_{NIT} + \text{OPR}_{HB} \quad (\text{Ec. 7})$$

El cálculo de este parámetro se realizó en el experimento nº2 (inhibición por nitrito a corto plazo). Como se ha comentado anteriormente, en estos ensayos se inyectó ATU a una concentración de $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ con el objetivo de inhibir el proceso de nitrificación, por lo que la variable OPR_{NIT} sería igual a 0.

En cuanto a la OTR, teniendo en cuenta que todos los experimentos se llevan a cabo en la misma tipología de FBR (FBR de 500mL de capacidad cerrados por la parte superior), se considera que su valor será despreciable en cada uno de los ensayos. Además, dado que se empleó el mismo cultivo de algas en todos los ensayos, y que la concentración de bacterias heterótrofas es ínfima en comparación a la concentración de microalgas, el valor de OPR_{HB} se

considera semejante en cada uno de los ensayos. Lo mismo ocurre con la $OPR_{MA,R}$ dado que su valor es mínimo y proporcional a la actividad fotosintética.

Así, se considerará que la suma de OTR y $OPR_{MA,R}$ es igual a una constante “K” análoga en cada ensayo. De este modo, la variación de DO respecto del tiempo se expresa del siguiente modo:

$$\frac{dDO}{dt} (mgO_2 \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}) = OPR_{MA,F} + K = \mathbf{OPR_{MA,F}^*} \quad (\text{Ec. 8})$$

La determinación $OPR_{MA,P}^*$ se ha realizado mediante la obtención de la línea de tendencia asociada a la representación gráfica de los valores de DO, registrados por la sonda de oxígeno, respecto del tiempo.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los 5 ensayos. Destacar que la concentración de N-NO_2^- al comienzo de cada ensayo fue baja (Tabla 5).

Tabla 5: Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes. Concentración de N-NO_2^- al comienzo de cada ensayo.

	Ensayo 1.1	Ensayo 1.2	Ensayo 1.3	Ensayo 1.4	Ensayo 1.5
C_0 ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,72	0,07	4,25	2,45	0,12

- *Ensayo 1.1*

El licor mezcla se compuso de un 50% de cultivo y un 50% de alimento (efluente de AnMBR). Este ensayo tuvo una duración de 1 día.

La concentración de N-NH_4^+ del cultivo y alimento fueron de 16,88 y 46,54 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, mientras que la concentración de P-PO_4^{3-} fue de 2,35 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cultivo y de 4,67 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el alimento. La concentración de SSV del cultivo y alimento fueron de 0 y 213 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente,

Cabe destacar que este ensayo, se realizó un día después de que se añadiera una dosis de ATU en la planta piloto MPBR, es decir, probablemente la muestra de cultivo todavía contenía ATU.

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan representados en la Figura 14 y en la Figura 15.

Dinámica del crecimiento algal

En la Figura 14 se muestra la evolución de la concentración SSV a lo largo de todo el ensayo. Además, se ha representado la línea de tendencia asociada a dicha evolución.

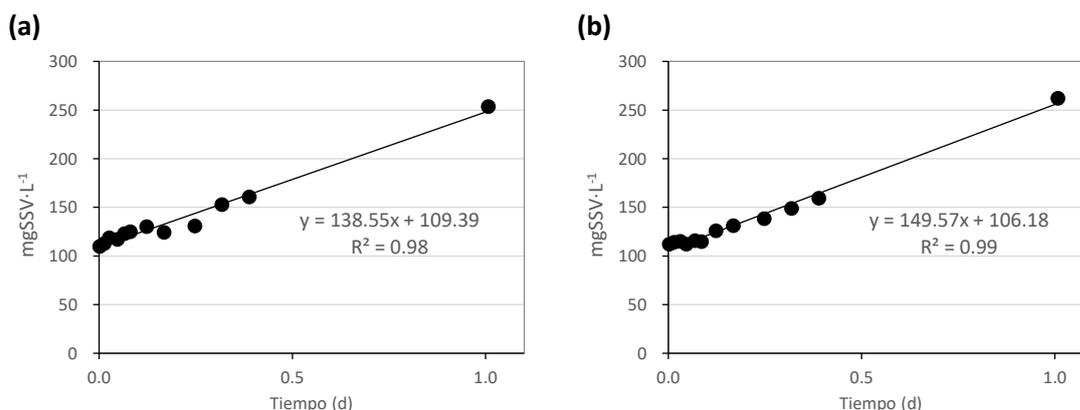


Figura 14: Ensayo 1.1. Evolución de la concentración de SSV en FBR "A" (a) y FBR "B" (b).

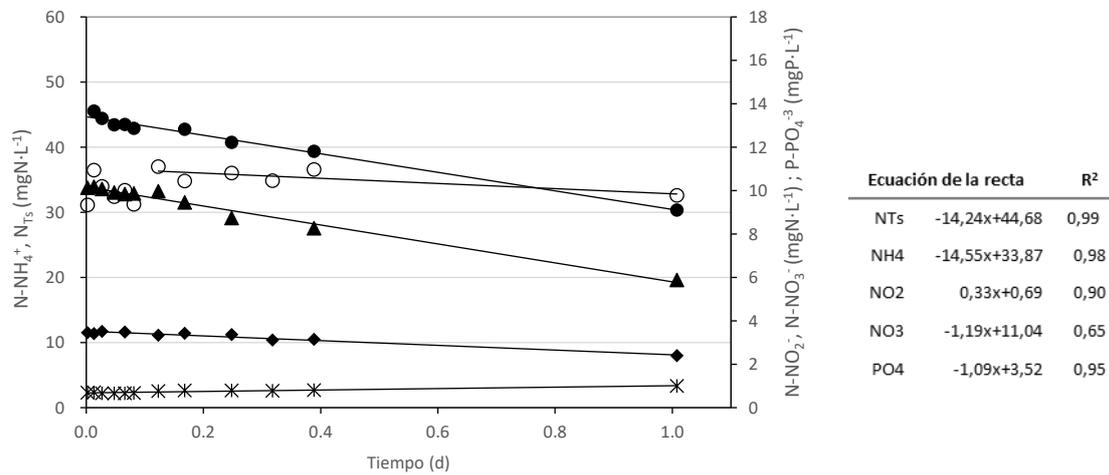
En la Figura 14 se observa una evolución lineal positiva de la concentración de SSV a lo largo del ensayo.

La pendiente de las líneas de tendencia muestra la velocidad de producción de SSV en cada uno de los FBR. En cuanto al FBR "A" (Figura 14 (a)) se obtuvo una velocidad de $138,6 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, inferior a la obtenida en el FBR "B" ((Figura 14 (b)) de $149,6 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Estos valores parecen indicar que la producción de SSV se ve favorecida en condiciones de inhibición del proceso de nitrificación (8% superior en FBR "B"). Sin embargo, dado que únicamente se tomó una muestra al final del ensayo, dicha diferencia podría atribuirse a simples variaciones del proceso experimental.

Cambios en las concentraciones de nutrientes

En la Figura 15 se muestra la evolución de los nutrientes (N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- y P-PO_4^{3-}) a lo largo del ensayo. Se han representado las líneas de tendencia asociadas a la evolución de cada parámetro. A la derecha se encuentran recogidas las ecuaciones de cada una de las líneas, así como el factor de correlación.

(a)



(b)

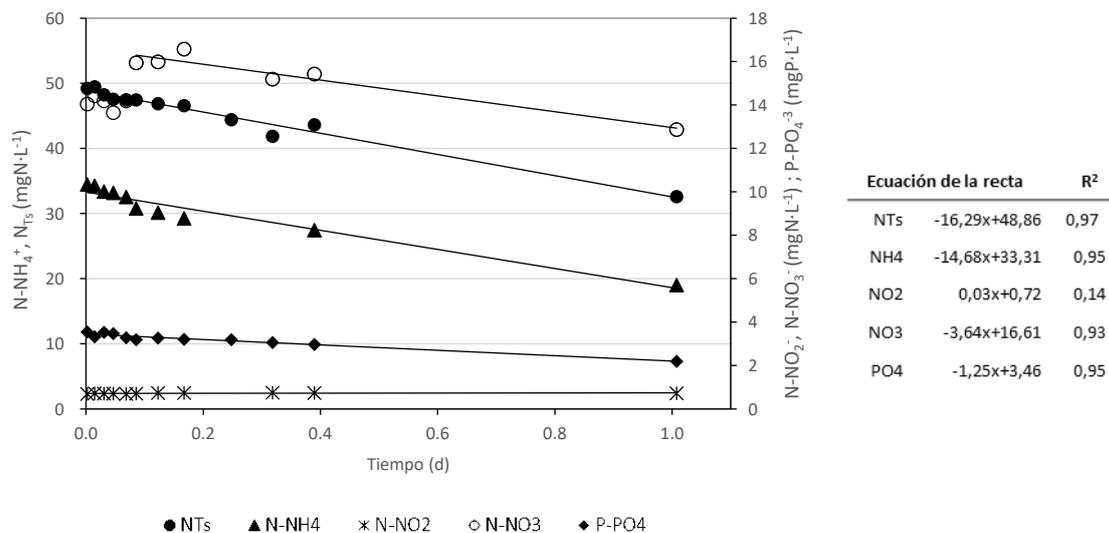


Figura 15: Ensayo 1.1. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR "A" (a) y en FBR "B" (b).

En lo que respecta al **FBR"A"** (Figura 15 (a)), se observa una clara disminución en la concentración de NH_4^+ a lo largo de todo el ensayo. La concentración inicial y final de este compuesto fue de $33,77 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ y de $19,58 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, resultado la velocidad de consumo de $133,8 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Esta disminución estaría asociada al consumo de NH_4^+ como nutriente por parte de las microalgas y al proceso de nitrificación. Este último aspecto conllevaría a un aumento de la concentración de NO_2^- en el FBR, sin embargo, el incremento es muy reducido (de $0,75$ a $1,00 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que indicaría que, como se ha comentado anteriormente, la muestra de cultivo tomada de la planta piloto MPBR contenía una concentración de ATU residual.

En cuanto a la evolución de la concentración de NO_3^- en FBR"A", durante las 2 primeras horas de ensayo no muestra una tendencia clara, debido a que es probable que los microorganismos se encuentren en período de adaptación. Sin embargo, a continuación, se observa un pequeño descenso en la concentración de NO_3^- , por lo que esta reducción podría asociarse a su consumo como nutriente por parte de las microalgas.

Observando la evolución de la concentración de NTs, se produjo una disminución desde $43,80 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $30,36 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, obteniéndose una velocidad de consumo de $133,6 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y un rendimiento de eliminación del 33%.

Por último, en cuanto al PO_4^{3-} , se redujo de $3,46 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ a $2,39 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$, a una velocidad de $10,1 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y rendimiento de eliminación del 32%.

Por otro lado, en **FBR"B"** (ver Figura 15 (b)) se observa una disminución de la concentración de NH_4^+ desde $34,47$ a $19,02 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, a una velocidad de $137,8 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, ligeramente superior a la obtenida en el FBR"A". Dado que el proceso de nitrificación se encontraba inhibido y la concentración de NO_2^- se mantuvo prácticamente constante a lo largo del ensayo con un valor de $0,72 \pm 0,02 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ (similar a la de FBR"A"), el consumo de NH_4^+ se podría asociar únicamente a la absorción por parte de las microalgas.

En cuanto al NO_3^- , del mismo modo que para el FBR"A", se observa un descenso en su concentración a partir de la segunda hora de ensayo, pero en este caso, la disminución se produce a mayor velocidad. Además, este consumo se produce en presencia de altas concentraciones de amonio, contradiciendo los resultados obtenidos en diferentes estudios que indican que el consumo de nitrato como fuente de nitrógeno por parte de las microalgas, se produce únicamente en ausencia de NH_4^+ (*Hii et al.*, 2011), que es la principal fuente de nitrógeno de las microalgas.

Por otro lado, el NTs disminuyó desde $49,22$ hasta $32,62 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, a una velocidad de $152,9 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y rendimiento de eliminación del 34%.

Por último, el PO_4^{3-} , se consumió a una velocidad de eliminación de $11,6 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (desde $3,55$ a $2,20 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$) obteniendo un rendimiento de eliminación del 37%.

Si comparamos la diferencia entre las velocidades de consumo de nutrientes de ambos FBR, se tiene que el rendimiento algal en cuanto a velocidad de consumo de NTs y fosfato aumenta un 14% y un 15% respectivamente en FBR"B". En cuanto a la producción de sólidos. En vista de los

resultados obtenidos, parece ser que el rendimiento algal se ve favorecido en condiciones en que el proceso de nitrificación se encuentra inhibido (FBR" B").

Por otro lado, cabe destacar que en ambos FBR se ha observado una disminución de la concentración de NO_3^- , en presencia de altas concentraciones de amonio, asociada al consumo como nutriente por parte de las microalgas.

No obstante, teniendo en cuenta la presencia de ATU en la muestra de cultivo empleada y los posibles errores en la toma y analíticas de las muestras, se decidió realizar otro ensayo similar para comprobar la veracidad de los resultados.

- *Ensayo 1.2*

Este ensayo es semejante al anterior. Tuvo una duración de 1 día

La concentración de N-NH_4^+ del cultivo y alimento fueron de 22,45 y 56,09 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, mientras que la concentración de P-PO_4^{3-} fue de 1,70 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cultivo y de 2,84 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el alimento. La concentración de SSV del cultivo y alimento fueron de 0 y 390 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente.

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan representados en la Figura 16 y en la Figura 17.

Dinámica del crecimiento algal

En la Figura 16 queda representada la evolución de la concentración de SSV a lo largo del ensayo.

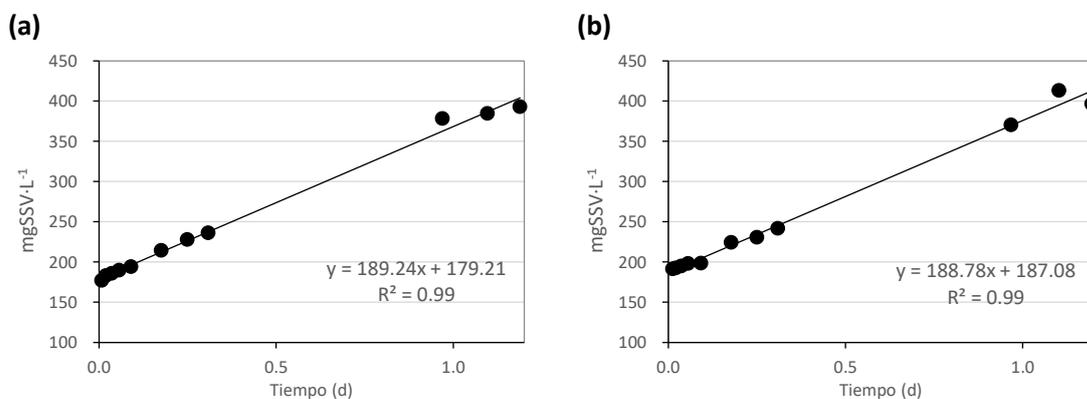


Figura 16: Ensayo 1.2. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).

Del mismo modo que en el ensayo anterior, el crecimiento algal siguió una distribución lineal. La velocidad de producción de SSV obtenida en FBR" A" fue de 189,2 $\text{mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, similar a la obtenida en FBR" B", de 188,8 $\text{mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Dada la similitud de los resultados obtenidos se considera que, en este ensayo, no se ha producido una diferencia significativa en la producción de SSV entre ambos FBR.

Cambios en las concentraciones de nutrientes

La Figura 17 muestra la evolución de nutrientes (N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- y P-PO_4^{3-}) en cada FBR a lo largo del ensayo.

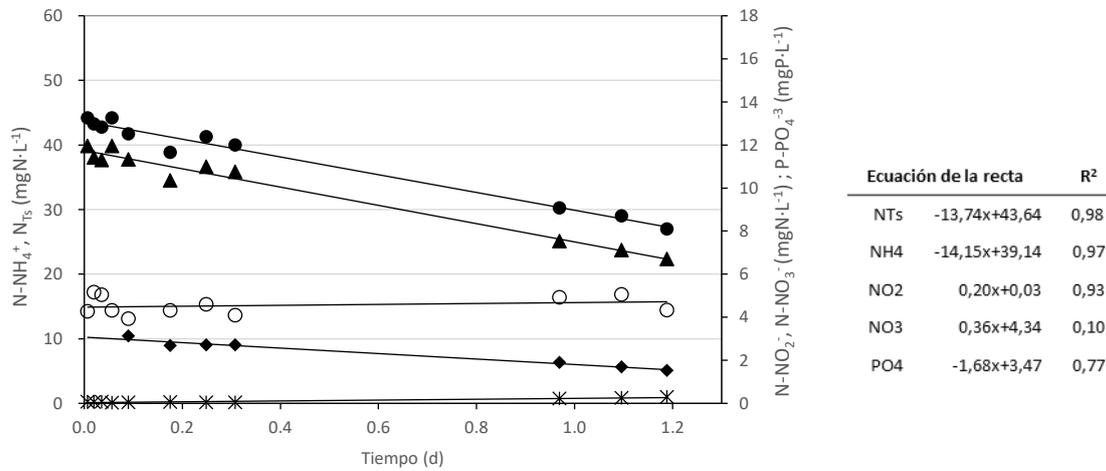
Atendiendo a los resultados obtenidos respecto a **FBR"A"** (Figura 17 (a)), se tiene que la concentración de NH_4^+ disminuyó desde $39,85 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ al inicio del ensayo, hasta $22,34 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$. La velocidad de consumo fue de $72,6 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. En este ensayo la concentración inicial de NO_2^- fue de $0,07 \text{ mgNL}^{-1}$, aumentando paulatinamente hasta alcanzar una concentración final de $0,29 \text{ mgNL}^{-1}$. Este fenómeno podría asociarse al proceso de oxidación de NH_4^+ llevado a cabo por las AOB, sin embargo, este aumento no es significativo, por lo que el cultivo podría seguir encontrándose bajo concentraciones de ATU.

