



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente

Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente

TESIS DOCTORAL

**MODELACIÓN MATEMÁTICA DEL PROCESO DE
CRECIMIENTO DE MICROALGAS EN EL
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. APLICACIÓN
A UN FOTOBIORREACTOR DE MEMBRANAS (MPBR)**

ALEXANDRE VIRUELA NAVARRO

Mayo 2023

Directores:

Dr. Joaquín Serralta Sevilla

Dr. José Ferrer Polo

RESUMEN:

El crecimiento actual de la población provoca que el consumo de recursos naturales a nivel mundial se esté llevando a cabo a una velocidad mayor que su capacidad de renovación, lo cual supone un gran impacto medioambiental. Para hacer frente a esta problemática es necesario un cambio de paradigma en la sociedad que fomente la búsqueda de nuevas fuentes de recursos renovables y tecnologías que permitan optimizar y reaprovechar los recursos existentes aplicando el concepto de Economía Circular.

En este contexto de escasez de recursos, la tecnología basada en los cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales aparece como una tecnología muy interesante que permite no sólo la eliminación de los nutrientes (N y P) presentes en el agua, sino también la recuperación de estos nutrientes en forma de biomasa algal que posee un alto valor y permite diversas aplicaciones: generación de biogás, producción de biocombustibles y biofertilizantes, elaboración de fármacos y cosméticos, etc.

Estudios previos han demostrado que el efluente de un reactor anaerobio de membranas (AnMBR) resulta ser un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de las microalgas y para la recuperación de los nutrientes disueltos en el agua. No obstante, la mayoría de estos estudios han sido desarrollados a escala laboratorio en condiciones controladas de luz, temperatura, pH, carga de nutrientes, etc., y normalmente siempre en experimentos *batch*. Es necesario el desarrollo de experimentos a mayor escala con cultivos de microalgas en condiciones *outdoor* para poder evaluar la eficiencia de esta tecnología y su aplicabilidad a escala industrial.

Este trabajo consiste en el estudio y modelación matemática del proceso de cultivo de microalgas en una planta piloto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) operando en continuo y en condiciones *outdoor* para el tratamiento del efluente de un sistema AnMBR que trata agua residual urbana real.

Durante la fase de experimentación con cultivos de microalgas se han llevado a cabo diversos experimentos en una planta MPBR donde se han evaluado diversos factores que afectan al crecimiento de las microalgas: temperatura, luz solar, tiempo de retención celular (TRC), carga de nutrientes o tiempo de retención hidráulico (TRH), el sistema de

recirculación del cultivo y el volumen en zona oscura. Los resultados obtenidos muestran la enorme importancia de las condiciones ambientales (luz solar y temperatura) en el rendimiento de los cultivos de microalgas. La temperatura óptima del cultivo de microalgas con predominancia del género *Scenedesmus* sp. resultó estar en torno a los 25°C, mientras que temperaturas medias por debajo de 20°C y por encima de 25°C afectaron negativamente a la productividad de biomasa. Los resultados muestran también que la luz solar tiene un efecto importante a corto plazo en la eliminación de nutrientes. Por otro lado, la operación del sistema de fotobiorreactores (FBR) de placa plana sin membranas para TRH 8 días y en condiciones ambientales favorables consiguió reducir la concentración de nutrientes por debajo de los límites de vertido que marca la Directiva 98/15/CE (10 mg N·L⁻¹ y 1 mg P·L⁻¹), alcanzando valores de eliminación de 75,2% de N y 77,9% de P. La operación del sistema MPBR permitió desacoplar el TRC del TRH en la operación de los FBR, lo que resultó en una mejora general del rendimiento de los cultivos de microalgas y permitió obtener un efluente libre de sólidos con alto potencial de reutilización. Los sistemas de recirculación del cultivo de microalgas comparados en el estudio (bombeo mecánico vs sistema *airlift*) no afectaron significativamente al rendimiento del cultivo. Por otro lado, reduciendo el volumen en zona oscura de un 27,2% al 13,6% en el sistema MPBR se consiguió un incremento del 40% en la productividad de biomasa.

A continuación, haciendo uso de los datos obtenidos en planta piloto, se ha desarrollado un modelo matemático de crecimiento de microalgas que permite simular de manera muy precisa ($R^2 = 0,9954$) el comportamiento de los cultivos de microalgas en un sistema MPBR. Este modelo utiliza la notación y terminología de los modelos ASM, y consta de un total de 14 componentes (10 solubles y 4 suspendidos) y 11 procesos gobernados por la cinética y los equilibrios ácido-base que permiten determinar el pH del medio. Además, el modelo considera los efectos la luz y la temperatura en el crecimiento. Como novedad interesante respecto a otros modelos matemáticos de crecimiento de microalgas ya publicados, este modelo contempla el crecimiento de las microalgas a partir del polifosfato almacenado intracelularmente en condiciones de ausencia de P en el medio de cultivo. El modelo desarrollado en esta tesis doctoral pretende ser una herramienta para facilitar la implementación futura de la tecnología de cultivos de microalgas en una EDAR a escala industrial para la recuperación de nutrientes de las aguas residuales.

RESUM:

El creixement actual de la població provoca que el consum de recursos naturals a nivell mundial s'estigui portant a terme a una velocitat major que la seva capacitat de renovació, fet que suposa un gran impacte mediambiental. Per fer front a aquesta problemàtica cal un canvi de paradigma a la societat que fomenti la recerca de noves fonts de recursos renovables i tecnologies que permetin optimitzar i reaprofitar els recursos existents aplicant el concepte d'Economia Circular.

En aquest context d'escassetat de recursos, la tecnologia basada en els cultius de microalgues per al tractament d'aigües residuals apareix com una tecnologia molt interessant que permet no solament l'eliminació dels nutrients (N i P) presents a l'aigua, sinó també la recuperació d'aquests nutrients en forma d'una biomassa algal que posseix un alt valor i que permet diverses aplicacions: generació de biogàs, producció de biocombustibles i biofertilitzants, elaboració de fàrmacs i cosmètics, etc.

Estudis previs han demostrat que l'efluent d'un reactor anaerobi de membranes (AnMBR) resulta ser un mitjà de cultiu òptim per al creixement de les microalgues i per la recuperació dels nutrients dissolts a l'aigua. No obstant, la majoria d'aquests estudis s'han dut a terme a escala laboratori en condicions controlades de llum, temperatura, pH, càrrega de nutrients, etc., i normalment sempre en experiments *batch*. És necessari el desenvolupament d'experiments a major escala amb cultius de microalgues en condicions *outdoor* per poder avaluar l'eficiència d'aquesta tecnologia i la seva aplicabilitat a escala industrial.

Aquest treball consisteix en l'estudi i la modelació matemàtica del procés de cultiu de microalgues en una planta pilot de fotobioreactors de membrana (MPBR) operant en continu i en condicions *outdoor* per al tractament de l'efluent d'un sistema AnMBR que tracta aigua residual urbana real.

Durant la fase d'experimentació amb cultius de microalgues s'han dut a terme diversos experiments amb una planta MPBR on s'han avaluat diversos factors que afecten al creixement de les microalgues: temperatura, llum solar, temps de retenció cel·lular (TRC), càrrega de nutrients o temps de retenció hidràulic (TRH), el sistema de

recirculació del cultiu i el volum en zona obscura. Els resultats obtinguts mostren l'enorme importància de les condicions ambientals (llum solar i temperatura) en el rendiment dels cultius de microalgues. La temperatura òptima del cultiu de microalgues amb predominança del gènere *Scenedesmus* sp. va resultar estar entorn als 25°C, mentre que temperatures mitjanes per sota de 20°C i per sobre de 25°C van afectar negativament a la productivitat de biomassa. Els resultats també mostren que la llum solar té un efecte important a curt termini en l'eliminació de nutrients. D'altra banda, l'operació del sistema de fotobioreactors (FBR) de placa plana sense membranes per a TRH 8 dies i en condicions ambientals favorables va aconseguir reduir la concentració de nutrients per sota dels límits d'abocament que marca la Directiva 98/15/CE (10 mg N·L⁻¹ i 1 mg P·L⁻¹), assolint valors d'eliminació de 75,2% de N i 77,9% de P. L'operació del sistema MPBR va permetre desacoblar el TRC del TRH en l'operació dels FBR, la qual cosa va resultar en una millora general del rendiment dels cultius de microalgues i va permetre obtenir un efluent lliure de sòlids amb un alt potencial de reutilització. Els sistemes de recirculació del cultiu de microalgues comparats en aquest estudi (bombeig mecànic vs sistema *airlift*) no van afectar significativament al rendiment del cultiu. D'altra banda, reduint el volum en zona obscura del 27,2% al 13,6% al sistema MPBR es va aconseguir un increment del 40% en la productivitat de biomassa.