En cuanto a la evolución del NO_3^- , permanece constante alrededor de $4,46 \pm 0,51 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

Observando la evolución de NTs, se obtiene una disminución desde $44,19$ hasta $26,97 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, con una velocidad de consumo de $70,5 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y tasa de eliminación del 37%.

Por último, respecto a la evolución del PO_4^{3-} , su concentración se redujo de $3,45$ a $1,53 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ es decir un 56%, obteniendo así una velocidad de $6,5 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

(a)



(b)

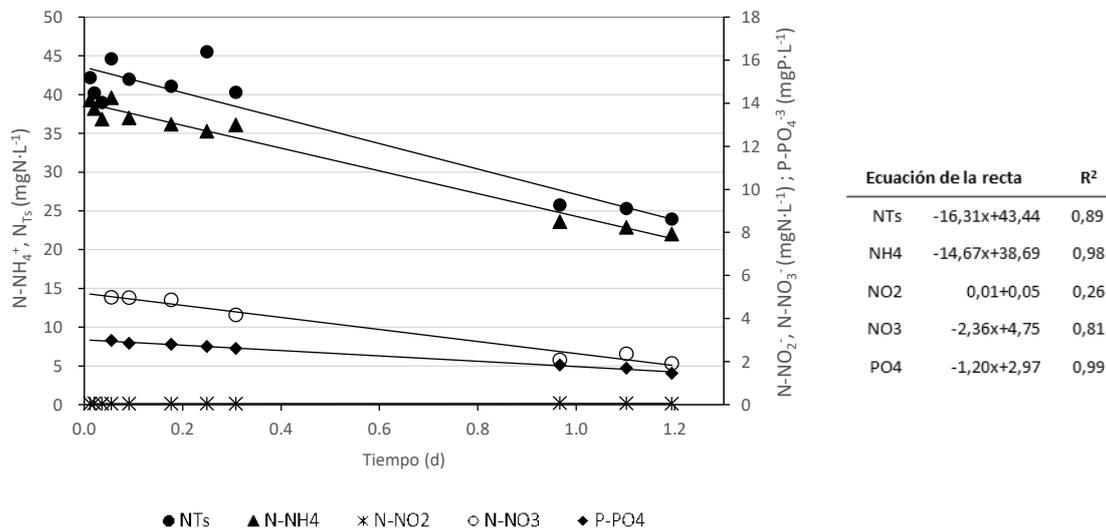


Figura 17: Ensayo 1.2. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR "A" (a) y en FBR "B" (b).

En cuanto al **FBR "B"** (Figura 17 (b)), la disminución de NH_4^+ (desde 39,30 hasta 21,98 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$) se produce a una velocidad de $75,2 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, similar a la obtenida en FBR "A". Dado que la concentración de NO_2^- es constante y prácticamente nula ($0,05 \pm 0,01 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$), el consumo de NH_4^+ se podría asociar directamente a la actividad algal.

En cuanto a la evolución de la concentración de NO_3^- , muestra tendencia lineal negativa, por lo que del mismo modo que ocurrió en el ensayo 1.1, esta reducción podría asociarse su consumo por parte de las microalgas. Además, cabe destacar que este fenómeno se produce en presencia de altas concentraciones de NH_4^+ .

Si observamos la evolución de NTs, se tiene que su concentración desciende desde 42,17 hasta 23,93 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de $83,6 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ resultando una tasa de eliminación del 44%.

Por último, la velocidad de consumo de fosfato resultó de $6,4 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ con un rendimiento de eliminación del 58%.

En resumen, la diferencia entre la producción de sólidos entre ambos FBR fue despreciable. No obstante, la velocidad de consumo de NTs aumentó un 19% en FBR" B". Por otro lado, a diferencia del ensayo anterior, la diferencia entre la velocidad de consumo de fosfato entre ambos FBR fue despreciable (2% menor en FBR" B").

Además, en el FBR" B" se volvió a obtener una reducción en la concentración de NO_3^- , el cual podría estar siendo consumido por las microalgas.

Con el objetivo de contrastar los resultados observados en los ensayos 1.1 y 1.2, se decidió realizar un tercer ensayo.

- *Ensayo 1.3*

Del mismo modo que en los ensayos anteriores, el licor mezcla se compuso de un 50% de cultivo y un 50% de alimento. La duración total de este ensayo fue de 1 día.

La concentración de NH_4^+ en el cultivo fue de $7,06 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ y en el alimento de $42,28 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otro lado, la concentración de P-PO_4^{3-} en el cultivo y alimento fue de 2,13 y $4,15 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. La concentración de SSV del cultivo y alimento fueron de 0 y $413 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan representados en la Figura 18 y en la Figura 19.

Dinámica del crecimiento algal

En la Figura 18 se muestra la evolución de los SSV a lo largo de todo el ensayo. Además, se ha representado la línea de tendencia asociada a dicha evolución.

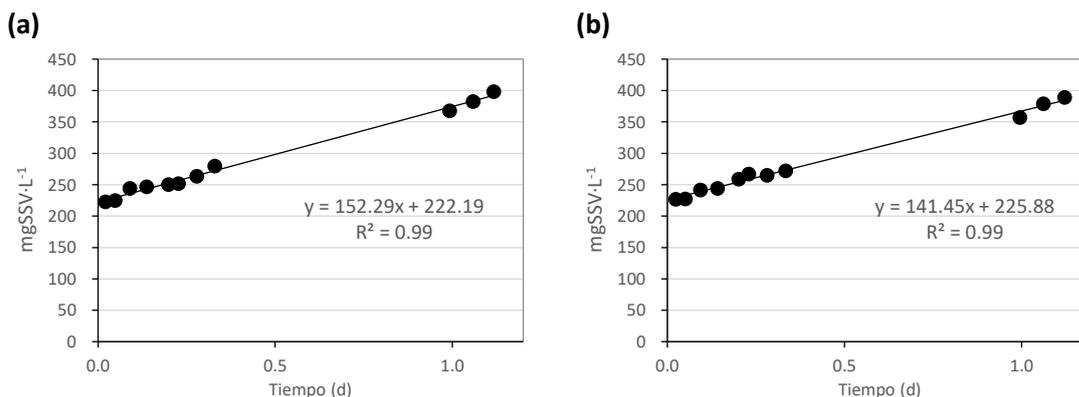


Figura 18: Ensayo 1.3. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).

El crecimiento algal sigue la misma tendencia lineal que en el resto de los ensayos.

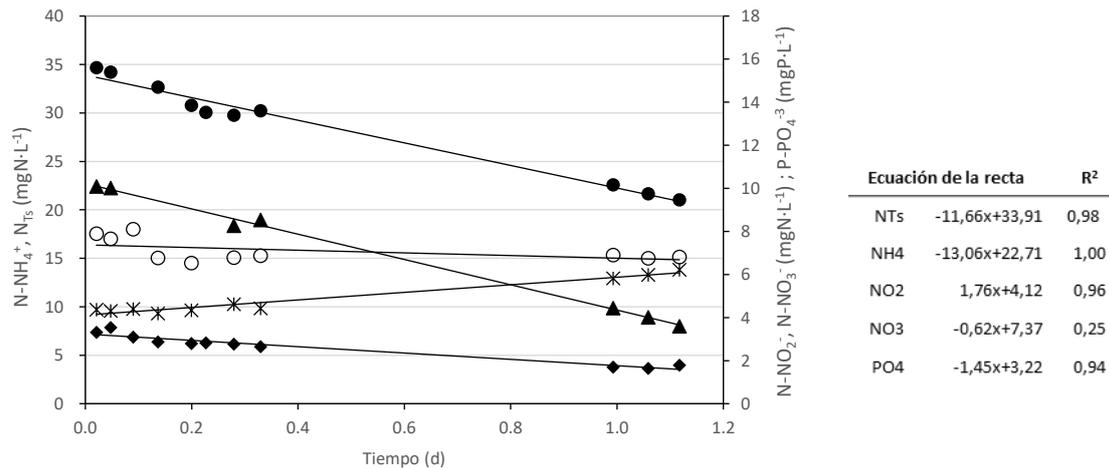
En este ensayo, la velocidad de producción de SSV obtenida en FBR" A" ($152,3 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), resultó superior a la obtenida en FBR" B", de $141,5 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. De modo que, se podría decir que la producción de sólidos en este ensayo, se ve favorecida en condiciones de no inhibición del proceso de nitrificación. Sin embargo, el crecimiento de las microalgas podría haberse visto

afectado por el aumento de pH producido debido al fallo en la monitorización del experimento.

Cambios en las concentraciones de nutrientes

En la Figura 19 se muestra la evolución de la concentración de nutrientes en cada uno de los FBR.

(a)



(b)

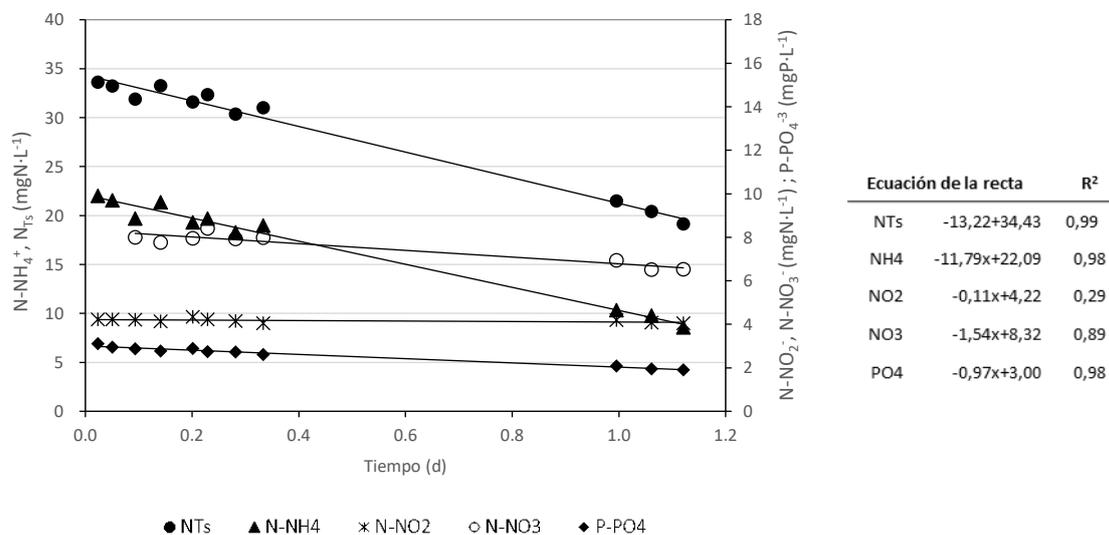


Figura 19: Ensayo 1.3. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR "A" (a) y en FBR "B" (b).

Comenzando con el análisis del **FBR "A"** (Figura 19 (a)), observamos un descenso pronunciado de NH_4^+ producido a una velocidad de $63,2 \text{ mgN} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Dicha reducción se debería a su consumo por parte de las microalgas y a la oxidación llevada a cabo por las AOB. A diferencia de los ensayos anteriores, en este puede apreciarse claramente el proceso de nitrificación ya que a medida que el NH_4^+ disminuye, se observa un aumento en la concentración de NO_2^- . Probablemente esto se debe a que el inóculo tenía una mayor actividad de AOB, como se

puede comprobar por la mayor concentración de NO_2^- del cultivo (Tabla 5). Así, la concentración de NO_2^- aumenta de 4,25 a 6,22 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

Por otro lado, durante las 2 primeras horas, la concentración media de NO_3^- es de $7,89 \pm 0,22$ $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, y a continuación descendiendo manteniéndose a una concentración de $6,78 \pm 0,12$ $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ prácticamente constante hasta finalizar el ensayo.

Con todo, se tiene que la concentración de NTs varía desde 34,68 hasta 21,02 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, con una velocidad de consumo de 56,5 $\text{mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y tasa de eliminación del 39%.

Por último, se tiene que la concentración de PO_4^{3-} , disminuye de 3,31 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ a 1,78 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de 6,4 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, es decir, se tiene un rendimiento de eliminación del 43%.

Por otro lado, en **FBR"B"** (Figura 19 (b)) se tuvieron las siguientes diferencias:

- La concentración de NO_2^- se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el ensayo ($4,17 \pm 0,09$ $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que indica que el proceso de nitrificación se encuentra completamente inhibido; La concentración final fue aproximadamente 2 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ menor que en FBR"A".
- Además, en este ensayo también se observó un descenso de la concentración de NO_3^- que podría asociarse a su consumo por parte de las microalgas aun disponiendo de elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal.
- La velocidad de consumo de NH_4^+ (57,1 $\text{mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) es inferior a la del FBR"A" ya que en este caso, se debe únicamente a su consumo por parte de las microalgas.
- En cuanto a la evolución de NTs, se produce una reducción desde 33,63 hasta 19,15 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ producida a una velocidad de 64,0 $\text{mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Así se obtiene una tasa de eliminación de 43%. Comparando con el FBR"A", la velocidad de consumo de NTs aumentó un 13%.
- Por último, la concentración de PO_4^{3-} se reduce desde 3,11 hasta 1,91 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de 4,7 $\text{mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y porcentaje de eliminación de 39%. En este caso la velocidad de consumo disminuyó un 27% en FBR"B".

Hay que tener en cuenta que, en este ensayo, el control del pH estuvo inactivo toda la noche, observando al día siguiente que se había alcanzado un pH de 9,2. Para pH superiores a 9, el fosfato puede precipitar dejando de estar biodisponible para los microorganismos. Además, se puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco. Debido a este aumento brusco de pH, los resultados podrían verse visto afectados. Por este motivo se decidió realizar otro ensayo análogo, a fin de obtener conclusiones relevantes en relación con el consumo de nitrato y rendimiento algal.

- *Ensayo 1.4*

De forma análoga a los ensayos anteriores, el licor mezcla se compuso de un 50% de cultivo y 50% de alimento. La duración de este ensayo fue de 1 día.

La concentración de N-NH_4^+ del cultivo y alimento fueron de 0,49 y 45,7 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, mientras que la concentración de P-PO_4^{3-} fue de 1,70 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cultivo y

de $3,74 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el alimento. La concentración de SSV del cultivo y alimento fueron de 0 y $413 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan representados en la Figura 20 y en la Figura 21.

Dinámica del crecimiento algal

La Figura 20 muestra la evolución de los SSV a lo largo de todo el ensayo.

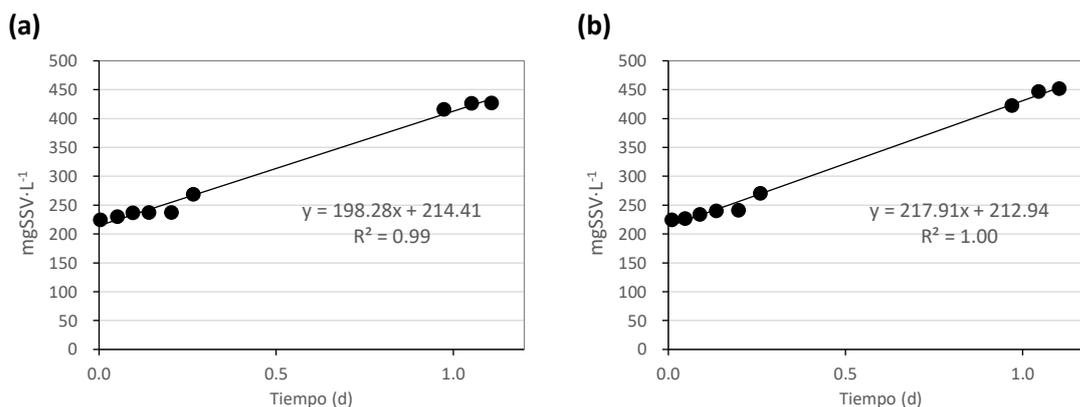


Figura 20: Ensayo 1.4. Evolución de la concentración de SSV en FBR "A" (a) y FBR "B" (b).

En este ensayo, las diferencias entre ambos FBR fueron significativas. Se obtuvo una velocidad de producción de SSV de $198,3 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ para FBR "A" y $217,9 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ para FBR "B". Esta diferencia indica que la velocidad de crecimiento algal es un 10% superior en FBR "B", es decir, que el crecimiento algal se vio favorecido en aquellas condiciones en las que el proceso de nitrificación se encuentra inhibido.

Cambios en las concentraciones de nutrientes

La evolución de la concentración de nutrientes en cada uno de los FBR se muestra en la Figura 21.

Si analizamos la evolución de los nutrientes en el **FBR "A"** (Figura 21 (a)), observamos un descenso en la concentración de NH_4^+ desde 22,80 hasta $3,20 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ obteniéndose un velocidad de consumo de $81,6 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

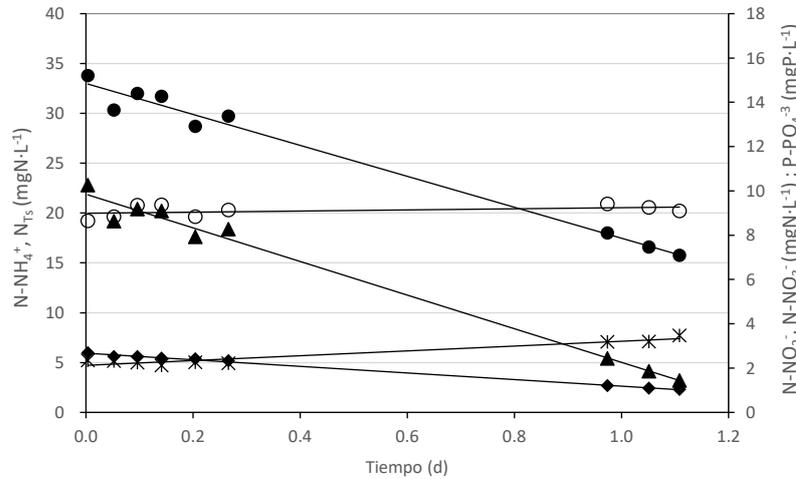
Por otro lado, se observa la actividad de las AOB a través del incremento de NO_2^- a lo largo del ensayo (desde 2,45 a $3,47 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$).