A continuació, fent ús de les dades obtingudes a la planta pilot s'ha desenvolupat un model matemàtic de creixement de microalgues que permet simular de manera molt precisa ($R^2 = 0,9954$) el comportament dels cultius de microalgues en un sistema MPBR. Aquest model utilitza la notació i la terminologia dels models ASM, i consta d'un total de 14 components (10 solubles i 4 suspesos) i 11 processos governats per la cinètica i els equilibris àcid-base que permeten determinar el pH del medi. A més, el model considera els efectes de la llum i la temperatura en el creixement. Com a novetat interessant respecte d'altres models matemàtics de creixement de microalgues ja publicats, aquest model contempla el creixement de les microalgues a partir del polifosfat emmagatzemat internament en condicions d'absència de P en el medi de cultiu,. El model desenvolupat en aquesta tesi doctoral pretén ser una eina per facilitar la implementació futura de la tecnologia de cultius de microalgues a una EDAR a escala industrial per la recuperació de nutrients de les aigües residuals.

ABSTRACT:

The current growth rate of the population causes that the consumption of natural resources worldwide is greater than their capacity for renovation, which supposes a high environmental impact. In order to deal with this problem, it is necessary a paradigm shift in society that encourages the research of new sources of renewable resources and technologies that allow optimizing and reusing the existing resources by applying the concept of Circular Economy

In this context of resource scarcity, microalgae-based technology for wastewater treatment appears as a promising technology that allows not only nutrient removal (N and P) from wastewater, but also the recovery of these nutrients for the production of high-value algal biomass which has different applications: biogas generation, biofuel and biofertilizer production, pharmaceuticals and cosmetics manufacturing, etc.

Previous studies have proved that the effluent from an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) could be a suitable growth medium for microalgae cultivation and for nutrient recovery from water. However, most of these studies have been carried out at bench scale under controlled conditions of light, temperature, pH, nutrient load, etc., when working in batch mode. It is necessary the development of larger scale experiments of microalgae cultivation under outdoor conditions to evaluate the efficiency of this technology to assess its applicability on industrial scale.

The present work consists of the study and mathematical modelling of an outdoor pilot-scale membrane photobioreactor (MPBR) for microalgae cultivation under continuous operation for treating the effluent of an AnMBR system fed with real municipal wastewater.

During the experimental phase of microalgae cultivation, different experiments were carried out in a MPBR plant to evaluate the main factors that affect microalgae growth: temperature, solar light irradiance, biomass retention time (BRT), nutrient load or hydraulic retention time (HRT), the algae culture recirculation system and the non-photoc volume. The results obtained show the significant effect of the environmental conditions (solar light and temperature) on the microalgae cultivation performance. Optimum

temperature for the microalgae cultures with a predominance of the genus *Scenedesmus* sp. resulted to be around 25°C, while average temperatures below 20°C and above 25°C negatively affected biomass productivity. The results obtained also show that solar light has an important short-term effect on nutrient removal. On the other hand, during the operation of the flat-panel photobioreactors (PBRs) system without membranes at HRT of 8 days and under favourable environmental conditions, it was possible to comply with effluent nutrient discharge limits established by Directive 98/15/CE (10 mg N·L⁻¹ and 1 mg P·L⁻¹) and to achieve nutrient removal efficiencies of 75.2% of N and 77.9% of P. The MPBR plant allowed decoupling BRT and HRT in the PBRs operation, which resulted in a general improvement of the microalgae cultivation performance and allowed to obtain a solid-free effluent with high potential for reuse applications. The microalgae culture recirculation systems compared in the study (mechanical pumping vs airlift system) did not significantly affect the culture performance. Moreover, reducing the non-photoc volume fraction in the MPBR system from 27.2% to 13.6% resulted in an increase of 40% in biomass productivity.

Then, a mathematical model of microalgal growth was developed by making use of the data obtained in the pilot plant. This model was able to reproduce accurately ($R^2 = 0.9954$) the overall microalgae cultivation performance in an MPBR system. This model uses the notation and terminology of the ASM models, and it considers a total of 14 components (10 soluble and 4 suspended) and 11 processes governed by kinetics and acid-base equilibria which allows to calculate the pH of the medium. In addition, the model considers the effects of solar light and temperature on microalgae growth. As an interesting novelty with respect to other published mathematical models of microalgae growth, this model contemplates the possibility of using the stored polyphosphate for growing in the absence of P in the culture medium. The model developed in this PhD Thesis is intended to be a tool to promote the future implementation of microalgae cultivation technology on full-scale WWTP for nutrient recovery from wastewater.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, gracias a José y Aurora por darme la oportunidad de unirme al grupo CALAGUA y haber podido aprender tanto de vosotros y de un equipo tan potente que me ha permitido formarme en un campo muy interesante como son las microalgas.

También muchas gracias a Joaquín, quien me insistió en que continuara y acabara la publicación de esta tesis aun cuando el mundo de la empresa privada (y sobre todo los niños) contribuyen a frenar este objetivo. También gracias por tus múltiples consejos y guiado a lo largo del camino.

A mis excompañeros y amigos Tao, Mónica y Josué: lo que la planta de algas unió, nada lo podrá separar. Siempre me acuerdo de vosotros y me viene una sonrisa. Gracias también a dos personas importantísimas como Dani y Ruth en este paso por el mundo de la investigación. Con vosotros me llevo dos amigos de los buenos.

Al resto de doctorandos (creo que ya todos doctores o cuasi-doctores: Patri, Silvia, Núria, Ana, Maria, Antonio, Juan, Rebecca, Stéphanie, Óscar, Berta) con los que coincidí en el despacho, planta y/o laboratorio, daros las gracias por los buenos momentos vividos en esta etapa. Si me dejo a alguien, no era mi intención (mi memoria se va reduciendo con los años).

Agradecer a Freddy, Ángel y Vicky toda su inestimable ayuda y formación desde mis inicios en CALAGUA. Gracias también a Ramón y Dani por vuestra ayuda y por los buenos momentos fuera del despacho.

Por último, agradecer a la gente que me ha ayudado desde la sombra, en la vida personal, fuera de la universidad y del trabajo. Gracias a mis padres, ejemplo de todo lo bueno que puedo tener como persona. Gracias por ser los mejores abuelos que Alex y Albert podrían tener, y por vuestra inestimable paciencia y ayuda en la crianza para que pudiera encontrar algo de tiempo de dedicación para terminar esta tesis. También gracias a sus tías por echar una mano cuando podían. Y por supuesto gracias a mi mujer Aga (Aguita para mí y para los amigos) por acompañarme en este camino y por ayudarme siempre sin pedir nada a cambio. Eres una súper-madre y estoy muy orgulloso de tenerte en mi vida.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introducción	1
CAPÍTULO 2: Objetivos	143
CAPÍTULO 3: Materiales y Métodos.....	149
CAPÍTULO 4: Water resource recovery by means of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors using the effluent from an anaerobic membrane bioreactor fed with pre-treated sewage.....	163
CAPÍTULO 5: Performance of an outdoor membrane photobioreactor for resource recovery from anaerobically treated sewage	193
CAPÍTULO 6: Kinetic modeling of autotrophic microalgae mainline processes for sewage treatment in phosphorus-replete and -deplete culture conditions	229
CAPÍTULO 7: Resumen y discusión de resultados.....	291
CAPÍTULO 8: Conclusiones	309

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1 LA EDAR DEL SIGLO XXI: ESTACIONES DE RECUPERACIÓN DE RECURSOS DEL AGUA

1.1 La problemática actual de escasez de agua y recursos a nivel mundial

La ONU estima que la población mundial aumentará desde los 7.700 millones de habitantes en 2022 hasta los 9.700 millones en 2050, pudiendo alcanzar un máximo cercano a los 11.000 millones para el año 2100. Este acentuado crecimiento de población demanda enormes cantidades de agua para el consumo directo y para el abastecimiento de la industria alimentaria y de la agricultura.

El cambio climático también provoca un efecto negativo sobre los recursos hídricos, generando sequías extremas que reducen la disponibilidad de agua y la productividad de las cosechas (Ocampo, 2011).

La combinación de estos dos efectos es la principal causa que está generando la escasez de agua o estrés hídrico a escala global. España es uno de los países europeos con mayor tendencia al estrés hídrico. En los últimos años, España se ha registrado como uno de los países que más agua consume para uso doméstico ($265 \text{ L}\cdot\text{hab}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en 2022 según la Agencia Europea de Medio Ambiente), y esta demanda ha venido aumentando en los últimos años debido al desarrollo económico, la expansión urbana, el turismo y la agricultura. La ONU prevé que para el año 2030 un 65% de la población española sufrirá las consecuencias de la escasez de agua.

Dentro de este contexto de fuerte crecimiento de la población, la FAO considera el estrés hídrico como una de las amenazas más graves para el desarrollo sostenible. El estrés hídrico actual hace que sea más necesario que nunca optimizar la gestión de los recursos hídricos disponibles, sobre todo en zonas áridas y semi-áridas. También es necesario centrar los esfuerzos en la búsqueda de fuentes de agua distintas a las convencionales para el consumo tales como el agua desalinizada o el agua reutilizada (Hardy et al., 2015). El agua reutilizada procedente de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) ha sido usada tradicionalmente para fines de riego en la agricultura. No obstante, los avances tecnológicos logrados en el campo del tratamiento de aguas han conseguido aumentar de

manera significativa la calidad del agua en el efluente que producen las EDAR, haciendo incluso que pueda considerarse este recurso hídrico para su uso en aplicaciones urbanas o para el suministro de agua potable (Maliva et al., 2012).

El actual incremento demográfico a escala mundial demanda otros recursos además del agua para poder abastecer a toda la población. La agricultura es el motor encargado de generar el 80% de los alimentos que se consumen en el mundo. La clave para garantizar el éxito de las cosechas en la agricultura es aportar una combinación de tres nutrientes clave (nitrógeno, fósforo y potasio) mediante la aplicación de fertilizantes.

El nitrógeno (N) necesario para la generación de fertilizantes ha sido tradicionalmente obtenido a través del proceso Haber-Bosch. Este proceso consiste en la síntesis de amoníaco (NH_3) a partir del nitrógeno atmosférico. La reacción del proceso Haber-Bosch necesita unas condiciones de temperatura de 400°C y una presión de 150 bar, lo cual requiere la aportación de grandes cantidades de energía. Debido al gran consumo energético, y a la generación de gases de efecto invernadero que se desprenden del proceso Haber-Bosch, en las últimas décadas se han centrado los esfuerzos en la búsqueda de tecnologías alternativas para la obtención de NH_3 . Una alternativa cada vez más en auge se basa en la recuperación del nitrógeno amoniacal presente en las aguas residuales urbanas. Tradicionalmente, en las EDAR el nitrógeno presente en las aguas residuales era transformado en nitrógeno gas que se liberaba a la atmósfera. En las últimas décadas se han desarrollado y aplicado procesos para la recuperación de nitrógeno de las aguas como son el proceso de cristalización de estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y el proceso de *stripping*-absorción de amoníaco (Kar et al., 2023). El cultivo de microalgas (Cai et al., 2013) y los contactores de membrana (Darestani et al., 2017) han demostrado también ser tecnologías viables para la recuperación de nitrógeno.

Además del nitrógeno, el fósforo (P) también es un nutriente esencial en la obtención de fertilizantes para la agricultura. Casi todo el fósforo que utilizan los agricultores en la actualidad se extrae de las rocas fosfáticas. Este tipo de rocas se considera un recurso no renovable, estando localizados sus yacimientos en zonas muy concretas del planeta (principalmente en Estados Unidos, China y Marruecos). Según algunas estimaciones, las fuentes de rocas fosfáticas podrían agotarse en un periodo de 50 o 100 años al ritmo de explotación actual (Cordell et al., 2009), por lo que es necesario la búsqueda de fuentes

alternativas de fósforo. Una alternativa viable es la recuperación de fósforo de las aguas residuales.

Para hacer frente al reto de la escasez mundial de agua y de recursos (nitrógeno, fósforo y energía), la recuperación de recursos de las aguas residuales es una alternativa factible por diferentes razones:

- Actualmente es posible recuperar el agua tratada mediante técnicas de reutilización que permiten dar un segundo uso a las aguas residuales para diversas aplicaciones (riego de cultivos, recarga de acuíferos, suministro de agua potable, etc.).
- Las aguas residuales suelen contener un alto contenido de nitrógeno y fósforo que pueden ser recuperados aplicando diversas tecnologías. De no recuperar dichos nutrientes, estos son eliminados del agua sin posibilidad de una reutilización posterior (p.ej. como sucede en el proceso de nitrificación-desnitrificación) o se vierten con el efluente de las EDAR pudiendo provocar el fenómeno negativo de eutrofización en el medio receptor.

El objetivo de la recuperación de nutrientes de las aguas residuales está alineado con los principios de la Economía Circular, existiendo en la actualidad tecnologías que nos permiten reconsiderar los nutrientes como un recurso en vez de como un contaminante presente en las aguas residuales.

1.2 El tratamiento de aguas residuales en una EDAR convencional

Los principales contaminantes que se encuentran presentes en las aguas residuales son arenas, grasas y aceites, sólidos en suspensión, materia orgánica, nutrientes (principalmente N y P), metales pesados (hierro, plomo, mercurio, etc.) y contaminantes emergentes (fármacos, compuestos perfluorados, etc.).

CAPÍTULO 1

El tratamiento de aguas residuales se basa en someter a las aguas a diversos procesos (físicos, químicos y biológicos) para eliminar o reducir su nivel de contaminación. El objetivo es limitar la concentración remanente de contaminantes del agua tras el proceso de tratamiento, evitando que ésta supere los límites legalmente establecidos en el efluente y pueda ser asimilada de forma natural por el medio receptor sobre el que se realiza el vertido, evitando así problemas ambientales de carácter severo (p.ej. eutrofización, reducción del oxígeno disuelto, etc.).

La Figura 1.1 muestra un esquema de los tratamientos convencionales que se aplican a las aguas residuales en una EDAR para la depuración de aguas residuales urbanas, distinguiendo entre la línea de aguas y la línea de fangos:

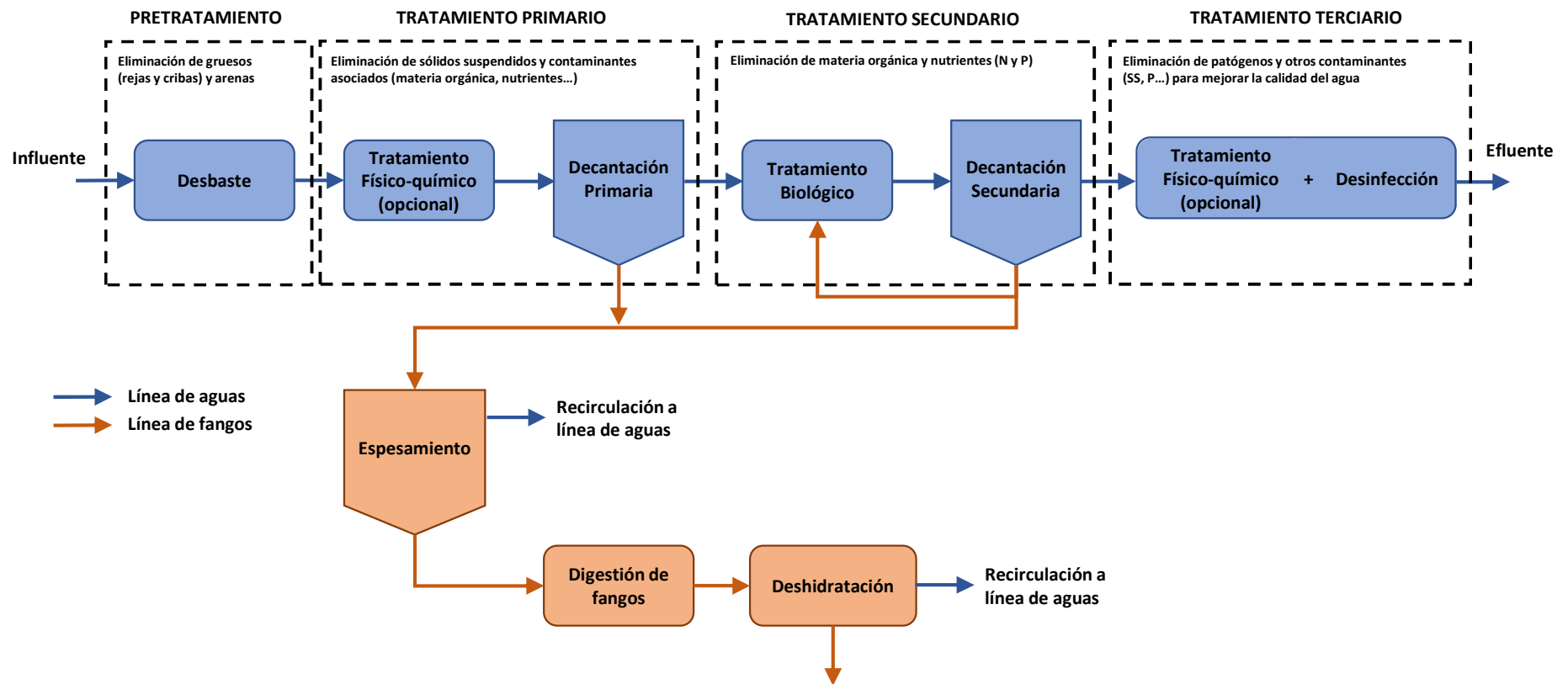


Figura 1.1. Procesos de tratamiento en una EDAR convencional (F: tratamiento físico; Q: tratamiento físico; B: tratamiento biológico) (adaptado de Metcalf & Eddy (1995)).

La configuración estándar de una EDAR convencional para el tratamiento de aguas residuales urbanas se basa en la aplicación de un **sistema de fangos activados** y de una **digestión anaerobia** para la estabilización de los fangos generados.