En cuanto a la concentración de NO_3^- parece que se mantuvo constante durante el ensayo con un valor de $9,04 \pm 0,32 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

La variación de NTs supone un descenso de su concentración desde 33,78 hasta $15,75 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, alcanzando una velocidad de eliminación de $76,2 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y una tasa de eliminación del 53%.

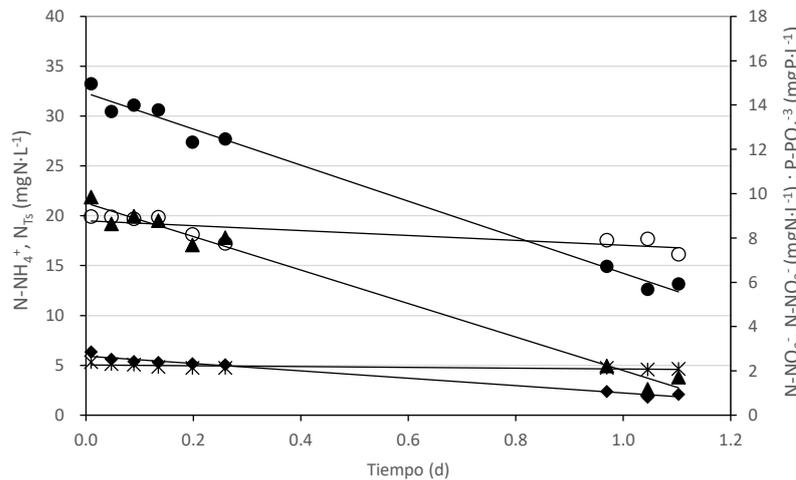
En cuanto al PO_4^{3-} , su concentración se redujo desde 2,72 a $1,04 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$, a una velocidad de $7,2 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y rendimiento del 62%.

(a)



Ecuación de la recta	R ²
NTs	-15,74x+33,19 0,98
NH4	-16,86x+21,88 0,99
NO2	1,09x+2,12 0,93
NO3	0,35x+8,90 0,26
PO4	-1,49x+2,67 1,00

(b)



Ecuación de la recta	R ²
NTs	-18,44x+32,63 0,99
NH4	-16,80x+21,28 0,99
NO2	-0,18x+2,27 0,57
NO3	-1,10x+8,77 0,64
PO4	-1,66x+2,66 0,98

● NTs ▲ N-NH4 * N-NO2 ○ N-NO3 ◆ P-PO4

Figura 21: Ensayo 1.4. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR"A" (a) y en FBR"B" (b).

Por otro lado, en **FBR"B"** (Figura 21 (b)), el descenso de la concentración de NH_4^+ es similar al del FBR"A". La concentración inicial de $21,89 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ desciende hasta una concentración final de $3,81 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, a una velocidad de $81,4 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Esta eliminación se podría atribuir directamente a la actividad algal ya que la concentración de NO_2^- se mantiene constante a lo largo del ensayo ($2,21 \pm 0,13 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$). La concentración final de NO_2^- fue aproximadamente $1,4 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ menor que en FBR"A".

Por otro lado, a diferencia del FBR"A", se vuelve a observar una tendencia decreciente en la concentración de NO_3^- (desde $8,51$ hasta $7,26 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que parece indicar que las microalgas consumen NH_4^+ y NO_3^- simultáneamente aunque a diferente velocidad.

En cuanto a la concentración de NTs, su concentración inicial fue de $34,07 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ y disminuye hasta un valor de $13,16 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de $89,3 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ alcanzando una tasa de eliminación del 61%.

En cuanto a la concentración de PO_4^{3-} desciende desde 2,72 hasta $0,94 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad $8,0 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ de y tasa de eliminación de 65%, (un 3% superior a la obtenida en FBR"A").

Del análisis de los resultados obtenidos en las analíticas de ambos FBR en el ensayo 1.4, se pueden destacar las siguientes conclusiones:

- La presencia de ATU muestra un efecto sobre la inhibición de las AOB que parece ser inmediato.
- La producción de biomasa fue un 10% superior en FBR"B", lo cual podría deberse al posible efecto inhibitorio del nitrito sobre las microalgas, ya que la concentración de este compuesto al final del ensayo fue $1,4 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ superior en FBR"A".
- La velocidad de consumo de NTs y fósforo aumentó un 17% y un 11% en FBR"B".
- De la evolución de la concentración de NO_3^- en FBR"B", se observa un descenso en su concentración que podría estar asociado a su consumo como nutriente por parte de las microalgas, en presencia de NH_4^+ .

- *Ensayo 1.5*

Este ensayo surge de la premisa de que, en el caso de existir algún parámetro inhibitorio de las microalgas, la proporción de cultivo/alimento empleada en los ensayos anteriores (50% de FBR4 y 50% de DI) podría no ser suficiente para disuadir los efectos del posible inhibidor.

Así, en este ensayo se empleó un 25% de cultivo (2L) y un 75% de alimento (6L), de forma que, en caso de existir algún parámetro con capacidad suficiente para inhibir a las microalgas, quedaría diluido.

La concentración de N-NH_4^+ del cultivo y alimento fueron de 0,06 y $38,62 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, mientras que la concentración de P-PO_4^{3-} fue de $1,61 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cultivo y de $3,77 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el alimento. La concentración de SSV del cultivo y alimento fueron de 0 y $287 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente

Debido a la dilución del cultivo, la duración de este ensayo fue superior a la de los ensayos anteriores (2,2 días).

Los resultados se encuentran representados en la Figura 22 y en la Figura 23

Dinámica del crecimiento algal

La Figura 22 muestra la evolución de los SSV a lo largo de todo el ensayo.

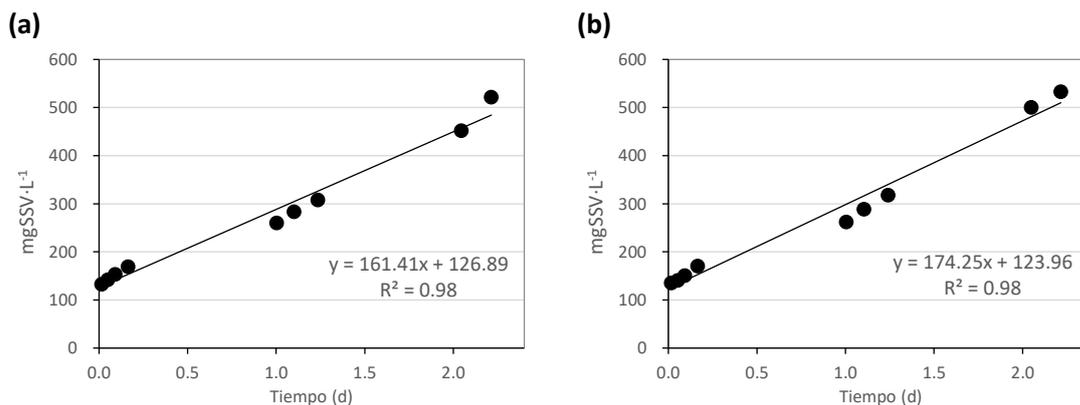


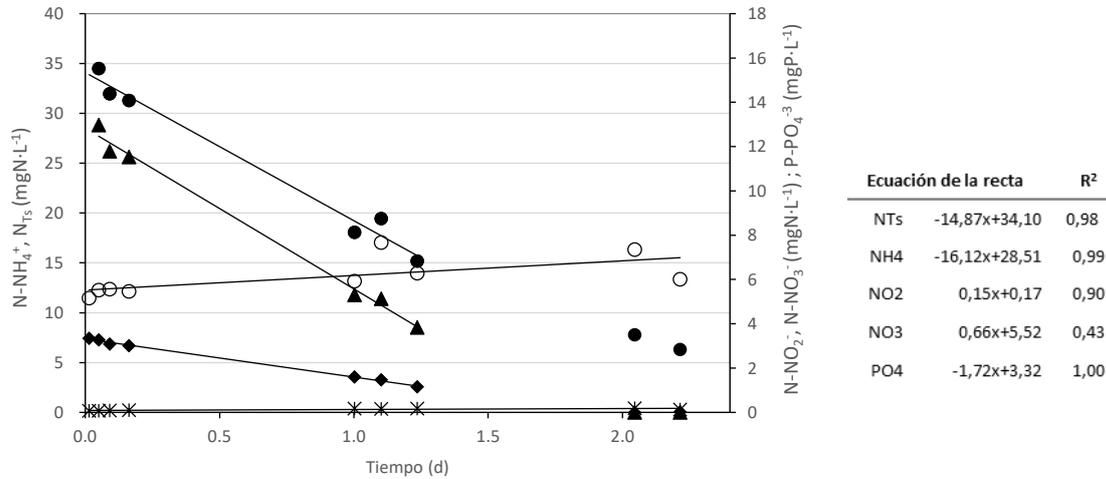
Figura 22: Ensayo 1.5. Evolución de la concentración de SSV en FBR "A" (a) y FBR "B" (b).

En este ensayo se volvió a observar que la mayor velocidad de crecimiento se dio para FBR "B" con un valor de 174,3 mgSSV·L⁻¹·d⁻¹, mientras que para FBR "A" la velocidad de crecimiento obtenida fue de 161,4 mgSSV·L⁻¹·d⁻¹, un 8% inferior. Así que, en este ensayo, parece que la producción de sólidos se encuentra favorecida en condiciones de inhibición del proceso de nitrificación.

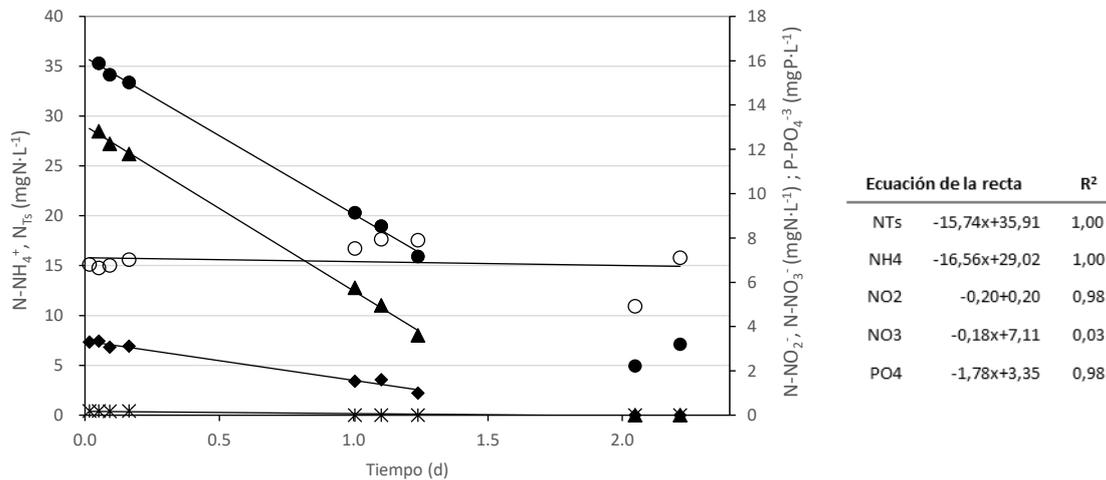
Cambios en las concentraciones de nutrientes

A continuación, se muestra la evolución de la concentración de nutrientes en cada uno de los FBR.

(a)



(b)



● NTs ▲ N-NH4 * N-NO2 ○ N-NO3 ◆ P-PO4

Figura 23: Ensayo 1.5. A la izquierda evolución de la concentración de nutrientes y a la derecha ecuación de la línea de tendencia y error cuadrático para FBR "A" (a) y en FBR "B" (b).

Dada su duración, a final del ensayo ambos FBR se encontraron limitados por nutrientes. Por este motivo, para la representación de las líneas de tendencia se eliminaron los valores de concentración nula. Lo mismo se hizo para el cálculo de la velocidad de consumo de nutrientes y tasa de eliminación. De esta forma, el período de estudio considerado fue el comprendido hasta 1,2 días.

Respecto al **FBR "A"** (Figura 23 (a)), dentro del período de estudio, la concentración de NH_4^+ disminuye desde 28,98 hasta 8,53 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de 112,3 $\text{mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Por otro lado, debido al proceso de nitrificación, se produce un aumento en la concentración de NO_2^- desde 0,12 hasta 0,37 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

En cuanto a la variación de la concentración de NO_3^- , desde el inicio del experimento hasta 1,2 días se produce un aumento de su concentración desde 2,75 hasta 6,28 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

Observando la eliminación de NTs, se tuvo un descenso de $31,85 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ al inicio del experimento hasta $15,18 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a los 1,2 días. La velocidad de consumo de NTs resultó de $103,6 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, muy por encima de la obtenida en el ensayo anterior, lo que podría indicar la existencia de algún parámetro inhibitorio. En cuanto a la tasa de eliminación de NTs se obtuvo un rendimiento del 52%.

Por último, la concentración de PO_4^{3-} descendió 3,35 hasta $1,15 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a los 1,2 días a una velocidad de $12,0 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y tasa de eliminación, de 64%.

Si analizamos la evolución de los nutrientes en el **FBR"B"** (Figura 23 (b)), se obtiene un reducción en la concentración de NH_4^+ desde 28,98 hasta $8,01 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de $115,4 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, ligeramente superior a la obtenida en FBR"A", teniendo en cuenta que su reducción se debe a su consumo por parte de la microalgas y no a su oxidación por parte de las AOB, ya que como se observa en la concentración de NO_2^- , el proceso de nitrificación se encuentra inhibido. La concentración de NO_2^- durante el período de estudio fue prácticamente nula ($0,12 \pm 0,09 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$).

Por otro lado, respecto a la evolución del NO_3^- , no se obtuvo la disminución producida en los otros ensayos, si no que su concentración aumenta desde 2,75 hasta $7,94 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a los 1,2 días. Este aumento podría deberse a la oxidación del NO_2^- , ya que a medida que este disminuye, aumenta la concentración de NO_3^- .

Por último, se obtuvieron unas velocidades de reducción de $109,7 \text{ mgN}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ para NTs y de $12,4 \text{ mgP}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ para PO_4^{3-} . Con un rendimiento de eliminación de NTs y fosfato 50 y 69% respectivamente.

En resumen, la diferencia entre la producción de sólidos entre ambos FBR resultó significativa (8% mayor en FBR"B"), al igual que la diferencia en la velocidad de consumo de NTs (un 6% superior en FBR"B"). Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la velocidad de eliminación de fosfato, cuya diferencia fue del 3%.

Comparando este ensayo con el ensayo 1.4, es posible que la diferencia de los resultados obtenidos se deba a la diferencia en la concentración de nitrito, ya que en el ensayo 1.4 fue mucho mayor que en el ensayo 1.5 (Tabla 5).

- *Síntesis de resultados*

Debido a que durante el ensayo 1.3 se produjo un fallo en el sistema de monitorización, los resultados obtenidos podrían haberse visto afectados. Por este motivo no se tendrán en cuenta esos resultados.

Del resto de los ensayos, se han obtenido las siguientes conclusiones:

- En cuanto a la **producción de biomasa algal**, las diferencias entre los ensayos 1.1, 1.4 y 1.5 resultaron significativas (8%, 10% y 8% respectivamente), viéndose el crecimiento favorecido en condiciones de inhibición del proceso de nitrificación (FBR"B"). Sin embargo, en el ensayo 1.2 no se produjo variación.
- Por otro lado, las diferencias en la velocidad de **eliminación de NTs** fueron significativamente superiores en el FBR"B" en todos los ensayos.

- Respecto a la velocidad de **eliminación de fosfato**, se obtuvieron diferencias significativas en los ensayos 1.1 y 1.4, favoreciendo la eliminación en FBR" B", mientras que en los ensayos 1.2 y 1.5 no se obtuvieron diferencias significativas.

Estos resultados indicarían que la proliferación de AOB genera una competencia con las microalgas en cuanto a la toma de nutrientes, sin embargo, la presencia de NO_2^- podría estar afectando los resultados, por lo que se debería comprobar si existe inhibición por este compuesto.

Por último, los ensayos 1.1, 1.2 y 1.4 mostraron que, en presencia de altas concentraciones de amonio, se produce una **reducción de la concentración de NO_3^-** . Esta reducción podría asociarse a su consumo como nutriente por parte de las microalgas. Este aspecto contradiría los resultados obtenidos en diferentes estudios que indican que el consumo de nitrato como fuente de nitrógeno por parte de las microalgas, se produce en ausencia de NH_4^+ (Hii *et al.*, 2011).

En la Tabla 6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en estos ensayos.

Tabla 6: Ensayos de velocidad de consumo de nutrientes (1.1-1.5). Resumen de resultados.

	Ensayo 1.1		Ensayo 1.2		Ensayo 1.3		Ensayo 1.4		Ensayo 1.5	
	FBR"A"	FBR"B"								
<i>Duración</i>	1día		1día		1día		1 día		2días	
<i>Composición del licor mezcla</i>	4L cultivo 4L alimento		2L cultivo 6L alimento							
<i>SSVo (mgSSV·L⁻¹)</i>	107		195		207		207		144	
<i>Concentración de ATU (mg·L⁻¹)</i>	-	20	-	20	-	20	-	20	-	20
<i>C_f N-NO₂⁻ (mgN·L⁻¹)</i>	1,00	0,73	0,29	0,05	6,44	4,20	3,47	2,09	0,30	0,00
<i>Velocidad producción SSV (mgSSV·L⁻¹·d⁻¹)</i>	138,6	149,6	189,2	188,8	152,3	141,5	198,3	217,9	161,4	174,3
<i>Velocidad de consumo de NH₄⁺ (mgN·gSSV⁻¹·d⁻¹)</i>	133,8	137,8	72,6	75,2	63,2	57,1	81,6	81,4	112,3	115,4
<i>Velocidad consumo NTs (mgN·gSSV⁻¹·d⁻¹)</i>	133,6	152,9	70,5	83,6	56,5	64,0	76,2	89,3	103,6	109,7
<i>Velocidad consumo PO₄³⁻ (mgP·gSSV⁻¹·d⁻¹)</i>	10,1	11,6	6,5	6,4	6,4	4,7	7,2	8,0	12,0	12,4
<i>Rendimiento eliminación NTs</i>	33%	34%	37%	44%	39%	43%	54%	61%	52%	50%
<i>Rendimiento de eliminación de PO₄³⁻</i>	32%	37%	56%	58%	43%	39%	62%	65%	64%	69%

5.2 Ensayos de inhibición por NO_2^- (corto plazo)

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los ensayos enfocados a evaluar el rendimiento algal frente a diferentes concentraciones de NO_2^- (0, 5, 10 y 20 $\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$) a corto plazo; es decir, mediante respirometrías.

- *Ensayo 2.1*

En este ensayo el licor mezcla se compone únicamente de cultivo de microalgas.

La concentración de N-NH_4^+ del cultivo empleado para realizar el ensayo fue nula, sin embargo, la concentración de NTs fue de 18,76 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, la concentración de P-PO_4^{3-} fue de 1,13 $\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ y la concentración de SSV de 450 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

En la Figura 24 se muestra la evolución de la concentración de DO en el FBR en presencia de diferentes concentraciones de NO_2^- .

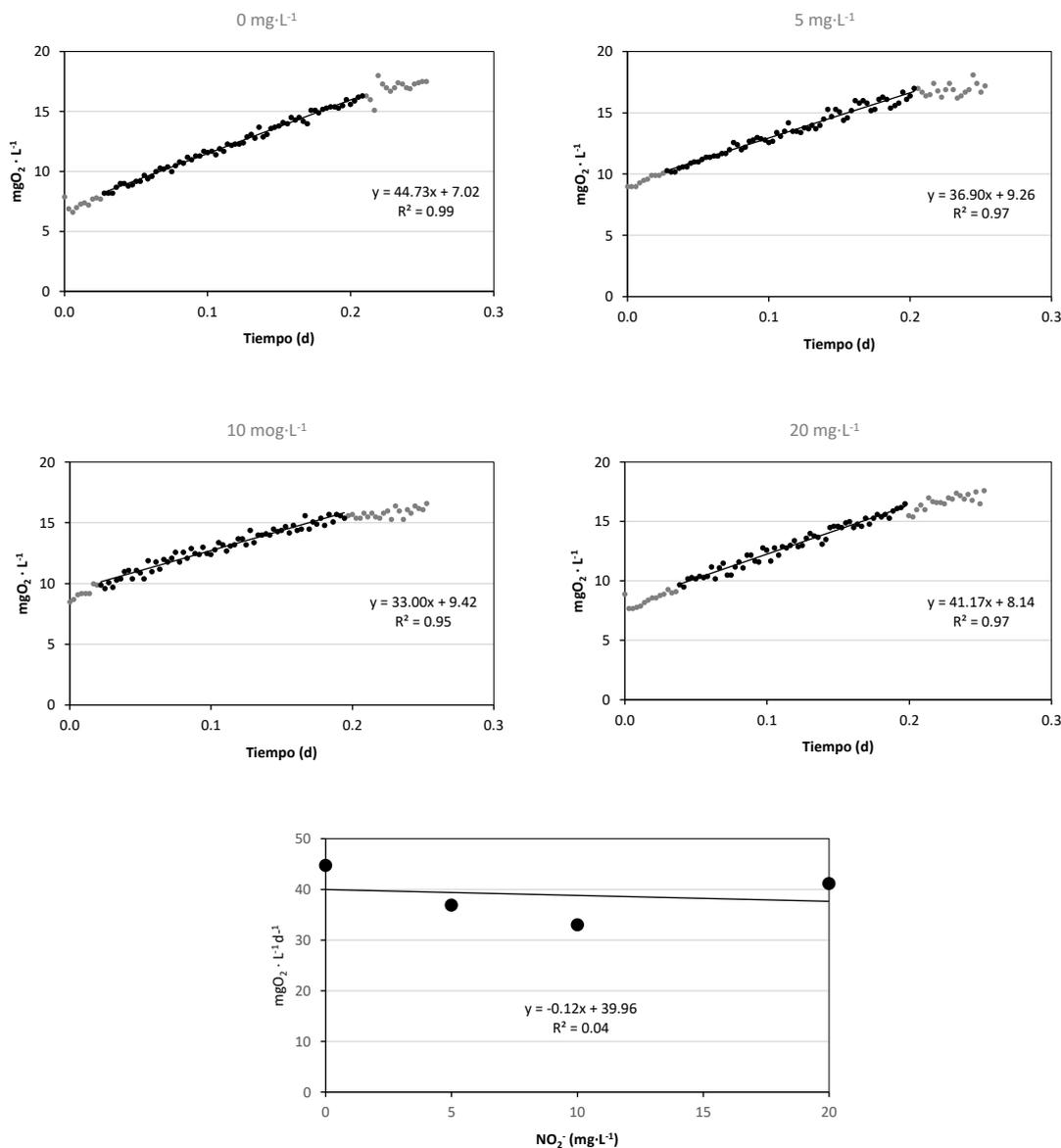


Figura 24: Ensayo 2.1. Evolución de la concentración de DO (mgO₂·L⁻¹) en el FBR en presencia de diferentes concentraciones de NO₂⁻ (0, 5, 10 y 20 mg·L⁻¹); y relación entre la OPR_{MA,F}* y la concentración de NO₂⁻ (bajo)

En caso de que la presencia de NO₂⁻ produjera un efecto inhibitorio en el metabolismo de las microalgas, deberíamos observar una disminución en la producción de oxígeno a medida que aumenta la concentración de NO₂⁻, lo que indicaría que la actividad fotosintética estaría disminuyendo. Sin embargo, el mayor valor (44,73 mgO₂·L⁻¹) se tiene para la concentración de 0 mgN·L⁻¹, seguido de la concentración de 20 mgN·L⁻¹, 5 mgN·L⁻¹ y por último 10 mgN·L⁻¹ con el mínimo valor (33,00 mgO₂·L⁻¹). En vista de los resultados obtenidos, no parece observarse ninguna tendencia clara entre el valor de las OPR_{MA,F}* obtenidas frente a la concentración de NO₂⁻.

Dada la baja concentración de nutrientes y elevada concentración de sólidos presentes en el licor mezcla, los resultados podrían verse afectados, por una parte, debido a la posible

limitación por nutrientes; y por otra, a la sombra producida en el interior del FBR, la cual dificulta la penetración de luz y, en consecuencia, la actividad fotosintética. Por consiguiente, se decide realizar otro ensayo similar, diluyendo el cultivo mediante la adición de alimento. De este modo se consigue bajar la concentración de SSV y aumentar la concentración de nutrientes.

- *Ensayo 2.2*

En este ensayo el licor mezcla se compone de un 50% de cultivo y 50% de sustrato.

Las características principales del licor mezclan en este ensayo fueron: concentración de N-NH_4^+ de $21,14 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, concentración de P-PO_4^{-3} de $2,76 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ y concentración de SSV de $225 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

La evolución de la concentración de DO en el FBR en presencia de las diferentes concentraciones de NO_2^- se muestra en la Figura 25. Los datos en color negro son los escogidos para la obtención de la $\text{OPR}_{\text{MA,F}}^*$.

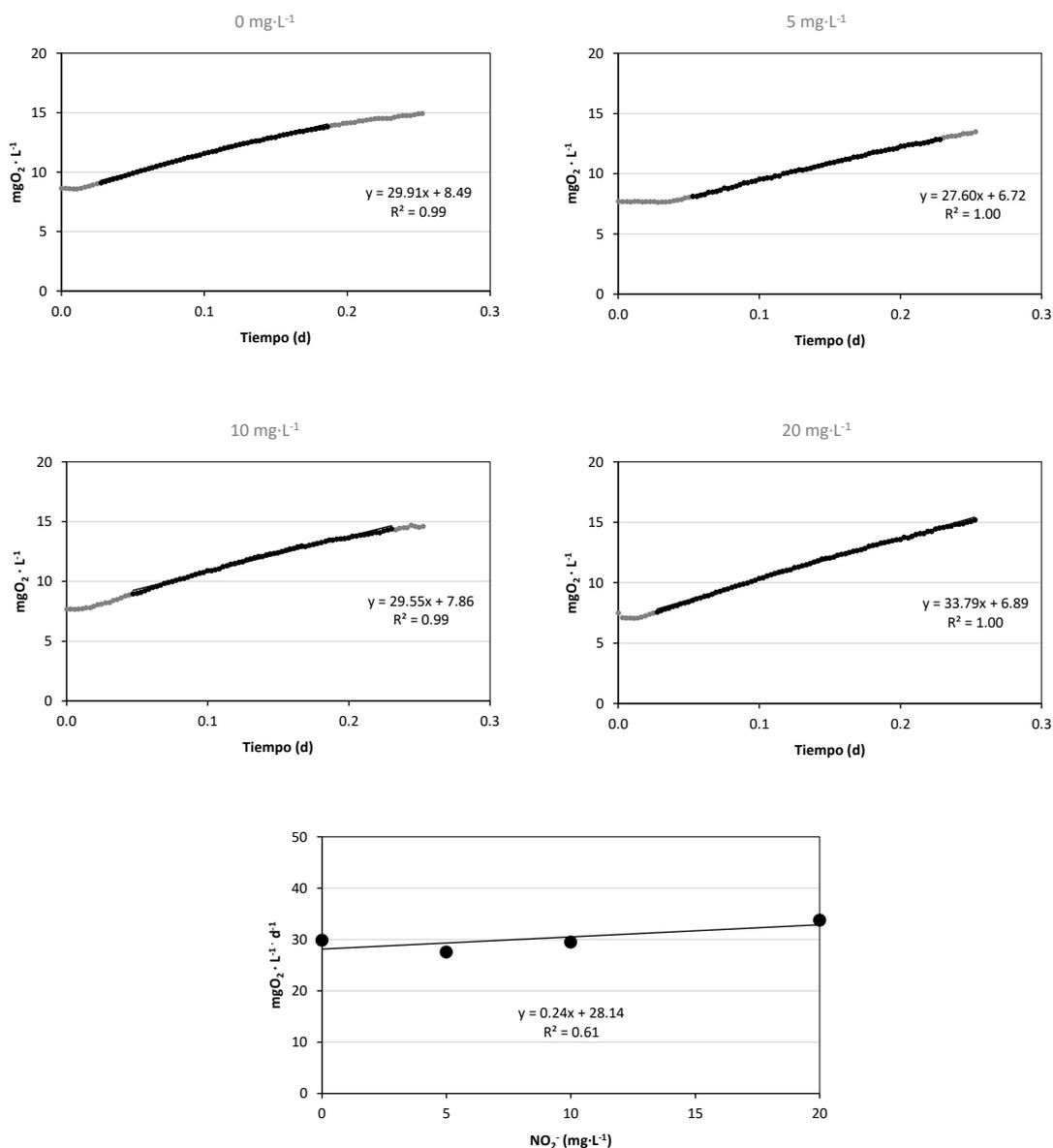


Figura 25: Ensayo 2.2. Evolución de la concentración de DO (mgO₂·L⁻¹) en el FBR en presencia de diferentes concentraciones de NO₂⁻ (0, 5, 10 y 20 mg·L⁻¹); y relación entre la OPR_{MA,F}* y la concentración de NO₂⁻ (bajo)

En este ensayo, a diferencia del anterior, la mayor OPR_{MA,F}* se tiene para la concentración de 20 mgN·L⁻¹ (33,79 mgO₂·L⁻¹), seguida de la de 0 mgN·L⁻¹, 10 mgN·L⁻¹ y 5 mgN·L⁻¹ con el valor mínimo obtenido (27,60 mgO₂·L⁻¹). No obstante, el promedio de las OPR_{MA,F}* obtenidas resulta de 30,21 ± 2,5 mgO₂·L⁻¹, es decir, la diferencia entre los disantos ensayos no parece significativa.

Sin embargo, en este ensayo los valores entre la OPR_{MA,F}* y la concentración de nitrito tampoco muestran ningún tipo de correlación.

En **síntesis**, del análisis de los datos obtenidos en ambos ensayos se considera que las diferencias obtenidas en la producción de oxígeno para las diferentes concentraciones de NO₂⁻

no son significativas. Dadas las discordancias entre los resultados obtenidos en el ensayo 2.1 y 2.2, a través de las respirometrías y del cálculo de la $OPR_{MA,F}^*$ no se puede asegurar que la presencia de NO_2^- produce un efecto inhibitorio en la actividad de las microalgas a corto plazo.

5.3 Ensayos de inhibición por NO_2^- (largo plazo)

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los ensayos enfocados a evaluar el rendimiento algal frente a diferentes concentraciones de NO_2^- (5, 10 y 20 $mg \cdot L^{-1}$) a largo plazo.

- *Ensayo 3.1: 5 $mg \cdot L^{-1}$ de NO_2^- .*

Este ensayo tuvo una duración de 4 días. Los reactores se operaban en semi-continuo, manteniendo un TRH de 3 días.

La concentración de amonio del cultivo y alimento fue de 33,35 y 62,37 $mg \cdot L^{-1}$ respectivamente, mientras que la concentración de $P-PO_4^{3-}$ fue de 4,10 $mg \cdot L^{-1}$ en el cultivo y de 5,75 $mg \cdot L^{-1}$ en el alimento. En ningún momento se produjo limitación de nutrientes en los FBR.

En cuanto a la concentración de $N-NO_2^-$, se tuvo una concentración de 1,19 $mg \cdot L^{-1}$ en el cultivo y de 0,00 $mg \cdot L^{-1}$ en el alimento. De esta forma, la concentración de $N-NO_2^-$ en FBR "A" fue prácticamente despreciable, mientras que en FBR "B" se mantuvo una concentración de 5 $mg \cdot L^{-1}$ mediante la adición de patrón de nitrato.

La concentración de SSV al inicio del ensayo fue de 626 $mg \cdot L^{-1}$.

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan representados en la Figura 26, Figura 27 y Figura 28.

Dinámica del crecimiento algal

En la Figura 26 se muestra, la concentración de SSV para cada FBR durante en tiempo de ensayo.

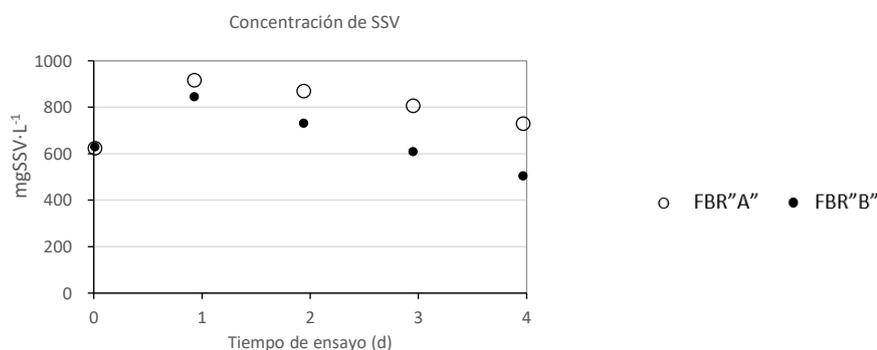


Figura 26: Ensayo 3.1. Evolución de la concentración de SSV ($mg \cdot L^{-1}$) para cada FBR.

Como se puede observar, existe una diferencia bastante significativa en la evolución de la concentración de SSV para cada FBR.

A partir del primer día de ensayo se observa una reducción en la producción de sólidos en ambos FBR. No obstante, para todos los días de ensayo, la concentración de SSV mayor se dio para el FBR "A", con una concentración media a partir del primer día de $830 \pm 81 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$. Al final del ensayo se obtuvo un aumento del 14% respecto de la concentración inicial en la concentración de SSV.

En cuanto al FBR "B" la concentración media a partir del primer día resultó de $671 \pm 148 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$. De este modo, la concentración de SSV obtenida al final del ensayo fue un 24% inferior a la concentración inicial.

Así, los resultados parecen indicar que la producción de biomasa algal se ve favorecida en FBR "A", es decir, en ausencia de NO_2^- .

Evolución de la concentración de nutrientes

A continuación, en la Figura 27 y Figura 28 se muestran, a la izquierda, las velocidades de eliminación de nutrientes obtenidas en cada día de ensayo para cada FBR; y a la derecha los valores de concentración inicial y final y rendimiento de eliminación.