En la línea de aguas de una EDAR convencional, el tratamiento primario consiste generalmente en un proceso físico de decantación o sedimentación para eliminar partículas suspendidas de las aguas residuales entre las que se encuentra gran cantidad de materia orgánica. A continuación, el tratamiento secundario consiste en un proceso biológico de fangos activados mediante el cual, dentro de un reactor aireado, las bacterias heterótrofas degradan la materia orgánica en presencia de oxígeno. El efluente del reactor de fangos activados es conducido hasta el decantador secundario para favorecer la sedimentación del fango y permitir su recirculación de nuevo hasta el reactor biológico. En algunas EDAR se aprovecha el tratamiento biológico para llevar a cabo la eliminación biológica de nutrientes (principalmente N y P) de las aguas residuales mediante la combinación secuencial de zonas anaeróbicas, anóxicas y aerobias. Por último, en las EDAR más avanzadas existe el tratamiento terciario, que consiste en un proceso de afino para conseguir una calidad del efluente óptima para el vertido del agua al medio natural o para su reutilización, eliminando los contaminantes no eliminados anteriormente como pueden ser N, P, metales pesados, compuestos orgánicos, bacterias y virus. El tratamiento terciario suele llevarse a cabo mediante procesos de coagulación-floculación, carbón activado, exposición del agua a radiación ultravioleta u oxidación avanzada con ozono.

El sistema convencional de fangos activados es un sistema de tratamiento que consume gran cantidad de energía debido a las necesidades de aireación del reactor para el suministro de oxígeno ($0,3-0,6 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-3}$). Esto supone aproximadamente el 50% del total de energía que demanda una EDAR para su operación (McCarty, 2012; McCarty et al., 2018).

En la línea de fangos, para la estabilización de la materia orgánica de los fangos primarios y secundarios que se purgan de la línea de aguas se suele utilizar el proceso de digestión anaerobia. Este proceso permite reducir el contenido de la materia orgánica en ausencia de oxígeno mediante un proceso biológico secuencial donde actúan diferentes bacterias: acidogénicas, acetogénicas y metanogénicas. El resultado del proceso en un reactor de digestión anaerobia es la estabilización del fango, obteniendo como producto una

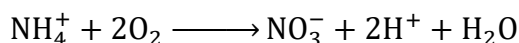
corriente de biogás con alto contenido energético (285 kWh por cada 100 kg DQO) (Olsson et al., 2005).

La digestión anaerobia es un proceso que requiere de un gran aporte energético para poder operar a la temperatura adecuada (en torno a los 35°C y 55°C en rangos de trabajo mesofílico y termofílico, respectivamente). Esta energía se obtiene a partir de la corriente de biogás que se genera como producto de la digestión anaerobia. Sin embargo, esta energía recuperada en la digestión anaerobia sólo permite recuperar alrededor de un 10% de la energía total contenida en el agua residual y no es suficiente para cubrir las necesidades de energía de una EDAR (Heidrich et al., 2011; Hao et al., 2018).

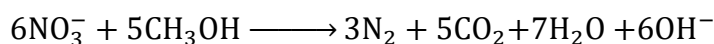
Como se ha comentado, en algunas EDAR se lleva a cabo la **eliminación biológica de nitrógeno y fósforo** en el reactor de fangos activados.

La **eliminación biológica de nitrógeno** en una EDAR convencional (ver Figura 1.2) se suele llevar a cabo mediante un proceso biológico en dos etapas (nitrificación-desnitrificación), que se basa en transformar el nitrógeno contenido en las aguas residuales (principalmente en forma amoniacal) en nitrógeno gas (N_2).

El proceso de **nitrificación** (Reacción 1.1) consiste en la transformación del nitrógeno amoniacal (NH_4^+) en nitrato (NO_3^-) por acción de un conjunto de bacterias autótrofas nitrificantes en condiciones aeróbicas, las cuales utilizan como fuente de carbono el CO_2 o HCO_3^- disuelto, y obtienen la energía necesaria para su crecimiento a partir de la oxidación del NH_4^+ . La nitrificación se realiza en dos etapas secuenciales llevadas a cabo por dos grupos diferentes de microorganismos (bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes). El proceso de **desnitrificación** (Reacción 1.2) es la segunda etapa del proceso biológico de eliminación de nitrógeno, en el cual las bacterias heterótrofas facultativas, en condiciones anóxicas, utilizan el NO_3^- como aceptor de electrones para degradar la materia orgánica (la utilizan como fuente de C), logrando convertir el nitrato en nitrógeno gas (N_2).



Reacción 1.1. Reacción de nitrificación simplificada.



Reacción 1.2. Reacción de desnitrificación.

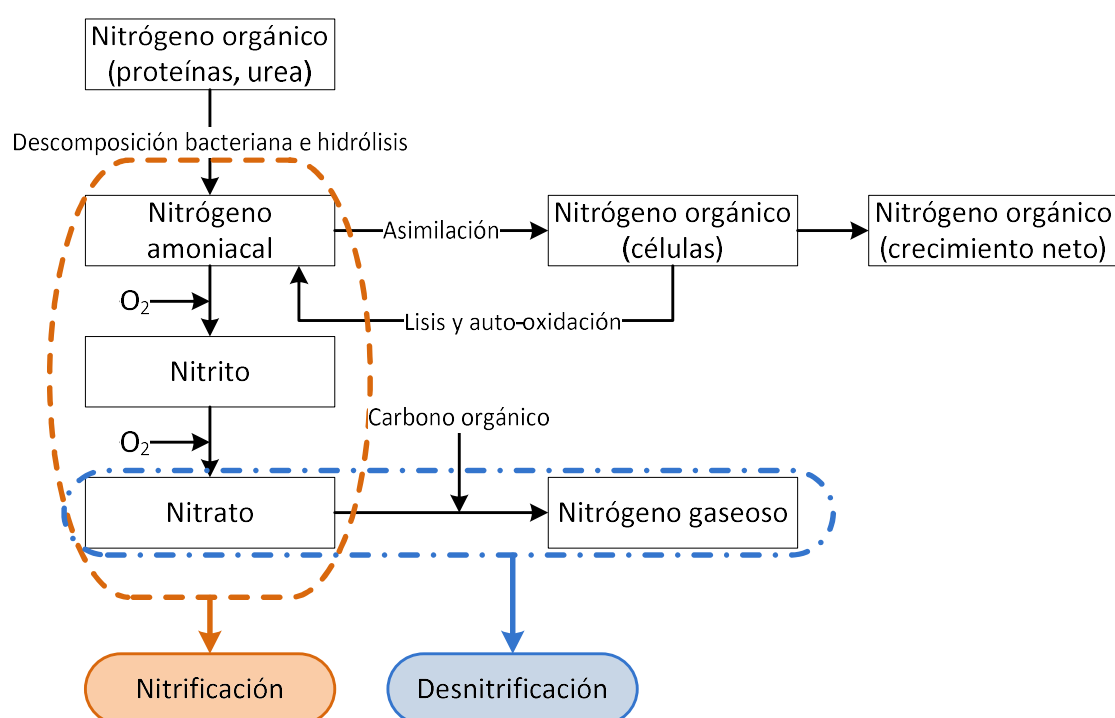


Figura 1.2. Transformaciones del nitrógeno en los procesos de tratamiento biológico (adaptado de Metcalf & Eddy, 1995).

El proceso de nitrificación-desnitrificación descrito para la eliminación del nitrógeno amoniacal presente en las aguas residuales es un proceso que requiere un alto consumo energético debido a las necesidades de oxígeno para desarrollar la fase de nitrificación ($4 \text{ kWh} \cdot \text{kg N}^{-1}$) (Lackner et al., 2014). Con el objetivo de proporcionar un mayor rendimiento en la eliminación biológica de nitrógeno con un menor coste de operación,

en los últimos años se han realizado avances en otros procesos biológicos (Eskicioglu et al., 2018). Estos procesos serían los siguientes:

- Proceso BABE (Bio-augmentation batch enhanced): consiste en favorecer la polifерación de bacterias nitrificantes en un reactor externo alimentado con el agua proveniente de la deshidratación del fango rica en amonio y una pequeña fracción de la recirculación de fangos.
- Proceso SHARON (Single reactor High activity Ammonia Removal Over Nitrite): consiste en la eliminación de nitrógeno vía nitrito, deteniendo el proceso de nitrificación tras la primera etapa.
- Proceso ANAMMOX (Anaerobic Ammonia Oxidation): consiste en la oxidación anaerobia del nitrógeno amoniacal utilizando nitrito como aceptor de electrones. Los productos de este proceso son nitrógeno gas (producto mayoritario) y nitrato.
- Proceso CANON (Completely autotrophic Ammonia Removal Over Nitrite): en este proceso, las bacterias amoniooxidantes transforman parte del amonio en nitrito y las bacterias Anammox oxidan el amonio restante utilizando el nitrito formado como aceptor de electrones.
- Proceso DEAMOX (Denitrifying Ammonium Oxidation): consiste en la combinación del proceso ANAMMOX con condiciones desnitrificantes usando sulfuro como dador de electrones para reducir el nitrato a nitrito. Este proceso está pensado para aguas residuales con altas concentraciones de amonio y sulfuro.

La **eliminación biológica de fósforo** en una EDAR convencional (ver Figura 1.3) se desarrolla también en un proceso secuencial en el cual se somete a las bacterias del reactor biológico a unas condiciones de ausencia de oxígeno y nitrato (condiciones anaerobias), antes de entrar a una segunda fase donde se encuentra presente el aceptor de electrones, esto es, una fase anóxica (con nitratos y/o nitritos presentes) o una fase aerobia (con oxígeno disuelto presente).

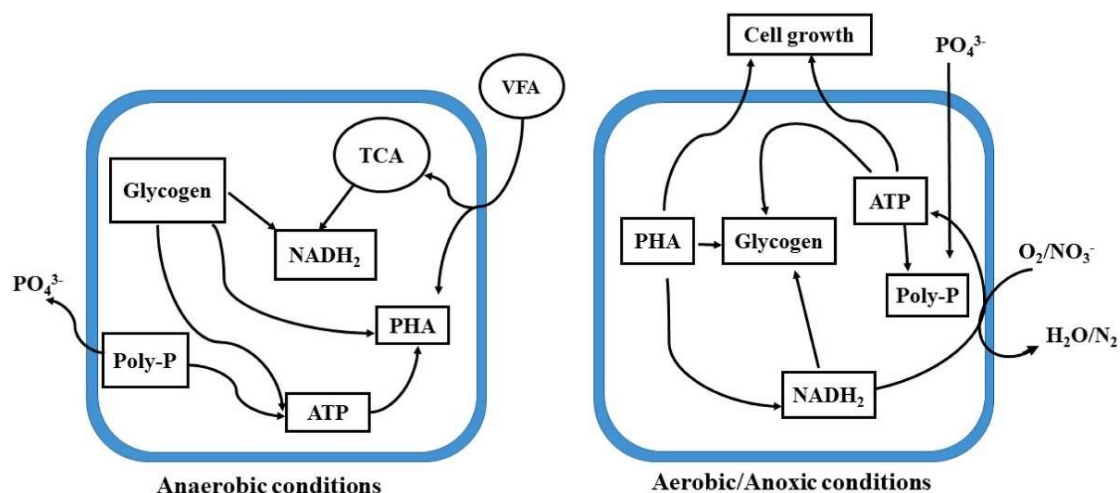


Figura 1.3. Esquema del metabolismo de las bacterias PAO en la eliminación biológica de fósforo (Habyarimana et al., 2022).

En la fase anaerobia, las bacterias acumuladoras de polifosfato (PAO) son capaces de almacenar ácidos orgánicos de cadena corta, principalmente ácido acético, en forma de polímeros internos llamados polihidroxialcanoatos (PHA). La energía necesaria para almacenar el PHA la obtienen de la descomposición del glucógeno y de la hidrólisis del polifosfato (Poly-P) almacenados intracelularmente. Durante la fase anaerobia, el fosfato es liberado al medio produciendo un incremento de la concentración de ortofosfato (PO_4^{3-}) en el mismo. En la segunda fase anóxica/aerobia, las bacterias PAO utilizan la fuente de carbono (PHA) almacenada internamente durante la fase anaerobia para el crecimiento celular, la producción de glucógeno y el almacenamiento en forma de Poly-P de los ortofosfatos presentes en el agua. El balance entre la cantidad de P liberada en la fase anaerobia y la capturada por las bacterias PAO en forma de Poly-P en la fase aerobia/anóxica resulta en una eliminación neta de fósforo del medio. Por último, este fósforo almacenado en las bacterias PAO es extraído del sistema a través del fango purgado en el decantador secundario tras la etapa aerobia o anóxica.

Para reducir los costes de operación del proceso de eliminación biológica de fósforo el objetivo es maximizar la fracción de eliminación de P que se consigue en fase anóxica, dado que así es posible reducir el coste energético de aireación y se reduce la cantidad de fuente de carbono necesaria para la desnitrificación (Oehmen et al., 2007).

Existen diversas configuraciones del reactor de fangos en las EDAR que permiten la eliminación biológica de fósforo. Las configuraciones más típicas se muestran en la Figura 1.4. La configuración A²O permite, además de la eliminación biológica de fósforo y de materia orgánica, la eliminación biológica de nitrógeno.

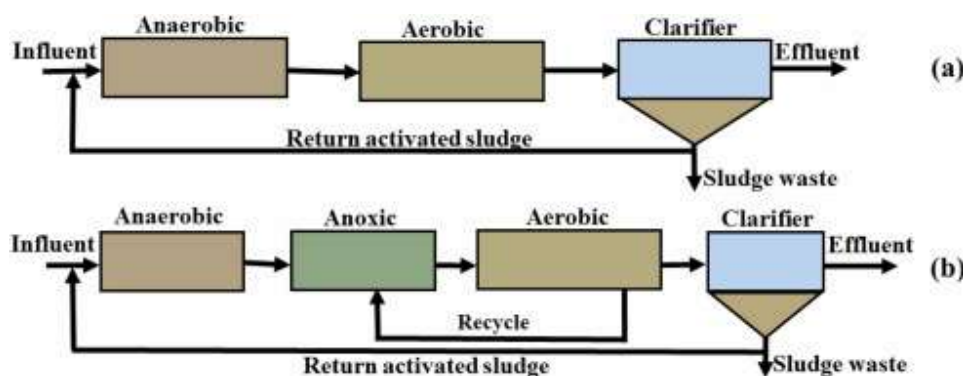


Figura 1.4. Configuraciones para la eliminación biológica de P: (a) Proceso anaeróbico-aerobio (A/O); (b) Proceso anaerobio-anóxico-aerobio (A²/O) (Habyarimana et al., 2022).

La eliminación de fósforo por vía biológica es preferible a la eliminación química conseguida mediante la adición de coagulantes que provocan la precipitación del fósforo disuelto. Las ventajas de la eliminación biológica son la reducción de los costes de operación, la no necesidad de aditivos químicos y que se trata de un proceso no contaminante. No obstante, mediante la eliminación biológica es difícil obtener un proceso estable de eliminación de P que cumpla con los límites de vertido tan estrictos en el efluente que marca la legislación, por lo que en la práctica se tiende a utilizar en las EDAR una combinación de procesos biológico y químico para llevar a cabo la eliminación del fósforo de las aguas residuales (Habyarimana et al., 2022).

En **conclusión**, los tratamientos convencionales que se dan en la mayoría de las EDAR presentan algunos inconvenientes entre los que cabe destacar:

- Su objetivo principal es eliminar los contaminantes del agua residual que llegan a las EDAR para cumplir los requisitos de vertido en el efluente que marca la legislación. Esta concepción lineal de las EDAR limita la posibilidad de recuperación de recursos (nutrientes, agua y energía).
- Son tratamientos que consumen grandes cantidades de energía. Un estudio de la Administración de Información Energética de Estados Unidos en 2010 calculó el consumo de energía de todas las EDAR era aproximadamente el 3% del consumo de energía total del país. Además, cuanto más restrictivos son los requisitos de vertido en el efluente de las EDAR, más energía se necesita para conseguirlos.
- En términos de contaminación atmosférica, los procesos de tratamiento producen grandes cantidades de gases de efecto invernadero, lo cual ha sido identificado como uno de los mayores impactos negativos de la operación de las EDAR (Fang et al., 2016; Zhang & Liu, 2022).

1.3 Economía circular en el sector de las aguas residuales: Recuperación de Recursos del Agua

Actualmente, el consumo y extracción de los recursos naturales se está llevando a cabo a una velocidad mayor que la capacidad de renovación (velocidad con la que el planeta puede volver a generarlos o renovarlos), lo cual representa un gran impacto medioambiental. Es necesario, por tanto, un cambio de paradigma en la sociedad, intentando centrar los esfuerzos en la búsqueda de nuevas fuentes de recursos renovables y tecnologías que permitan optimizar y reaprovechar los recursos existentes.

La **Economía Circular** es un concepto económico reciente que se basa en fomentar el aprovechamiento de los residuos generados de manera que estos puedan ser incluidos de nuevo en la cadena de producción. Con este concepto se pretende reducir el consumo y preservar las materias primas, el agua y la energía, permitiendo la conservación del planeta y el desarrollo sostenible.

Las aguas residuales pueden ser consideradas una fuente de recursos en términos de agua reutilizada, recuperación de nutrientes y generación de energía (Mo & Zhang, 2013), por

lo que resulta interesante poder aplicar el concepto de Economía Circular en las EDAR, consiguiendo que estas pasen a ser consideradas como **Estaciones de Recuperación de Recursos del Agua** (Zhang & Liu, 2022).

En el siguiente esquema (Figura 1.5) se muestra un caso real de aplicación de la Economía Circular en la EDAR de la ciudad de Braunschweig (Alemania). Las aguas residuales urbanas regeneradas son usadas para irrigación agrícola y el fango producido en la EDAR como fertilizante en campos de cultivos energéticos. Posteriormente, el cosechado de los cultivos energéticos vuelve a ser reincorporado en el proceso mediante su transformación en biogás, energía y calor en plantas de energía.