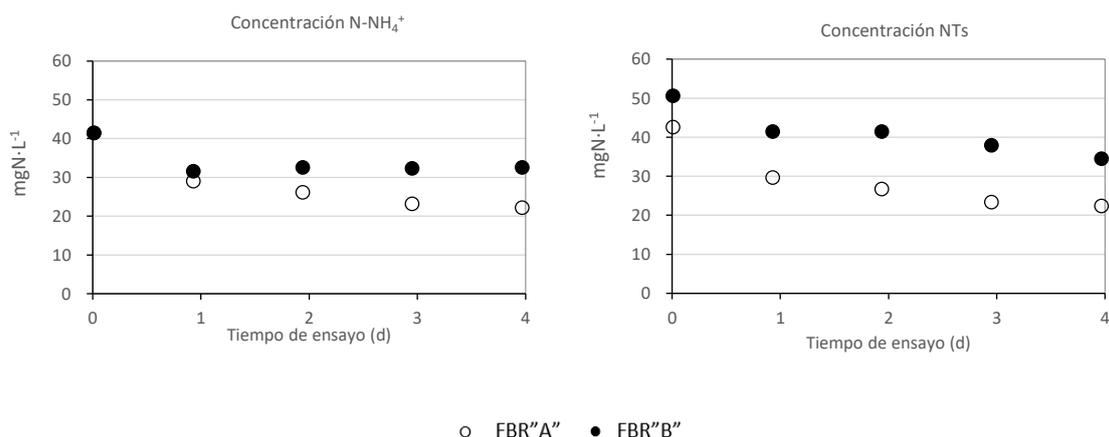


Figura 27: Ensayo 3.1. Evolución de la concentración de N-NH_4^+ (izquierda) y NTs (derecha) en $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

En cuanto al **amonio**, se observa que en el FBR "B" las concentraciones fueron mayores, obteniéndose una concentración media a partir del primer día de $32,24 \pm 0,47$. Por otro lado, la concentración media obtenida para FBR "A" fue de $25,09 \pm 3,10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$. Así, se obtuvo un rendimiento de eliminación del 47% en FBR "A", significativamente superior que el obtenido en FBR "B" (22%).

Por otro lado, las concentraciones medias de **NTs** a partir del primer día fueron de $25,55 \pm 3,31 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ para FBR "A" y de $38,85 \pm 3,32 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ para FBR "B", obteniéndose unos rendimientos de eliminación de 47 y 32% respectivamente.

Dado que el proceso de nitrificación se encuentra inhibido, la reducción de la concentración de amonio se debe únicamente a su consumo por parte de las microalgas, de forma que, en vista de los resultados, parece que una concentración de nitrito de $5 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ produce un efecto inhibitorio sobre las microalgas, disminuyendo el rendimiento de consumo de amonio en un

25%. Así, el rendimiento de eliminación total de nitrógeno, se reduce un 15% en presencia de nitrito.

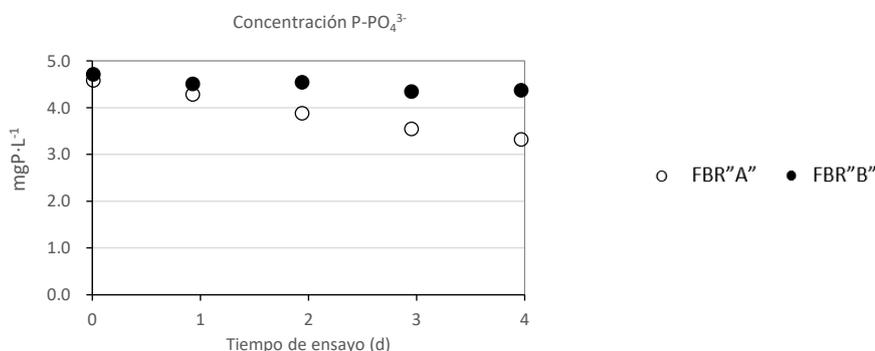


Figura 28: Ensayo 3.1. Evolución de la concentración de P-PO₄³⁻ en mgP·L⁻¹

Por último, las diferencias en la concentración de fosfato entre ambos FBR también resultan significativas (Figura 28).

La concentración media de fosfato en FBR "B" se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el ensayo ($4,50 \pm 0,15$ mgP·L⁻¹), es decir, el consumo de fosfato es prácticamente nulo, resultando un rendimiento de eliminación del 7%. Sin embargo, la reducción obtenida en FBR "A" es significativamente más pronunciada. La concentración media a partir del primer día resultó de $3,76 \pm 0,42$ mgP·L⁻¹ obteniéndose un rendimiento de eliminación del 27%.

De forma simplificada, en vista de los resultados se puede concluir que el rendimiento algal se ve significativamente reducido bajo una concentración de 5 mgN·L⁻¹. En concreto, la producción de biomasa descendió un 37% y los rendimientos de eliminación de amonio, NTs y fosfato disminuyeron un 25%, 16% y 20% respectivamente.

- *Ensayo 3.2: 10 mgN·L⁻¹ de NO₂⁻.*

La duración de este ensayo fue de 6 días. Los reactores se operaban en semi-continuo, manteniendo un TRH de 3 días.

Respecto a los nutrientes, la concentración de amonio fue de $11,26$ mgN·L⁻¹ para el cultivo y de $46,91$ mgN·L⁻¹ para el alimento. La concentración de fosfato fue de $0,00$ y $2,97$ mgP·L⁻¹ para cultivo y alimento respectivamente.

El último día del ensayo, los nutrientes se agotaron en ambos FBR, por lo que para el análisis de resultados se eliminaron los obtenidos para ese día.

Por otro lado, la concentración de nitrito en cultivo y alimento fue de $0,00$ mgN·L⁻¹. De esta forma, se pudo mantener el FBR "A" en ausencia de nitrito y el FBR "B" a una concentración de 10 mgN·L⁻¹ mediante la adición de patrón de nitrito.

Por último, la concentración inicial de SSV en ambos FBR fue de 521 mg·L⁻¹.

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan representados en la Figura 29, Figura 30 y Figura 31.

Dinámica del crecimiento algal

En la Figura 29 se muestra la evolución de la concentración de SSV para cada FBR.

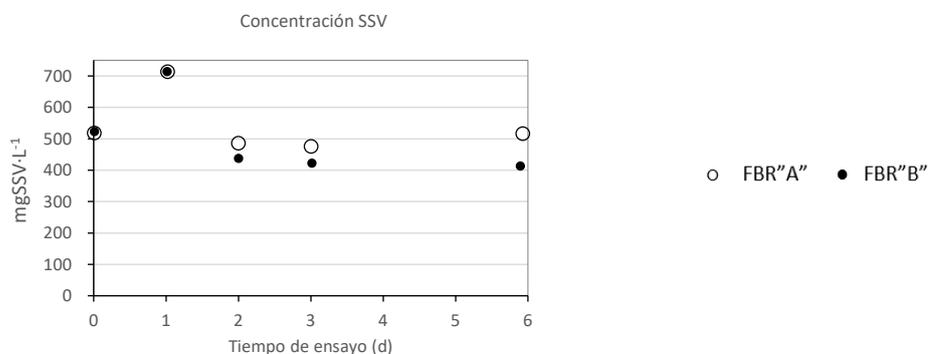


Figura 29: Ensayo 3.2. Evolución de la concentración de SSV ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para cada FBR.

En este ensayo, debido a la limitación de nutrientes, las diferencias no son tan significativas. No obstante, se puede observar que la concentración de microalgas es superior en el FBR sin nitrito (FBR'A'). El primer día de ensayo las concentraciones de ambos FBR fueron similares.

A partir del primer día, la concentración media obtenida para FBR'A' $493 \pm 21 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$. La limitación de nutrientes dificulta la producción de biomasa algal, de forma que, en este FBR, la variación de la concentración final respecto de la inicial fue nula. Por otro lado, la concentración media de FBR'B' a partir del segundo día fue de $497 \pm 145 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$. Del mismo modo que en el ensayo anterior, la presencia de NO_2^- parece disminuir el rendimiento algal, ya que, en este FBR, la concentración de SSV se redujo un 21% respecto de la concentración inicial.

Evolución de la concentración de nutrientes

La Figura 30 muestra la evolución de la concentración de amonio(izquierda) y NTs (derecha). Por otro lado, la Figura 31 muestra la variación de la concentración de fosfato.

Como se puede observar, la concentración de amonio a partir del segundo día fue inferior a $13 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 30, izquierda) en tanto en FBR'A' como en FBR'B' ($7,99$ y $12,18 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente) por lo que los resultados en cuanto a rendimiento de eliminación amonio y NTs, podrían haberse visto reducidos (Ruiz-Martinez et al. 2014).

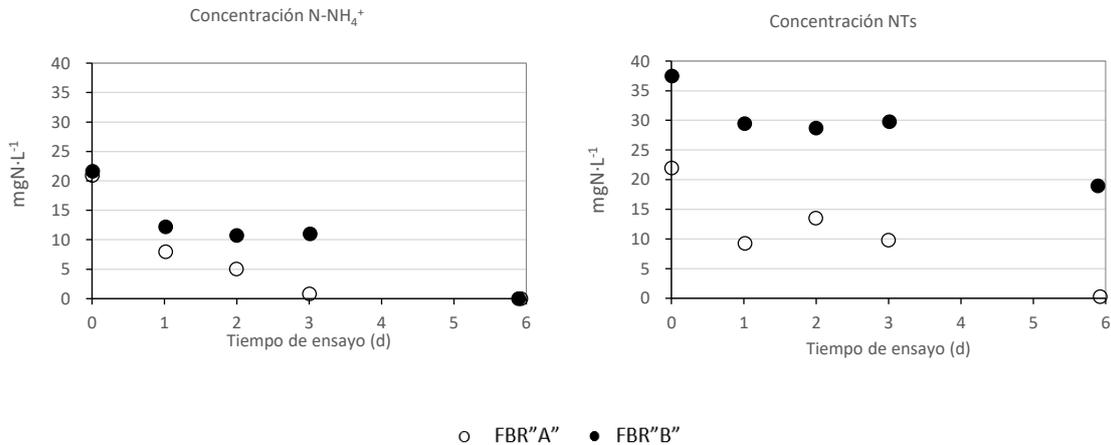


Figura 30: Ensayo 3.2. Evolución de la concentración de N-NH₄⁺ (izquierda) y NTs (derecha) en mgN·L⁻¹.

En cuanto a la evolución de la concentración de nitrógeno, dado que el último día de ensayo ambos FBR agotaron el amonio por completo, los rendimientos de eliminación de amonio y NTs se han calculado hasta el tercer día de ensayo.

Respecto a la concentración de **amonio**, se observa que su consumo es significativamente mayor en FBR"A". Entre los días 1, 2 y 3 se observa una reducción de la concentración alcanzándose un rendimiento de eliminación del 96%. Por otro lado, durante este período, la concentración en FBR"B" se mantiene alrededor de $11,31 \pm 0,76$ mgN·L⁻¹, obteniéndose un rendimiento de eliminación significativamente inferior al obtenido en de FBR"A" (49%).

Por otro lado, durante los días 2, 3 y 4, la concentración media de NTs fue de $10,84 \pm 2,33$ mgN·L⁻¹ para FBR"A", inferior a la obtenida en FBR"B" de $29,30 \pm 0,57$ mgN·L⁻¹ (Se debe tener en cuenta que de la diferencia entre ambos, $10\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ se deben al patron de NO₂⁻ añadido en FBR"B"). Los rendimiento de eliminación de NTs hasta el tercer día fueron de 56% y 20% para FBR"A" y FBR"B" respectivamente.

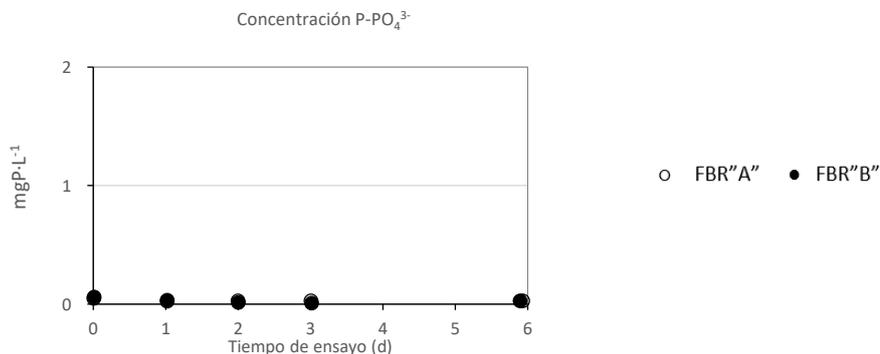


Figura 31: Ensayo 3.2. Evolución de la concentración de P-PO₄³⁻ en mgP·L⁻¹

Por último, debido a la baja concentración de fosfato es en alimento ($2,97$ mgP·L⁻¹), al final de cada ciclo el contenido de fosfato se encontraba prácticamente agotado. La concentración media de fosfato para FBR"A" y FBR"B" a lo largo de todo el ensayo fue de $0,03 \pm 0,00$ y $0,02 \pm 0,01$ mgP·L⁻¹ respectivamente (Figura 31).

Los resultados obtenidos muestran que en presencia de $10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrito, se produce una reducción de la producción biomasa del 21% y una disminución del rendimiento de eliminación de amonio y NTs del 47% y 35%. La eliminación de fosfato es del 100% en ambos FBR debido a la baja concentración inicial. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el ensayo anterior, observamos que bajo una concentración de $5 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrito la producción de biomasa fue mayor que en presencia de $10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrito. Esto puede ser debido a la limitación de nutrientes tanto de amonio como de fosfato, de forma que los resultados obtenidos en este ensayo podrían haberse visto disminuidos. Aun teniendo en cuenta este último aspecto, el rendimiento de eliminación de amonio y NTs resultó un 22% y un 19% superior en este ensayo.

- *Ensayo 3.3: $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NO_2^- .*

Este ensayo tuvo una duración de 5 días. De forma análoga a los ensayos anteriores, Los reactores se operaban en semi-continuo, manteniendo un TRH de 3 días.

La concentración de amonio en el cultivo y alimento fue de $11,91$ y $52,47 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. La concentración de fosfato fue de $0,04 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cultivo y $3,99 \text{ mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ en el alimento.

Respecto al nitrito, tanto el cultivo como el alimento la concentración fue de $0,00 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que facilitó que el FBR "A" trabajara en ausencia de este compuesto y que el FBR "B", mediante la adición de patrón de nitrito, trabajar a una concentración de $20 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

Al tercer día del ensayo, ambos FBR se encontraron limitados por nutrientes.

Por último, la concentración inicial de SSV en ambos FBR fue de $313 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los resultados obtenidos en este ensayo quedan representados en la Figura 32, Figura 33 y Figura 34.

Dinámica del crecimiento algal

La Figura 32 muestra la evolución de la concentración de los SSV en cada FBR.

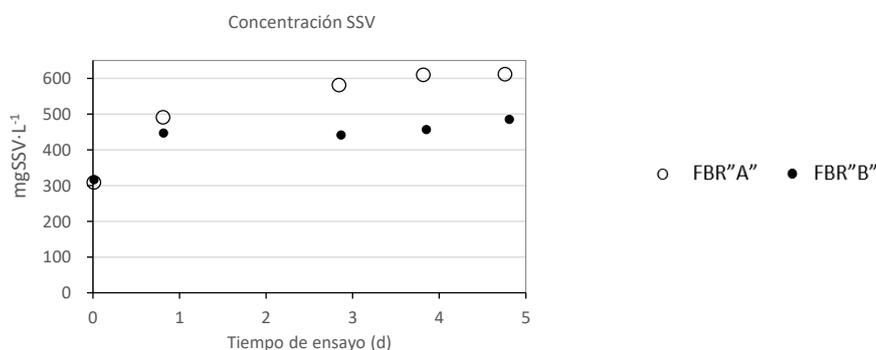


Figura 32: Ensayo 3.3. Evolución de la concentración de SSV ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para cada FBR.

Del mismo modo que en los ensayos anteriores, se observa que la diferencia en la producción de sólidos entre FBR "A" y FBR "B" es bastante significativa.

Desde el primer día, la concentración media en FBR"A" fue de $574 \pm 57 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$, obteniéndose un incremento del 98% al final del ensayo. En cuanto a FBR"B", la concentración media fue de $457 \pm 20 \text{ mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ obteniéndose un incremento de sólidos inferior a FBR"A" (53%).

Evolución de la concentración de nutrientes

A partir del tercer día el amonio se agotó en FBR"A", mientras que en FBR"B" aunque disponía de amonio, su concentración fue limitante ($<10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$). Además, debido a la baja concentración de fosfato del alimento, la concentración de este compuesto se agotaba antes de la siguiente alimentación. Por este motivo, los rendimientos obtenidos en cuanto a eliminación de nutrientes podrían verse reducidos.

La Figura 33 muestra la evolución de la concentración amonio (izquierda) y NTs (derecha) en ambos FBR.