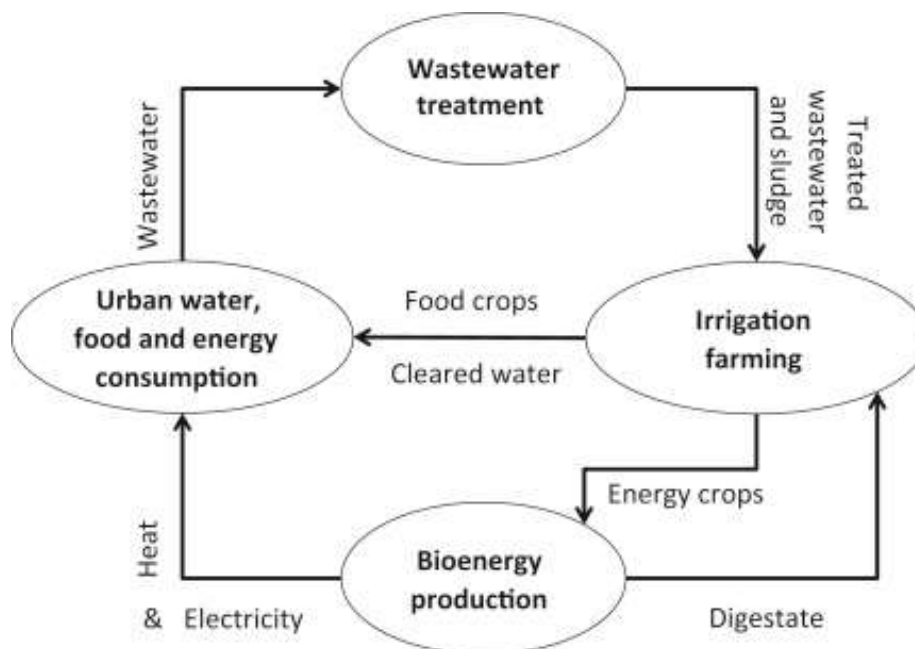


Figura 1.5. Esquema de Economía Circular (agua residual - nutrientes - energía) aplicada en la EDAR de Braunschweig (Grundmann & Maaß, 2016).

La EDAR del siglo XXI debería ser una instalación que considere el agua residual como un recurso, en vez de como un residuo, y que aplique en su configuración tecnologías que permitan la recuperación de los recursos que éstas contienen (agua, nutrientes y energía). Este ideal no es un concepto futurista, sino que actualmente pueden encontrarse muchas EDAR que utilizan este tipo de tecnologías que fomentan la Economía Circular. Algunas de las EDAR que aplican este concepto han logrado ser autosuficientes en términos de

energía, pudiendo encontrar incluso alguna EDAR que produce más energía que la que consume, inyectando la energía sobrante en la red eléctrica de la región en la que se encuentra (Guven et al., 2022).

A continuación, se describen las principales tecnologías existentes que permiten la recuperación de recursos de las aguas residuales.

1.3.1 Tecnologías para el aprovechamiento de la materia orgánica presente en las aguas residuales

En los últimos años, la comunidad científica ha estudiado diferentes tecnologías que permiten la recuperación de la materia orgánica presente en las aguas residuales como recurso o materia prima para otras aplicaciones.

La **recuperación de ácidos grasos volátiles (AGV)** producidos a partir de corrientes de aguas residuales con alto contenido de materia orgánica resulta ser una solución sostenible frente a la producción clásica basada en procesos petroquímicos. Los AGV (principalmente ácido propiónico, ácido butírico y ácido acético) se obtienen en una EDAR a partir de la hidrólisis y fermentación del fango primario, procesos llevados a cabo por las bacterias acidogénicas. Para maximizar la producción de AGV es importante conseguir inhibir el crecimiento de las bacterias metanogénicas mediante la aplicación de tiempos de retención celular (TRC) cortos y/o estableciendo valores de pH elevados durante la fermentación (Kehrein et al., 2020). Las aplicaciones más extendidas de los AGV se centran en su uso como materia prima para la obtención de biogás, bioplásticos, biohidrógeno y disolventes. Actualmente existen algunos obstáculos que impiden la producción de AGV a gran escala: (1) la dificultad de control de las actividades metabólicas que producen los AGV y la persistencia de la metanogénesis en la producción biológica de AGV, y (2) las limitaciones del proceso de recuperación de los AGV producidos. El proceso para recuperación de AGV que más está centrando la atención de la comunidad científica es la digestión anaerobia (Atasoy et al., 2018).

Otra aplicación que favorece la recuperación de materia orgánica de las aguas residuales es la **recuperación de polihidroxicanoatos (PHA)**, que es un poliéster que se acumula

intracelularmente de forma natural en las bacterias como fuente de carbono y energía en condiciones desfavorables (p.ej. limitación de nutrientes). La obtención de bioplásticos obtenidos a partir de PHA presenta una menor huella de carbono que los plásticos obtenidos por métodos petroquímicos. Además, estos bioplásticos pueden ser utilizados en la industria médica para la generación de implantes, y en la industria química para producir biocombustibles o como fuente de monómeros para la síntesis de antibióticos, vitaminas, compuestos aromáticos y feromonas (Chen, 2009). Recientemente, el fuerte interés económico por los productos derivados de los PHA ha generado que se consideren corrientes de bajo valor residual (aguas residuales urbanas y agroindustriales) como sustrato, reduciendo así los costes de producción. Generalmente, esta producción se combina con otros procesos que se llevan a cabo en las EDAR como la eliminación de materia orgánica y nutrientes (Puyol et al., 2017). El proceso más común para la producción de PHA en el ámbito de las aguas residuales se lleva a cabo en tres fases: 1ª) fermentación acidogénica para transformar la materia orgánica presente en el agua en AGV, 2ª) selección del cultivo aerobio con capacidad para acumular PHA en condiciones alternas de presencia y ausencia de sustrato, y 3ª) el cultivo seleccionado se somete a un pulso de sustrato que contiene altas concentraciones de AGV para promover el almacenamiento de PHA en el interior de las bacterias.

La **recuperación de celulosa** de las aguas residuales es otra aplicación interesante que permite obtener un producto que puede ser reutilizado (Mussatto & Loosdrecht, 2016). Las fibras de celulosa representan aproximadamente el 50% del total de sólidos suspendidos presentes en las aguas residuales que llegan a una EDAR (proveniente en casi su totalidad del papel higiénico), y es una fracción importante de la DQO particulada contenida en el influente, que es rápidamente degradada durante el tratamiento aerobio. Las principales aplicaciones de la celulosa que es recuperada en una EDAR es el de su uso como acondicionador de suelos, como aditivo para la obtención de materiales de construcción (p.ej. asfalto), y como materia prima para las plantas de combustión o para la industria de fabricación de papel. La celulosa es muy fácil de recuperar mediante la aplicación de tamices finos (< 0,5 mm) en la línea de pre-tratamiento de una EDAR, lo que mejora notablemente la operación de la planta al reducir las necesidades de aireación del reactor y la cantidad de fango generado. No obstante, hay que tener en cuenta que la

CAPÍTULO 1

extracción de celulosa limita en más de un 10% la generación de biogás en la digestión anaerobia (Kehrein et al., 2020).

Existen otros productos orgánicos que es posible recuperar de las aguas residuales, como las **proteínas** o las **sustancias poliméricas extracelulares (EPS)**, pero su aplicación real es aún escasa.

La única aplicación de recuperación de materia orgánica de las aguas residuales factible y extendida en la actualidad son los **sistemas de tratamiento anaerobios**. Este tipo de tratamiento de las aguas residuales son una alternativa a los tratamientos aerobios convencionales y son conocidos desde el siglo pasado. No obstante, en sus inicios, este tipo de tratamientos fueron considerados ineficientes y lentos (debido a las bajas tasas de crecimiento de las bacterias anaerobias) para el tratamiento grandes volúmenes de aguas residuales, especialmente en áreas industriales y densamente pobladas. Actualmente, por esta razón, los tratamientos anaerobios a gran escala sólo se aplican para el tratamiento de corrientes muy concentradas. Ejemplos de estas aplicaciones son la estabilización de los fangos en EDAR urbanas y el tratamiento de aguas residuales industriales.

Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que los procesos anaerobios son una alternativa económicamente atractiva para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales (incluyendo las aguas residuales urbanas) en zonas con temperaturas relativamente altas que permiten mantener una temperatura elevada de los reactores sin elevados costes energéticos (Pretel et al., 2016).