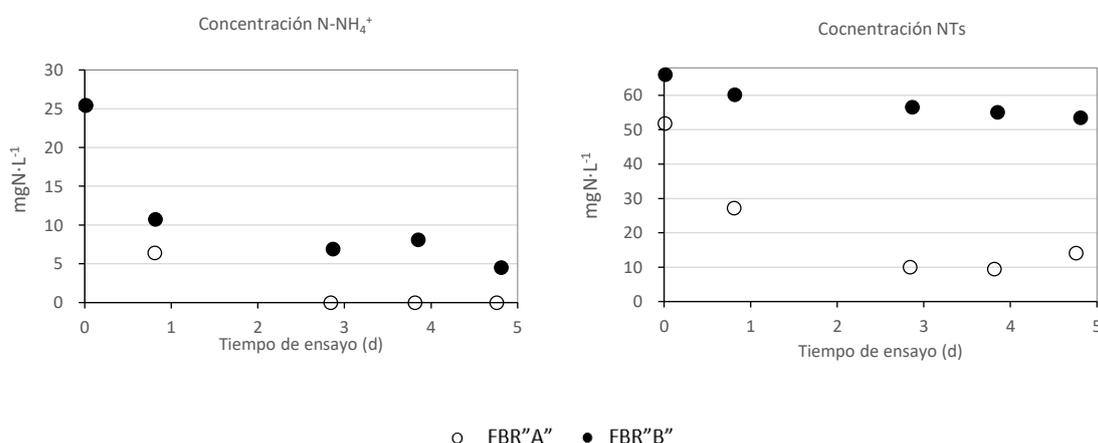


Figura 33: Ensayo 3.3. Evolución de la concentración de N-NH_4^+ (izquierda) y NTs (derecha) en $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

En cuanto a la eliminación de **amonio**, se observa que su concentración es significativamente inferior en FBR"A". Al tercer día el amonio se había consumido por completo en este FBR, mientras que en FBR"B" se había consumido un 73%. Por este motivo, el rendimiento se ha comparado teniendo en cuenta la concentración obtenida hasta el primer día de ensayo. De esta forma, se tiene que el rendimiento de eliminación de amonio es del 75% para FBR"A" y del 58% para FBR"B.

En cuanto al rendimiento del **NTs**, del mismo modo que el rendimiento de amonio se ha calculado para el primer día. Así se obtuvo una reducción del 9% para FBR"B" significativamente inferior a la obtenida en FBR, del 48%.

En vista de los resultados, se puede observar que, en presencia de nitrito, la eliminación tanto de amonio como de NTs es significativamente menor.

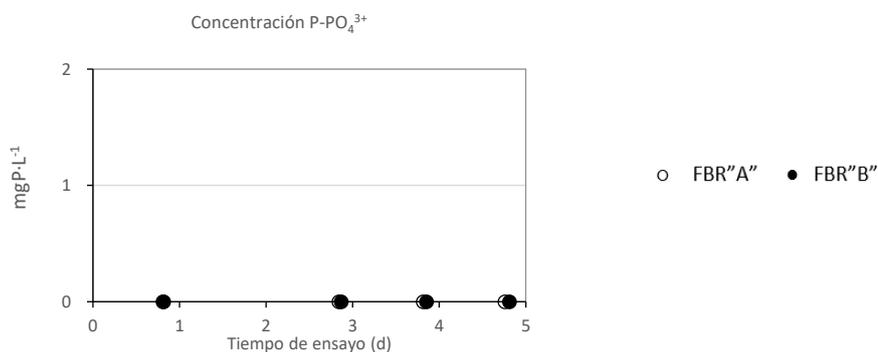


Figura 34: Ensayo 3.3. Evolución de la concentración de P-PO₄³⁻ en mgP·L⁻¹

Por último, en la Figura 34 se observa que, del mismo modo que ocurría en el ensayo anterior, el fosfato acaba consumiéndose en cada ciclo debido a la baja concentración de fosfato del alimento (3,99mgP·L⁻¹).

En vista de los resultados obtenidos, se puede decir que en presencia de 20 mgN·L⁻¹ de nitrito, se produce una reducción del rendimiento algal. Por un lado, la producción de biomasa en presencia de nitrito es un 45% inferior en comparación con FBR "A". Por otro lado, la eliminación de amonio y NTs se reduce un 17 y 39% respectivamente. Sin embargo, estas diferencias podrían ser mayores si el medio no se hubiera encontrado limitado por nutrientes. No obstante, cabe destacar que la mayor reducción de la producción de biomasa se dio para este ensayo.

- *Síntesis de resultados*

En cada uno de los ensayos se mostraron diferencias significativas entre ambos FBR en la productividad de biomasa y rendimiento de eliminación de nutrientes. Además, en todos ellos se mostró que el rendimiento de depuración y productividad de biomasa fue superior en los reactores en ausencia de nitrito.

Respecto a la depuración del rendimiento de depuración, otros estudios muestran que la proliferación de AOB genera una competencia con las microalgas por la toma de nutrientes, provocando una reducción del rendimiento de depuración (González-Camejo et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indicarían que la reducción del rendimiento no se debería a la competencia por la toma de nutrientes, sino que, debido al proceso de nitrificación llevado a cabo por las AOB, aumenta la concentración de nitrito en los FBR produciendo un efecto inhibitorio sobre las microalgas.

No obstante, debido a la limitación de nutrientes producida en los ensayos 3.1 (10 mgN·L⁻¹) y 3.2 (20 mgN·L⁻¹), no se puede establecer una relación entre la concentración de nitrito y la disminución de la productividad y eliminación de amonio, sin embargo, sí que se observa una disminución del rendimiento de eliminación del NTs a mayor concentración de NO₂

La Tabla 7 muestra un resumen de los resultados obtenidos en este experimento.

Tabla 7: Ensayos de inhibición por NO_2^- a largo plazo (3.1-3.3). Resumen de resultados

	Ensayo 3.1 $5 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$		Ensayo 3.2 $10 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$		Ensayo 3.3 $20 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$	
	FBR"A"	FBR"B"	FBR"A"	FBR"B"	FBR"A"	FBR"B"
TRC				3 días		
Duración		4días		6días		5días
SSVo ($\text{mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}$)		625		521		313
N-NO_2^- ($\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	5	0	10	0	20
Rendimiento producción de biomasa	14%	-24%	0%	-21%	98%	53%
Rendimiento de eliminación de NH_4^+	47%	22%	96%	49%	75%	58%
Rendimiento de eliminación de NTs	47%	32%	56%	20%	48%	9%
Rendimiento de eliminación de PO_4^{3-}	27%	7%	100%	100%	100%	100%

5.4 Ensayo de Tiempo de Retención Celular (TRC)

Este ensayo tuvo una duración de 11 días en la que el FBR"A" se operaba a TRC de 2 días y el FBR"B" a TRC de 4,5 días.

La concentración inicial de nutrientes del cultivo fue de $0,00\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ de amonio, $32,33\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrato y $1,82\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato.

Por otro lado, durante los 4 primeros días se empleó un alimento cuya concentración de amonio y fosfato fue de $50,76\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4,88\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir del quinto día se cambió la muestra del permeado empleado para alimentar los FBR, conteniendo una concentración de $49,83\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ de amonio y de $4,34\text{mgP}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato.

La concentración inicial de SSV en ambos reactores fue de $358\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

La evaluación de la competencia entre microalgas y bacterias AOB a diferente TRC se realiza a largo y a corto plazo.

- *Ensayo 4.1. A largo plazo*

La evaluación de la competencia entre microalgas y AOB se llevó a cabo destacando las diferencias observadas entre ambos FBR.

Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 35, Figura 36 y Figura 37.

Dinámica del crecimiento algal

La Figura 35 se muestra la velocidad de producción de biomasa.

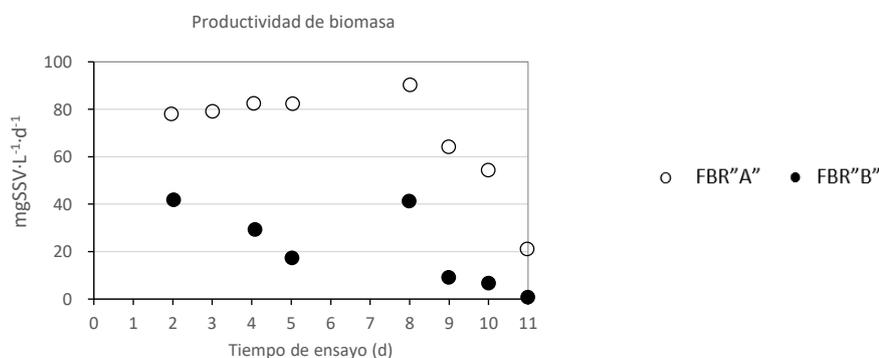


Figura 35: Ensayo 4.1. Productividad de biomasa ($\text{mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) en ambos FBR

A simple vista, en la Figura 35 se puede observar una diferencia bastante significativa en la productividad de biomasa entre ambos FBR.

Cabe destacar que, a partir del día 5, a final de cada ciclo, el fosfato se había agotado en ambos FBR. Por este motivo, los resultados podrían no ser representativos debido a la posible limitación de nutrientes. Así, la productividad de biomasa media en ambos FBR se ha calculado tomando los resultados obtenidos entre los días 1 y 5.

En cuanto al FBR"A", la productividad media obtenida fue de $82,4 \pm 4,8 \text{mgSSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. A pesar de la limitación de nutrientes, la productividad de biomasa en cada día de ensayo fue superior

a las obtenida en FBR" B". La menor productividad en el FBR con mayor TRC puede deberse al mayor efecto sombra (*Abu-Ghosh et al., 2016*) y a que el cultivo de microalgas se va haciendo más viejo (*Almomani et al., 2019*). Además, pueden aparecer organismos competidores que dificulten la toma de nutrientes por parte de las microalgas.

Por otro lado, las variaciones que se observan para FBR" B" entre el día 1 y 5 se deben al ajuste del volumen de purga para mantener el TRC de 4,5 días. La productividad media obtenida para este FBR resultó de $27,0 \pm 15,7 \text{ mgSSV} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

En vista de los resultados obtenidos, parece que la productividad de biomasa algal se vio favorecida para el TRC de 2 días.

Velocidad de eliminación de nutrientes

A continuación, se muestra la Figura 36 para llevar a cabo la evaluación de la eliminación de NTs y del proceso de nitrificación.

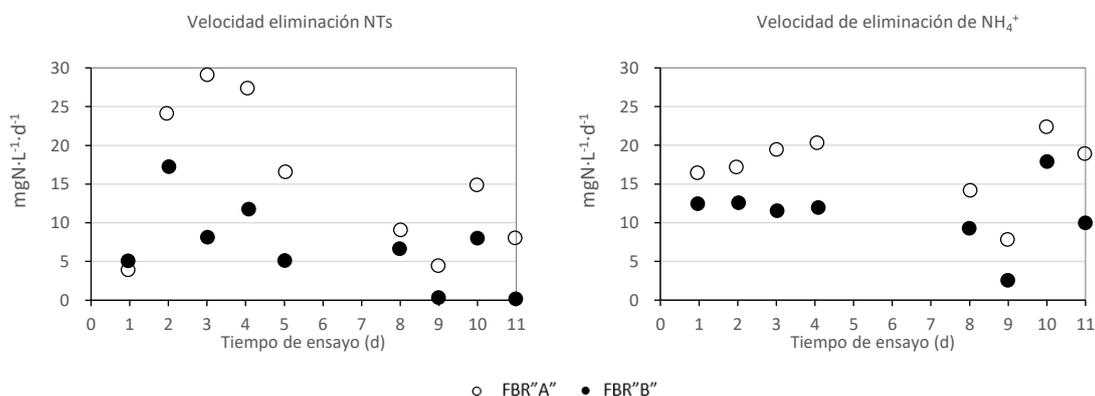


Figura 36: Ensayo 4.1. Evolución de la velocidad de eliminación de NTs (izquierda) y N-NH₄⁺ (derecha) en FBR" A" y FBR" B" (mgN·L⁻¹·d⁻¹)

Al comienzo del experimento, la velocidad de **eliminación de NTs** fue similar en ambos FBR. Sin embargo, a continuación comienzan a observarse diferencias a lo largo del ensayo, coincidiendo siempre que la mayor velocidad se da para el FBR" A". Las velocidades medias de eliminación de NTs asociadas al FBR" A" y FBR" B fueron de $15,3 \pm 9,7$ y $7,0 \pm 5,3 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ respectivamente.

En cuanto a la **eliminación de amonio**, la mayor velocidad se da para FBR" A" en cada uno de los días de ensayo. La velocidad media obtenida para FBR" A" fue de $17,1 \pm 4,2 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, mientras que para FBR" B" fue de $11,0 \pm 4,0 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

De esta forma se tiene que la **velocidad de nitrificación** para FBR" A" y FBR" B" es de 1,8 y 3,9 mgN·L⁻¹·d⁻¹ respectivamente.

Por último, la Figura 37 muestra a velocidad de eliminación de fosfato en ambos FBR.

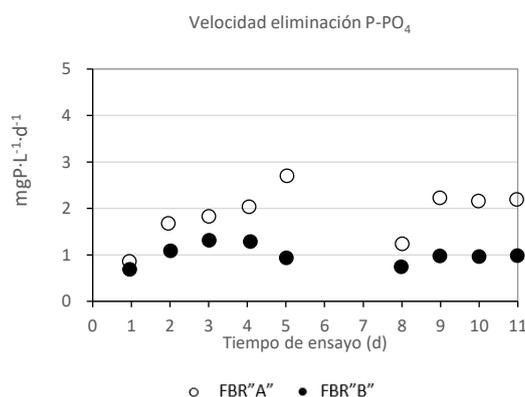


Figura 37: Ensayo 4.1. Evolución de la velocidad de eliminación de P-PO₄³⁻ en FBR"A" y FBR"B" (mgP·L⁻¹·d⁻¹)

En cuanto a la **eliminación de fosfato** se observa que el FBR"A" es capaz de eliminarlo a mayor velocidad que el FBR"B". Así, se ha obtenido una velocidad media de $1,9 \pm 0,6$ mgP·L⁻¹·d⁻¹ y $1,0 \pm 0,2$ mgP·L⁻¹·d⁻¹ para FBR"A" y FBR"B" respectivamente.

Los resultados, obtenido muestran que la productividad de biomasa algal es superior en el FBR con TRC de 2 días, donde además se tienen velocidades de eliminación de nutrientes más elevadas. Por otro lado, del cálculo de la velocidad de nitrificación, se tiene que las AOB se ven favorecidas para el FBR con TRC de 4,5 días, debido probablemente a que en estas condiciones la velocidad de crecimiento de las bacterias se ve favorecida respecto a la de las algas.

- *Ensayo 4.2. A corto plazo*

Se realizaron dos ensayos de velocidad de consumo de nutrientes durante el ensayo a largo plazo: uno a los dos días del comienzo del experimento (*Ensayo 4.2.1*); y otro el último día (*Ensayo 4.2.2*). Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

- *Ensayo 4.2.1.*

Este ensayo tuvo una duración de 1 día. Los resultados obtenidos se analizan a través de la dinámica del crecimiento algal y de la variación de nutrientes en ambos FBR.

Dinámica del crecimiento algal

La Figura 38 se muestra la evolución de la concentración de SSV en el FBR"A" (a) y FBR"B" (b).

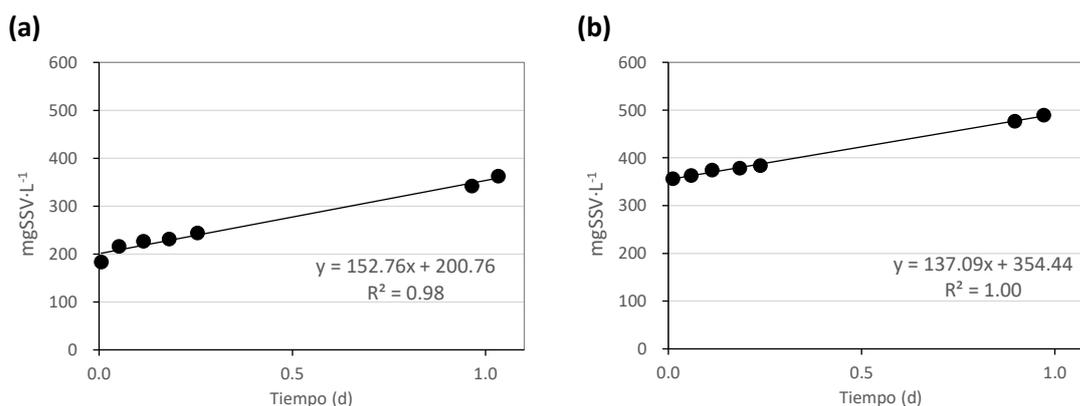


Figura 38: Ensayo 4.2.1. Evolución de la concentración de SSV en FBR "A" (a) y FBR "B" (b).

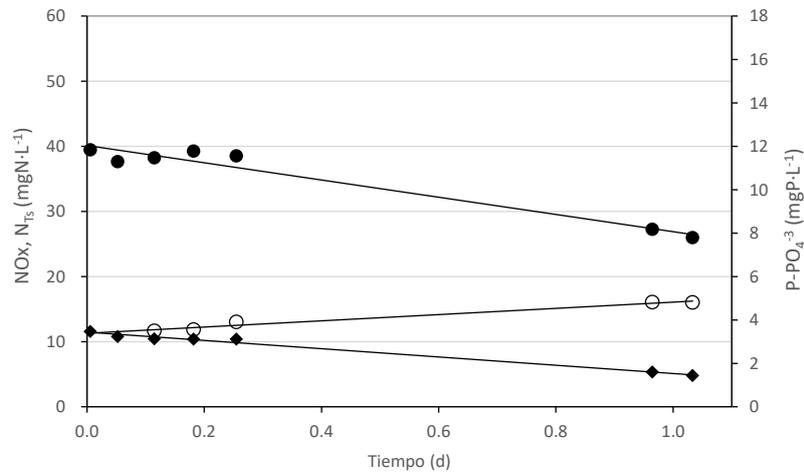
La pendiente de las líneas de tendencia muestra la velocidad de producción de SSV en cada uno de los FBR. En cuanto al FBR "A" se obtuvo una velocidad de $152,8 \text{ mgSSV} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, superior a la obtenida en el FBR "B" de $137,1 \text{ mgSSV} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Además, la concentración de NO_2^- en FBR "A" fue de $2,68 \pm 1,21 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que en FBR "B" se tuvo una concentración superior, de $3,83 \pm 0,66 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$. Estos valores parecen indicar que el aumento de la concentración de nitrito producido por las AOB al oxidar el amonio, inhiba el desarrollo de biomasa algal, de forma que la producción de SSV se ve favorecida en FBR "A" (TRC=2días).