El proceso de tratamiento anaerobio de aguas residuales se lleva a cabo mediante la acción sucesiva de varios grupos de bacterias anaerobias. Este proceso secuencial se describe en el esquema de la Figura 1.6:

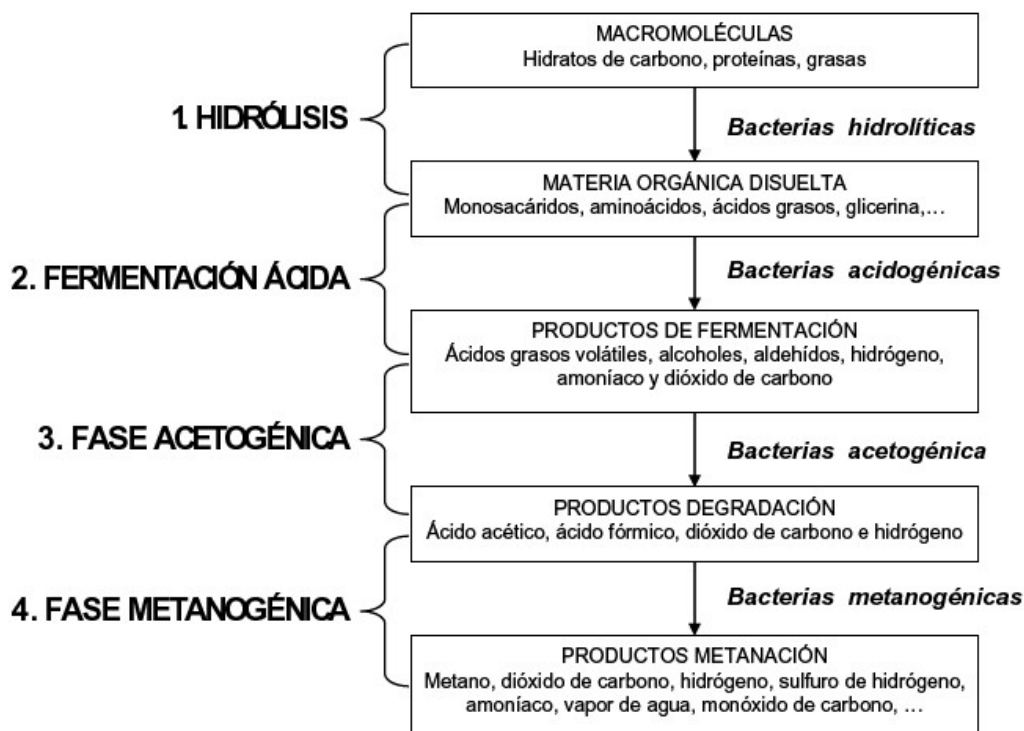


Figura 1.6. Fases de la degradación anaerobia de la materia orgánica (Metcalf & Eddy, 1995).

En la fase inicial del tratamiento anaerobio, las bacterias acidogénicas hidrolizan la materia orgánica suspendida en sustrato soluble, y realizan el proceso de fermentación generando AGV. A continuación, las bacterias acetogénicas transforman los AGV en ácido acético e hidrógeno. Las bacterias metanogénicas toman el ácido acético y el hidrógeno para transformarlo en metano y dióxido de carbono (biogás). En ambientes con presencia de sulfatos en las aguas residuales pueden aparecer en el proceso las bacterias sulfatoreductoras, que transforman el sulfato (SO_4^{2-}) en sulfuro (S^{2-}) consumiendo para ello AGV e hidrógeno. La presencia de bacterias sulfatorreductoras en los tratamientos anaerobios reduce de forma considerable la producción de biogás asociada a la digestión anaerobia, y provoca la aparición de ácido sulfhídrico (H_2S), que es un compuesto altamente tóxico y corrosivo, y que genera malos olores.

CAPÍTULO 1

Los tratamientos biológicos anaerobios del agua residual presentan una serie de ventajas muy interesantes respecto a los tratamientos aerobios convencionales (Qadri et al., 2022):

- No necesitan aporte de oxígeno en el reactor biológico, lo que supone un gran ahorro energético al no precisar de elementos de aireación mecánica.
- Como producto del proceso de tratamiento anaerobio se obtiene una corriente de biogás con elevado valor energético ($PCI \approx 10 \text{ kWh} \cdot \text{m}^{-3}$). Esta corriente de biogás es una fuente de combustible renovable, que puede ser derivada a un motor de cogeneración para la obtención de energía eléctrica y térmica.
- Producen menores emisiones de CO_2 que los tratamientos aerobios, reduciendo la huella de carbono que generan las EDAR.
- Debido a la menor tasa de crecimiento de las bacterias anaerobias (entre 6-8 veces menor), la producción de fangos es significativamente menor que en los tratamientos aerobios (entre 3-20 veces menos cantidad de fango).
- Las necesidades de espacio para el tratamiento anaerobio son menores que en los tratamientos aerobios, debido a que la carga de DQO en la que suelen trabajar los reactores anaerobios es hasta 10 veces superior.
- La operación de los sistemas anaerobios es más simple y permite obtener una mejor eficiencia del proceso en condiciones extremas, es decir, a bajas temperaturas y altas cargas de DQO.
- En cuanto a las posibilidades de recuperación de nutrientes, los tratamientos anaerobios ofrecen una gran ventaja, dado que el proceso genera un efluente con altos contenidos de nutrientes disueltos (nitrógeno y fósforo, básicamente). Aplicando el correcto post-tratamiento del efluente, estos nutrientes pueden ser fácilmente recuperados en forma de biomasa (p.ej. cultivos de microalgas) o en agua reutilizada para riego.

El siguiente esquema (Figura 1.7) muestra una comparativa entre los tratamientos aerobios y anaerobios en cuanto a valores de necesidades de aireación, producción de fangos y conversión de la materia orgánica:

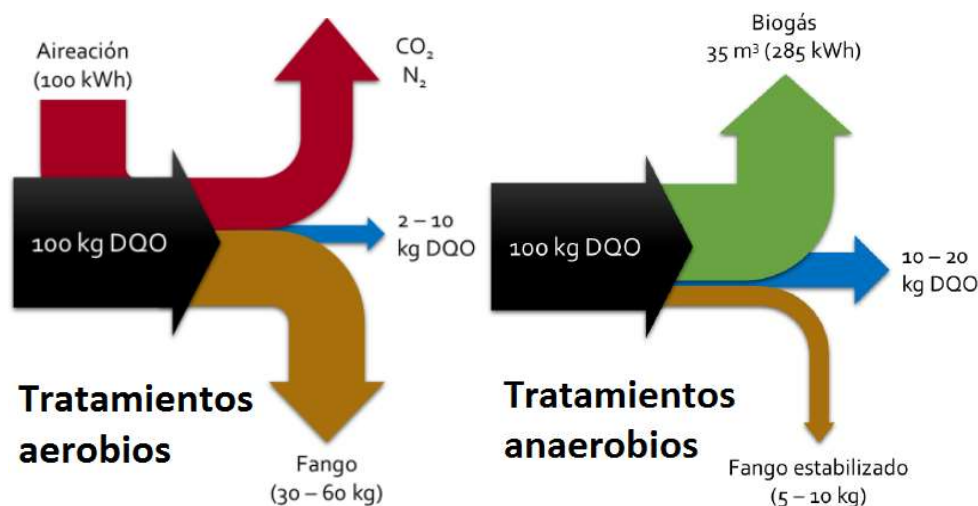


Figura 1.7. Esquema comparativo entre los tratamientos aerobios y anaerobios.

Por otro lado, existen una serie de desventajas asociadas a los tratamientos anaerobios (Qadri et al., 2022):

- Es necesario realizar un post-tratamiento del efluente para cumplir los requisitos de vertido en medio natural que marca la legislación. Esto supone un coste adicional respecto a los tratamientos aerobios.
- Requieren mayores tiempos para el arranque del proceso biológico dado las tasas bajas de crecimiento de las bacterias anaerobias.
- Los procesos de tratamiento anaerobios presentan una gran sensibilidad a las variaciones de temperatura. Cualquier cambio brusco de temperatura podría llegar a inhibir el proceso.
- Los sistemas anaerobios también son muy sensibles al pH. Para controlar el pH en el reactor en todo momento, puede ser necesaria la adición de alcalinidad para lograr aproximadamente $2.000-3.000 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Esta adición de reactivo para el control del proceso supone un encarecimiento del proceso.
- Los tratamientos anaerobios producen fuertes olores debido a los gases (CH₄ y H₂S principalmente) que generan. Esto exige la instalación de sistemas de

desodorización para evitar los problemas cuando se plantea colocar las EDAR cerca del casco urbano.

- El H₂S generado en el tratamiento anaerobio es un componente muy corrosivo que daña de manera notable las instalaciones del reactor. Esta corrosión supone altos costes de mantenimiento.
- En aguas residuales con gran contenido de sulfatos (p.ej. Valencia), se reduce notablemente el caudal de la corriente de biogás que genera el proceso.

A nivel de operativa, los tratamientos anaerobios han de trabajar con TRC altos dada la baja tasa de crecimiento de las bacterias anaerobias. También se ha demostrado que el fango anaerobio presenta una baja velocidad de sedimentación por lo que no es posible la sedimentación y posterior recirculación del fango al reactor anaerobio. Por estos motivos, y con el fin de retener la biomasa anaerobia en el reactor, en las últimas décadas se han desarrollado una serie de tecnologías que permiten la implantación a gran escala de procesos de degradación de la materia orgánica por vía anaerobia. Los sistemas desarrollados han sido los siguientes:

- Filtro anaerobio ascendente/descendente (USSB).
- Reactor anaerobio de lecho fluidizado (AUFB).
- Lecho de lodo granular expandido (EGSB).
- Reactor anaerobio de flujo ascendente y manto de lodos (UASB).
- Reactor anaerobio de membranas (AnMBR).

A continuación se explica el funcionamiento de esta última tecnología puesto que el efluente generado por este proceso ha sido utilizado en el desarrollo de esta tesis doctoral.