Estos resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos en el ensayo a largo plazo. Además, apoya la hipótesis de que la velocidad de crecimiento algal se vea disminuida a mayor concentración de sólidos.

Cambios en las concentraciones de nutrientes

La Figura 39 muestra la evolución de NTs, $\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$ (nitrificación) y fosfato a lo largo de este ensayo.

(a)



(b)

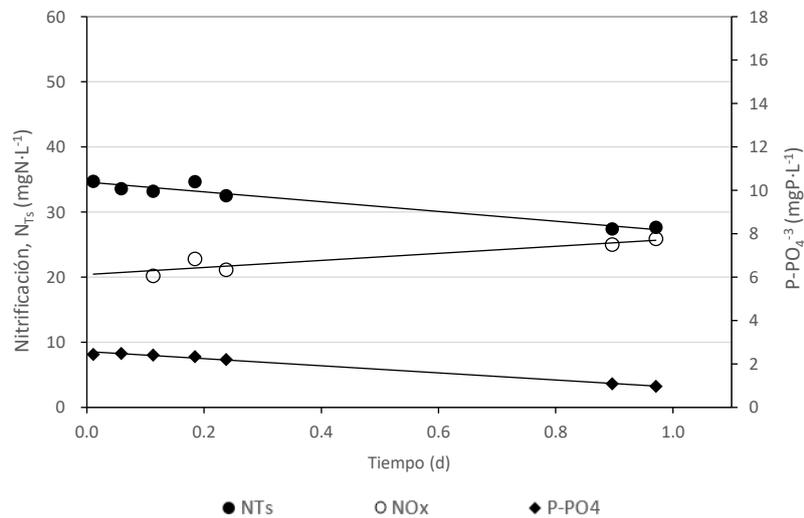


Figura 39: Ensayo 4.2.1. Evolución de la concentración de NTs, NOx y P-PO₄³⁻ en FBR "A" (a) y FBR "B" (b)

En cuanto al **FBR "A"**, la eliminación de NTs se produjo a una velocidad 13,2 mgN·L⁻¹·d⁻¹, reduciéndose desde 39,47 mgN·L⁻¹ al inicio del ensayo hasta 27,27 mgN·L⁻¹ al final.

Por otro lado, en cuanto los NOx (suma de NO₂⁻ y NO₃⁻), asociados al proceso de nitrificación, se descartaron los dos primeros valores ya que se alejaban considerablemente de los obtenidos en el resto de los ensayos, de forma que, a partir de las 2,5 h de comienzo del ensayo aumentó de 11,67 a 16,00 mgN·L⁻¹, a una velocidad de 4,8 mgN·L⁻¹·d⁻¹.

Por último, el fosfato se redujo desde 3,46 hasta 1,60 mgP·L⁻¹, es decir un 54% y lo hizo a una velocidad de 1,9 mgP·L⁻¹·d⁻¹.

Observando la evolución en **FBR "B"**, la concentración inicial de NTs en el FBR fue de 34,70 mgN·L⁻¹, reduciéndose a una velocidad de 7,5 mgN·L⁻¹·d⁻¹ hasta alcanzar un valor de 27,65 mgN·L⁻¹ al final del ensayo, obteniéndose un rendimiento del 20%, inferior al obtenido en FBR "A".

Por último, la concentración de NOx, obtenida a partir de las 2,5h de ensayo aumentó desde 20,73 hasta 25,88mgN·L⁻¹, a una velocidad de 5,4 mgN·L⁻¹·d⁻¹. Estos últimos datos indican que la actividad de las AOB se encuentra favorecida en FBR" B", como se había observado a largo plazo.

Respecto al fosfato, el ensayo empieza con una concentración de 2,45mgP·L⁻¹ reduciéndose hasta 0,98 mgP·L⁻¹ a una velocidad de 1,6 mgP·L⁻¹·d⁻¹, menor a la velocidad obtenida en FBR" A".

En este ensayo se observa que el aumento de la concentración de nitrito en FBR" B", produce un efecto inhibitorio sobre las microalgas, reduciendo la producción de biomasa. Dado que en FBR" A" el TRC es menor, la concentración de nitrito se encuentra más diluida, y por tanto el efecto inhibitorio sobre las microalgas es menor.

○ *Ensayo 4.2.2.*

Este ensayo se realizó de forma análoga al anterior.

Como se ha comentado, este ensayo se realizó al final del ensayo a largo plazo. En este momento se había agotado el fosfato casi por completo en ambos FBR y la concentración de amonio en FBR" B" se encontraba por debajo de 6 mgN·L⁻¹, alcanzando un valor de 0,94 mgN·L⁻¹ al final del ensayo. Por este motivo los resultados podrían verse afectados.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la dinámica del crecimiento algal y los cambios en la concentración de nutrientes.

Dinámica del crecimiento algal

La Figura 40 muestra la evolución de la concentración de SSV en el FBR" A" (a) y FBR" B" (b).

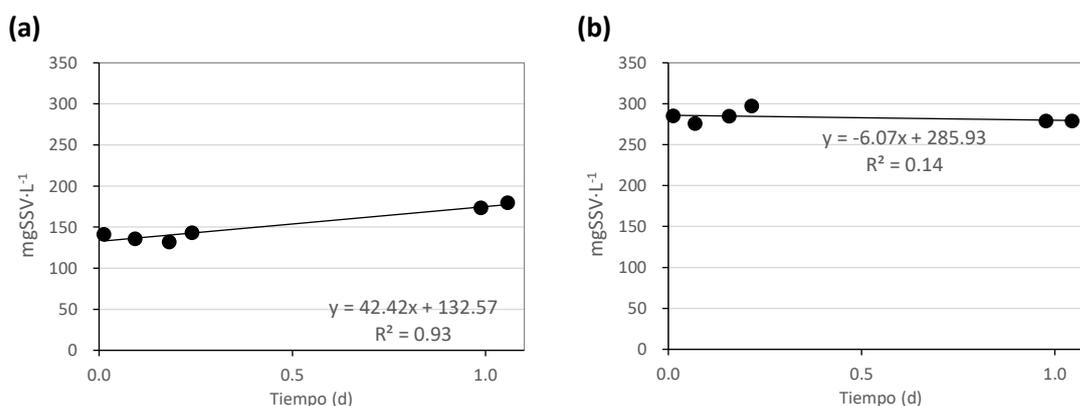


Figura 40: Ensayo 4.2.2. Evolución de la concentración de SSV en FBR" A" (a) y FBR" B" (b).

Como se puede observar, la velocidad de producción de SSV resultó muy baja en ambos FBR, llegando incluso a producirse una disminución en el FBR" B". En FBR" A" aumentó de 182,98 a 362,22 mgSSV·L⁻¹ (un 98%) a una velocidad de 42,4 mgSSV·L⁻¹·d⁻¹. Sin embargo, en FBR" B" la concentración de SSV pasó de 356,07 a 489,13 mgSSV·L⁻¹, es decir, se produjo un aumento del 1,37%. Esta reducción en la producción de biomasa algal se debería a la limitación de nutrientes, sin embargo, las microalgas podrían estar inhibidas en ambos FBR por NO₂⁻, ya que

la concentración en FBR" A" aumento de 2,10 a 7,50 mgN·L⁻¹ mientras que en FBR" B", aumento de 2,57 a 5,28 mgN·L⁻¹

Cambios en las concentraciones de nutrientes

En la Figura 41 se muestra la evolución de NTs, N-NO₂⁻+N-NO₃⁻ (nitrificación) y fosfato a lo largo del ensayo.

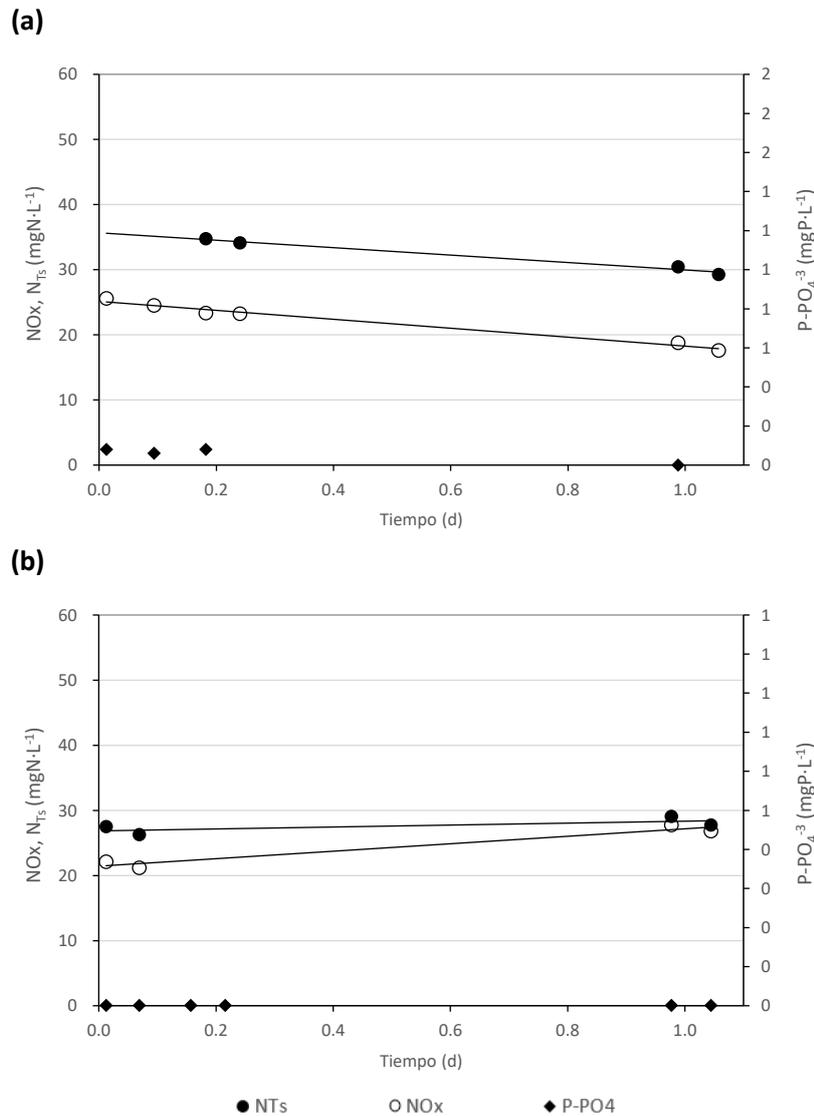


Figura 41: Ensayo 4.2.2. Evolución de la concentración de NTs, NOx y P-PO₄³⁻ en FBR" A" (a) y FBR" B" (b)

En cuanto al **FBR" A"**, la concentración de NTs, se redujo de 35,70 a 29,26mgN·L⁻¹, es decir un 18% a una velocidad de 5,7 mgN·L⁻¹·d⁻¹. Esta baja reducción se debe a que, por un lado, la actividad de las microalgas se vio disminuida por la limitación de nutrientes y por otro, a que las AOB continuaron activas y produciendo NO₂⁻.

Por otro lado, la concentración de NOx disminuyó de 25,62 a 17,62 mgN·L⁻¹, a una velocidad de 6,9 mgN·L⁻¹·d⁻¹ lo que indicaría una disminución de la actividad de las AOB y consumo de NO₃⁻ por parte de las algas.

El fosfato se agotó en los primeros 15 minutos de ensayo.

Respecto a **FBR" B"** la concentración de NTs se mantuvo constante a lo largo del ensayo con un valor de $27,63 \pm 1,14 \text{ mgN}\cdot\text{L}^{-1}$.

En cuanto a la concentración de NOx aumentó de 22,06 a 26,81 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}$ a una velocidad de 5,7 $\text{mgN}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, lo que indicaría que el proceso de nitrificación se continuó llevando a cabo por parte de las AOB.

La concentración de fosfato fue nula durante todo el ensayo.

En resumen, debido a la limitación de nutrientes, la evolución en la concentración de nutrientes es diferente a la obtenida en el ensayo 4.2.1. Sin embargo, se puede observar que, para el FBR con TRC menor, la reducción de NTs y disminución de NOx, indicaría que las microalgas se ven favorecidas frente a las AOB. Por otro lado, el FBR" B" muestra como la concentración de NTs se mantiene constante y aumenta la concentración de NOx, es decir, las AOB se ven favorecidas para TRC elevados, mientras que la producción de biomasa algal es prácticamente nula.

- *Síntesis de resultados*

Este ensayo se realizó con el objetivo de observar la competencia entre las microalgas y las AOB frente a diferentes TRC.

Tanto en el ensayo a largo como a corto plazo se observó que la productividad de biomasa se veía favorecida en el FBR con TRC de 2 días. Este aspecto se debe, por un lado, a que la elevada tasa de crecimiento de las microalgas permite su desarrollo a TRC bajos; y por otro lado, a que el desarrollo de las AOB se ve desfavorecido a TRC bajos, lo que conlleva a una menor producción de nitritos y por tanto, el efecto inhibitorio sobre las algas es menor que para TRC mayores. Además, a TRC mayor existe limitación del crecimiento de las algas por luz (mayor efecto sombra) y escasez de nutrientes (menor carga de nitrógeno y fósforo).

Por otro lado, la evaluación del proceso de nitrificación mostró que las bacterias se vieron favorecidas en el FBR con TRC de 4,5 días.

A continuación, se muestra una tabla resumen de los datos más relevantes obtenidos en este ensayo.

Tabla 8: Ensayo de tiempo de retención hidráulico. Resumen de resultados.

	<i>Ensayo 4.1: A largo plazo</i>		<i>Ensayo 4.2.1: A corto plazo</i>		<i>Ensayo 4.2.1: A corto plazo</i>	
	<i>FBR"A"</i>	<i>FBR"B"</i>	<i>FBR"A"</i>	<i>FBR"B"</i>	<i>FBR"A"</i>	<i>FBR"B"</i>
<i>Duración</i>	11días		1día		1día	
<i>TRC</i>	2	4,5	2	4,5	2	4,5
<i>Productividad media biomasa (mgSSV·L⁻¹·d⁻¹)</i>	82,4±4,8	27,03±15,70	-	-	-	-
<i>Producción de biomasa (mgSSV·L⁻¹·d⁻¹)</i>	-	-	152,8	137,1	42,4	0
<i>Velocidad de eliminación de NTs (mgN·gSSV⁻¹·d⁻¹)</i>	15,3±9,7	7,0±5,3	13,2	7,5	5,7	0
<i>Velocidad de nitrificación(mgN·gSSV⁻¹·d⁻¹)</i>	1,8	3,9	4,8	5,4	-6,9	5,7
<i>Velocidad de eliminación de PO₄³⁻ (mgP·gSSV⁻¹·d⁻¹)</i>	1,9±0,6	1,0±0,2	1,9	1,6	-	-

6 CONCLUSIONES

La realización de diferentes ensayos a escala laboratorio se realizó con el objetivo de estudiar la competencia entre microalgas y AOB para el tratamiento de efluentes procedentes de un AnMBR de forma que este estudio pueda emplearse como base para el sobre-escalado de esta tecnología.

Por un lado, de los 5 ensayos en los que se comparó la producción de biomasa algal y la velocidad de consumo de nutrientes entre FBR en los que se inhibió el proceso de nitrificación mediante la adición de ATU y FBR en los que las AOB se encontraban activas se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- En condiciones de inhibición del proceso de nitrificación, los resultados mostraron un **descenso simultáneo en la concentración de amonio y nitrato**, siendo la velocidad de eliminación de amonio superior. Dado que en ningún momento se dieron condiciones favorables para llevar a cabo el proceso de desnitrificación, la reducción de nitrato se asociaría a su consumo como nutriente por parte de las microalgas. Este aspecto contradiría los resultados obtenidos en diferentes estudios que indican que el consumo de nitrato, como fuente de nitrógeno por parte de las microalgas, se produce en ausencia de amonio (*Hii et al. 2011; Ruiz-Marin et al. 2010*).
- En cuanto al rendimiento de producción de biomasa, no se obtuvieron diferencias significativas. Sin embargo, se observó mayor eliminación de nitrógeno y fosfato cuando el proceso de nitrificación se encontraba inhibido.

Por otro lado, de los ensayos orientados a evaluar la inhibición de nitrito a corto y a largo plazo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Los ensayos a corto plazo (respirometrías) no mostraron diferencias significativas frente a diferentes concentraciones de nitrito.
- En cuanto a los ensayos a largo plazo, se observó que **la presencia de nitrito producía un efecto inhibitorio** en el desarrollo de *Chlorella* para las diferentes concentraciones ensayadas (5, 10 y 20 mgN·L⁻¹).
- Debido a la limitación de nutrientes producida en los ensayos con 10 y 20 mgN·L⁻¹ de NO₂⁻ no se pudo establecer una relación directa entre la concentración de nitrito y el grado de inhibición. Aun así, se observó que la disminución del rendimiento de eliminación de NTs aumentaba al aumentar la concentración de NO₂⁻. Además, Dado que las características del medio al comienzo de cada uno de los ensayos fueron distintas, resulta complicado realizar comparaciones entre los distintos ensayos ya que a mayor concentración de SSV en el FBR, el efecto de sombreado podría distorsionar los resultados
- Estos resultados sugieren que la competencia entre AOB y microalgas no se debe solamente a la toma de nutrientes, si no al efecto inhibitorio que produce el incremento de la concentración de eNO₂⁻ en el medio, producto de la actividad de las AOB.

- Se deberían realizar ensayos posteriores orientados a investigar el umbral a partir del cual la presencia de nitrito produce un efecto inhibitorio sobre *Chlorella* así como el grado de inhibición frente a diferentes concentraciones de nitrito.

Por último, de los ensayos orientados a evaluar el efecto del TRC sobre el rendimiento de las microalgas se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- La proliferación de AOB a TRC altos produce un aumento de la concentración de nitrito que inhibe el desarrollo algal. De esta forma, los TRC bajos favorecen el desarrollo de las microalgas debido al mayor grado de dilución del nitrito.
- Se observó que, bajo concentraciones reducidas de amonio, las AOB se ven favorecidas ya que la producción de nitrito debido a su actividad, la limitación de nutrientes y el efecto sombra reducen significativamente el desarrollo de biomasa algal.

7 REFERENCIAS

- Abe, K., Imamaki, A., & Hirano, M. (2002). Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. *Journal of Applied phycology*, *14*(2), 129-134.
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, *19*(3), 257-275.
- Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., & Iluz, D. (2016). Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource technology*, *203*, 357-363.
- Ación, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. D. M., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment?. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(21), 9013-9022.
- Aiba, S. (1982). Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. In *Microbial reactions* (pp. 85-156). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Aiyuk, S., Amoako, J., Raskin, L., Van Haandel, A., & Verstraete, W. (2004). Removal of carbon and nutrients from domestic wastewater using a low investment, integrated treatment concept. *Water Research*, *38*(13), 3031-3042.
- F. Almomani, A.M.D. Al Ketife, S. Judd, M. Shurair, R. Bhosale, H. Znad, M. Tawalbeh (2019) Impact of CO₂ concentration and ambient conditions on microalgal growth and nutrient removal from wastewater by a photobioreactor. *Science of Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.144>
- APHA-AWWA-WPCF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st edition. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF).
- 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 high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecological engineering*, *52*, 143-153.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Perez, C., & Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water research*, *49*, 465-474.
- Azov, Y., & Goldman, J. C. (1982). Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Applied and environmental microbiology*, *43*(4), 735-739.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Vol. 10. Cambridge University Press.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, *25*(2), 207-210.

- Bilad, M. R., Discart, V., Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., & Vankelecom, I. F. (2014). Coupled cultivation and pre-harvesting of microalgae in a membrane photobioreactor (MPBR). *Bioresource technology*, *155*, 410-417.
- Blier, R., Laliberte, G., & De la Noüe, J. (1995). Tertiary treatment of cheese factory anaerobic effluent with *Phormidium bohneri* and *Micractinium pusillum*. *Bioresource Technology*, *52*(2), 151-155.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 557-577.
- Camacho, F. G., Gomez, A. C., Sobczuk, T. M., & Grima, E. M. (2000). Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process Biochemistry*, *35*(9), 1045-1050.
- Carpenter, E. J., & Guillard, R. R. (1971). Intraspecific differences in nitrate half-saturation constants for three species of marine phytoplankton. *Ecology*, *52*(1), 183-185.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, *22*(6), 1490-1506.
- Chen, W. M., Zhang, Q. M., & Dai, S. G. (2009). Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Agro-Environment Science*, *28*(5), 989-993.
- Chen, W., Liu, H., Zhang, Q., & Dai, S. (2011). Effect of nitrite on growth and microcystins production of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Journal of applied phycology*, *23*(4), 665-671.
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Casini, D., Tredici, M. R., Rodolfi, L., Bassi, N., ... & Bondioli, P. (2013). Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: re-thinking a traditional system is possible. *Applied Energy*, *102*, 101-111.
- 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. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology*, *26*(3), 126-131.
- Choi, O., Das, A., Yu, C. P., & Hu, Z. (2010). Nitrifying bacterial growth inhibition in the presence of algae and cyanobacteria. *Biotechnology and bioengineering*, *107*(6), 1004-1011.
- 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.
- Chu, L. B., Yang, F. L., & Zhang, X. W. (2005). Anaerobic treatment of domestic wastewater in a membrane-coupled expanded granular sludge bed (EGSB) reactor under moderate to low temperature. *Process Biochemistry*, *40*(3-4), 1063-1070.

- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: a review. *Journal of environmental quality*, 27(2), 261-266.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., ... & Kirkegaard, R. H. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 504.
- Darley, M. W. (1982). Algal Biology: A physiological Approach. En J. F. Wilkinson, *Basic microbiology* (Vol. 9). Oxford, UK: Black well Scientific Publications.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11, 18-26.
- Delgado Vela, J., Stadler, L. B., Martin, K. J., Raskin, L., Bott, C. B., & Love, N. G. (2015). Prospects for biological nitrogen removal from anaerobic effluents during mainstream wastewater treatment. *Environmental Science & Technology Letters*, 2(9), 234-244.
- FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura). (2013). *Afrontar la escasez de agua. Un marco de acción para la agricultura y la seguridad alimentaria*. Roma, FAO
- Fazal, T., Mushtaq, A., Rehman, F., Khan, A. U., Rashid, N., Farooq, W., ... & Xu, J. (2018). Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3107-3126.
- Garcia, J., Mujeriego, R., & Hernandez-Marine, M. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 331-339.
- Gao, F., Li, C., Yang, Z. H., Zeng, G. M., Feng, L. J., Liu, J. Z., ... & Cai, H. W. (2016). Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecological engineering*, 92, 55-61.
- Gao, F., Yang, Z. H., Li, C., Wang, Y. J., Jin, W. H., & Deng, Y. B. (2014). Concentrated microalgae cultivation in treated sewage by membrane photobioreactor operated in batch flow mode. *Bioresource technology*, 167, 441-446.
- Giménez, J. B., Robles, A., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M. V., Gatti, M. N., ... & Seco, A. (2011). Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology*, 102(19), 8799-8806.
- 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.
- González-Camejo, J., Barat, R., Pachés, M., Murgui, M., Seco, A., & Ferrer, J. (2018). Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae–bacteria culture: effect of light and temperature on the microalgae–bacteria competition. *Environmental technology*, 39(4), 503-515.

- González-Sánchez, A., & Posten, C. (2017). Fate of H₂S during the cultivation of *Chlorella* sp. deployed for biogas upgrading. *Journal of environmental management*, 191, 252-257.
- Gouveia, J., Plaza, F., Garralon, G., Fdz-Polanco, F., & Peña, M. (2015). Long-term operation of a pilot scale anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for the treatment of municipal wastewater under psychrophilic conditions. *Bioresource technology*, 185, 225-233.
- Guest, J. S., Skerlos, S. J., Barnard, J. L., Beck, M. B., Daigger, G. T., Hilger, H., ... & Mihelcic, J. R. (2009). A new planning and design paradigm to achieve sustainable resource recovery from wastewater.
- Guldhe, A., Kumari, S., Ramanna, L., Ramsundar, P., Singh, P., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. *Journal of environmental management*, 203, 299-315.
- Hii, Y. S., SOO^o, C. L., Chuah, T. S., Mohd-Azmi, A., & Abol-Munafi, A. B. (2011). UPTAKE BY *Nannochloropsis* sp. *Journal of Sustainability Science and Management*, 6(1), 60-68.
- Hindersin, S. (2013). Photosynthetic efficiency of microalgae and optimization of biomass production in photobioreactors. Tesis doctoral. Universität Hamburg, Alemania.
- HLPE (High-Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition Committee on World Food Security). 2015. Water for Food Security and Nutrition: A Report by the High-Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition. Rome, HLPE.www.fao.org/3/a-av045e.pdf
- Horan, N. J. (1990). Biological Wastewater Treatment Systems: Theory and Operation John Wiley & Sons. New York. 310p.
- Ho, J., & Sung, S. (2010). Methanogenic activities in anaerobic membrane bioreactors (AnMBR) treating synthetic municipal wastewater. *Bioresource technology*, 101(7), 2191-2196.
- Huang, Z., Ong, S. L., & Ng, H. Y. (2011). Submerged anaerobic membrane bioreactor for low-strength wastewater treatment: effect of HRT and SRT on treatment performance and membrane fouling. *Water research*, 45(2), 705-713.
- Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., & Zhou, B. (2015). Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource technology*, 179, 187-192.
- 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.
- IPCC, 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 [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 p
- Iverson, T. M. (2006). Evolution and unique bioenergetic mechanisms in oxygenic photosynthesis. *Current opinion in chemical biology*, 10(2), 91-100.

- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., & Franco, T. T. (2009). Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 306-310.
- Jebali, A., Ación, F. G., Barradas, E. R., Olgúin, E. J., Sayadi, S., & Grima, E. M. (2018). Pilot-scale outdoor production of *Scenedesmus* sp. in raceways using flue gases and centrate from anaerobic digestion as the sole culture medium. *Bioresource technology*, 262, 1-8.
- EMÉRITA JIMÉNEZ DOUGLAS (2010). Modelación matemática del proceso nitrificación en dos etapas. Desarrollo de metodologías de calibración del modelo para un reactor SHARON y un proceso de fangos activados. Memoria de Tesis Doctoral UPV
- Kadir, W. N. A., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., & Lee, K. T. (2018). Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. *Energy conversion and management*, 171, 1416-1429.
- Kiepper Brian H. "Microalgae Utilization in Wastewater" (B1419). (2013). Department of Poultry Science. College of Agricultural & Environmental Sciences. University of Georgia, USA. Disponible en: <<http://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=B1419>>
- Koç, C., Anderson, G. A. (2010). *Use of RGB LEDs and fluorescents lamps as light sources to grow microalgae in a photo-bioreactor (PBR)*. Presentation at the 2010 ASABE/CSBE North-Central Intersectional Meeting. Saskatoon, Saskatchewan, Canada. Paper number: MBSK 10-105.
- Lee, C. S., Lee, S. A., Ko, S. R., Oh, H. M., & Ahn, C. Y. (2015). Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. *Water research*, 68, 680-691.
- Lew, B., Tarre, S., Beliaevski, M., Dosoretz, C., & Green, M. (2009). Anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for domestic wastewater treatment. *Desalination*, 243(1-3), 251-257.
- Li, W. K. (1980). Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics. In *Primary productivity in the sea* (pp. 259-279). Springer, Boston, MA.
- Marbelia, L., Bilad, M. R., Passaris, I., Discart, V., Vandamme, D., Beuckels, A., ... & Vankelecom, I. F. (2014). Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresource technology*, 163, 228-235.
- Marcilhac, C., Sialve, B., Pourcher, A. M., Ziebal, C., Bernet, N., & Béline, F. (2014). Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. *Water research*, 64, 278-287.
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water research*, 65, 186-202.

- McCarty, P. L., Bae, J., & Kim, J. (2011). Domestic wastewater treatment as a net energy producer—can this be achieved?.
- Mendoza, J. L., Granados, M. R., De Godos, I., Ación, F. G., Molina, E., Heaven, S., & Banks, C. J. (2013). Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways. *Bioresource technology*, *137*, 188-195.
- Miller, S. R., & Bebout, B. M. (2004). Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats. *Applied and environmental microbiology*, *70*(2), 736-744.
- Miron, A. S., Gomez, A. C., Camacho, F. G., Grima, E. M., & Chisti, Y. (1999). Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, *70*(1-3), 249-270.
- Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of biotechnology*, *92*(2), 113-131.
- Molinuevo-Salces, B., García-González, M. C., & González-Fernández, C. (2010). Performance comparison of two photobioreactors configurations (open and closed to the atmosphere) treating anaerobically degraded swine slurry. *Bioresource technology*, *101*(14), 5144-5149.
- Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Advanced treatment of wastewater using symbiotic co-culture of microalgae and bacteria. *Applied Chemistry for Engineering*, *27*(1), 1-9.
- Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC biophysics*, *6*(1), 4.
- Oren, A., Padan, E., & Malkin, S. (1979). Sulfide inhibition of photosystem II in cyanobacteria (blue-green algae) and tobacco chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *546*(2), 270-279.
- Oswald, W. J., & Golueke, C. G. (1960). Biological transformation of solar energy. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 2, pp. 223-262). Academic Press.
- 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*.
- Passarge, J., Hol, S., Escher, M., Huisman, J. (2006). Competition for nutrients and light: stable coexistence, alternative stable states or competitive exclusion? *Ecological Monographs* *76*, 57-72.
- Pastor, L., Mangin, D., Ferrer, J., y Seco, A. (2010). Formación de estruvita a partir de los sobrenadantes de una planta piloto de digestión anaeróbica. *Tecnología Bioresource*, *101* (1), 118-125.
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*, *102*(1), 17-25.

- Pretel, R., Robles, A., Ruano, M. V., 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-loaded urban wastewater treatment. *Journal of environmental management*, 166, 45-54.
- Prosser, J. I. (1990). Autotrophic nitrification in bacteria. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 30, pp. 125-181). Academic Press.
- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., & Pratt, S. (2009). Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics. *Water research*, 43(17), 4207-4213.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 287-293.
- Rai, L. C., Gaur, J. P., & Kumar, H. D. (1981). Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Reviews*, 56(2), 99-151.
- Ras, M., Steyer, J. P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 153-164.
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10), 3411-3424.
- Richmond, A., Boussiba, S., Vonshak, A., & Kopel, R. (1993). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *Journal of Applied Phycology*, 5(3), 327-332.
- Richmond, A. (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Vol. 577). Oxford: Blackwell Science.
- Risgaard-Petersen, N., Nicolaisen, M. H., Revsbech, N. P., & Lomstein, B. A. (2004). Competition between ammonia-oxidizing bacteria and benthic microalgae. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5528-5537.
- Rossi, S., Bellucci, M., Marazzi, F., Mezzanotte, V., & Ficara, E. (2018). Activity assessment of microalgal-bacterial consortia based on respirometric tests. *Water Science and Technology*, wst2018078.
- Rubio, F. C., Fernández, F. A., Pérez, J. S., Camacho, F. G., & Grima, E. M. (1999). Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(1), 71-86.
- Ruiz-Martinez, 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(12), 2249-2257.
- Ruiz-Martinez, A., Garcia, N. M., Romero, I., Seco, A., & Ferrer, J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource Technology*, 126, 247-253.

- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, *101*(1), 58-64.
- Ruiz, P (2018). *Trabajo Final de Master: "Estudio del compostaje del fango producido en una planta de codigestión de fango primario y microalgas"*. Valencia, España.
- Sato, T., Qadir, M., Yamamoto, S., Endo, T., & Zahoor, A. (2013). Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agricultural Water Management*, *130*, 1-13.
- Singh, L., Pavankumar, A. R., Lakshmanan, R., & Rajarao, G. K. (2012). Effective removal of Cu²⁺ ions from aqueous medium using alginate as biosorbent. *Ecological engineering*, *38*(1), 119-124
- Smith, A. L., Stadler, L. B., Love, N. G., Skerlos, S. J., & Raskin, L. (2012). Perspectives on anaerobic membrane bioreactor treatment of domestic wastewater: a critical review. *Bioresource technology*, *122*, 149-159.
- Tang, H., Chen, M., Ng, K. S., & Salley, S. O. (2012). Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, *109*(10), 2468-2474.
- Ugwu, C., Ogbonna, J., & Tanaka, H. (2002). Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Applied microbiology and biotechnology*, *58*(5), 600-607.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology*, *99*(10), 4021-4028.
- Unnithan, V. V., Unc, A., & Smith, G. B. (2014). Mini-review: a priori considerations for bacteria–algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters. *Algal Research*, *4*, 35-40.
- Van Haandel, A. C., & Lettinga, G. (1994). *Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate*. John Wiley & Sons.
- Vergara, C., Muñoz, R., Campos, J. L., Seeger, M., & Jeison, D. (2016). Influence of light intensity on bacterial nitrifying activity in algal-bacterial photobioreactors and its implications for microalgae-based wastewater treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *114*, 116-121.
- Viruela, A., Murgui, M., Gómez-Gil, T., Durán, F., Robles, Á., Ruano, M. V., ... & Seco, A. (2016). Water resource recovery by means of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors using the effluent from an anaerobic membrane bioreactor fed with pre-treated sewage. *Bioresource technology*, *218*, 447-454.
- Vo, P. T., Ngo, H. H., Guo, W., Zhou, J. L., Nguyen, P. D., Listowski, A., & Wang, X. C. (2014). A mini-review on the impacts of climate change on wastewater reclamation and reuse. *Science of the Total Environment*, *494*, 9-17.

- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., ... & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1174-1186.
- Ward A.J., Lewis D.M., Green F.B. (2014). "Anaerobic digestion of algae biomass: A review". *Algal Research*, Volume 5, Pages 204–214.
- Winkler, M. K., Boets, P., Hahne, B., Goethals, P., & Volcke, E. I. (2017). Effect of the dilution rate on microbial competition: r-strategist can win over k-strategist at low substrate concentration. *PloS one*, 12(3), e0172785.
- WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). (2017). *The United Nations World Water Development Report 2017: Wastewater, The Untapped Resource*. Paris, UNESCO.
- WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). (2018). *The United Nations World Water Development Report 2018: Nature-based Solutions*. Paris, UNESCO.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14), 5494-5500.
- Yang, S., Wang, J., Cong, W., Cai, Z., & Ouyang, F. (2004). Utilization of nitrite as a nitrogen source by *Botryococcus braunii*. *Biotechnology letters*, 26(3), 239-243.
- Znad, H., Naderi, G., Ang, HM y Tade, MO (2012). La biomigación del CO₂ y la producción de biocombustibles utilizando microalgas: desarrollos de fotobiorreactores y direcciones futuras. En *avances en Ingeniería Química* . InTech.
- Ginestet, P., Audic, J. M., Urbain, V., & Block, J. C. (1998). Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2266-2268.