1.3.1.1 El biorreactor anaerobio de membranas (AnMBR)

Para dar solución a las desventajas que presentan los sistemas de tratamiento anaerobios, y conseguir reducir de manera considerable el volumen de reacción, en los últimos años ha aparecido una tecnología muy novedosa para el tratamiento anaerobio de aguas residuales: el biorreactor anaerobio de membranas (AnMBR) (ver Figura 1.8). Este sistema combina el reactor anaerobio con un sistema de membranas de filtración, que puede ser interno o externo al reactor. Gracias a las membranas de filtración, es posible desacoplar el tiempo de retención hidráulico (TRH) del TRC, lo que permite una retención total de los microorganismos anaerobios dentro del reactor, pudiendo trabajar éste a altas concentraciones de sólidos (Giménez et al., 2014). Además, el proceso de filtración del fango anaerobio permite obtener un efluente libre de sólidos y con alta concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo), los cuales pueden ser recuperados mediante un post-tratamiento con cultivos de microalgas (Batstone et al., 2015), precipitación como estruvita o utilizando el efluente directamente para fertirrigación (Robles et al., 2020). El sistema AnMBR ha sido estudiado de manera extensa a escala piloto para el tratamiento de aguas residuales urbanas obteniéndose resultados muy prometedores (Tomczak & Gryta, 2022).

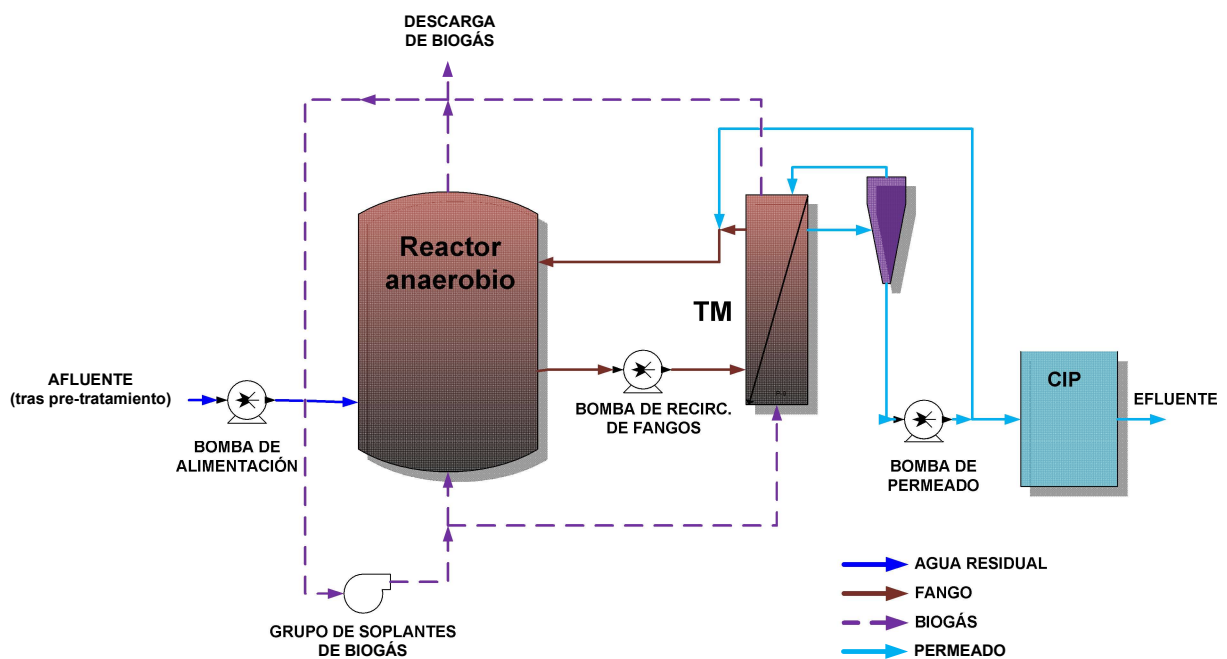


Figura 1.8. Esquema de configuración AnMBR con membranas sumergidas en un tanque externo (TM: tanque de membranas; CIP: *Clean-in-place*) (Giménez et al., 2014).

Algunos aspectos importantes que presentan los sistemas AnMBR para el tratamiento de aguas residuales son los siguientes:

- En comparación con el tratamiento convencional de fangos activados, los AnMBR permiten: (1) reducir notablemente la producción de fangos, (2) generar un ahorro importante de energía al no necesitar airear el reactor para la eliminación de materia orgánica, y (3) alcanzar un proceso con producción neta de energía debido a la corriente de biogás que genera.
- Los módulos de membranas que disponen los sistemas AnMBR son más compactos que el sistema equivalente de una EDAR convencional, es decir, el decantador secundario y las unidades de desinfección (p.ej. radiación ultravioleta), por lo que es posible reducir de manera significativa el espacio necesario para la unidad de tratamiento. De este modo, los AnMBR facilitan la ampliación o modernización de EDAR existentes, sobre todo en aquellas que presentan limitación de espacio.
- Los sistemas AnMBR permiten llevar a cabo el tratamiento de corrientes de aguas residuales con baja carga de materia orgánica (p.ej. aguas residuales urbanas) al permitir trabajar con una mayor concentración de sólidos, incluso a temperatura ambiente (Robles et al., 2022).
- La tecnología AnMBR es un proceso que puede llegar a ser autosuficiente energéticamente para el tratamiento de aguas residuales con baja o nula concentración de sulfatos en climas cálidos (Pretel et al., 2014).
- A nivel medioambiental, es importante llevar a cabo la recuperación del metano (CH_4) disuelto en el efluente de un sistema AnMBR para evitar su emisión a la atmósfera. El CH_4 es un gas con un potente efecto invernadero, equivalente entre 25 y 30 veces al efecto que produce el dióxido de carbono (CO_2).
- A nivel de operación, los sistemas AnMBR requieren un mantenimiento importante para controlar el ensuciamiento (*fouling*) de las membranas para garantizar el buen funcionamiento. Las principales operaciones para el control del ensuciamiento son: (1) la recirculación de la corriente de biogás, (2) alternar

etapas de filtración, relajación y contralavados durante la operación normal, y (3) en última instancia, realizar una limpieza química de las membranas.

- El efluente que se obtiene de un tratamiento con un sistema AnMBR es una corriente de agua con alto potencial de reutilización ya que se trata de un agua libre de sólidos y con alto contenido de nutrientes disueltos. En el estudio desarrollado por Robles et al. (2022), donde se operó un sistema AnMBR durante 600 días a temperatura ambiente con un TRC de 70 días para el tratamiento de agua residual urbana, el nitrógeno y fósforo disueltos en el efluente alcanzaron valores medios de $47,7 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ y $7,9 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Esta agua rica en nutrientes puede reutilizarse directamente para fertirrigación o como medio de sustrato para el cultivo de microalgas.

1.3.2 Recuperación de N y P de las aguas residuales

Nutrientes como el nitrógeno y fósforo son unos recursos naturales muy valorados en la agricultura, dado que son los elementos esenciales que conforman los fertilizantes que se aplican para potenciar el crecimiento de los cultivos. Ya se ha comentado en el Apartado 1.1 la escasez a escala mundial de fósforo, y las dificultades existentes para la obtención de nitrógeno en forma de amonio para la generación de fertilizantes a través del proceso Haber-Bosch. Esta dificultad para la obtención de fuentes naturales de nitrógeno y fósforo ha promovido en los últimos años la investigación de tecnologías alternativas de recuperación de nutrientes a partir de las aguas residuales aplicando el concepto de Economía Circular en las EDAR (Robles et al., 2020). Según un estudio presentado por Sniatala et al. (2023), mediante la aplicación de estas tecnologías es posible recuperar hasta el 90% de los nutrientes presentes en las aguas residuales urbanas.

Recientemente ha tomado gran interés el estudio de las **tecnologías basadas en procesos de membranas** para la recuperación de nutrientes del agua residual. Se trata de procesos físicos, físico-químicos o electroquímicos que resultan ser altamente efectivos y selectivos para la recuperación tanto de nitrógeno como de fósforo. Algunos de estos procesos de recuperación de nutrientes mediante tecnologías de membranas permiten

obtener un producto final con alto valor como biofertilizante, ayudando así a contrarrestar el impacto medioambiental que producen las EDAR (Yan et al., 2018).

El proceso de **ósmosis directa** consiste en utilizar una membrana semipermeable a la que se le aplica un flujo de agua desde una solución diluida hasta la solución de extracción (p.ej. agua marina), que posee mayor concentración. El objetivo del proceso es extraer el agua de la corriente a tratar, incrementando su concentración de nutrientes mediante la diferencia de presión osmótica entre ambas soluciones. La principal fuerza que actúa en el proceso de ósmosis inversa es la presión osmótica, siendo la presión hidráulica nula, lo que reduce los consumos energéticos en comparación con otras tecnologías de membrana para la recuperación de nutrientes del agua (Lutchmiah et al., 2014; Xie et al., 2016). Otras ventajas de este proceso son que permite obtener un producto de elevada calidad y posee un bajo potencial de ensuciamiento (Robles et al., 2020). La ósmosis inversa se ha utilizado para recuperar nutrientes de aguas residuales urbanas y de orina, alcanzando grandes porcentajes de recuperación. Por ejemplo, un estudio reciente realizado por Singh et al. (2019) consiguió recuperar el 66% de amonio y el 75% de fosfato presentes en aguas residuales urbanas. Las desventajas del proceso de ósmosis inversa son que necesita de otro proceso acoplado para la recuperación de los nutrientes, el problema del ensuciamiento o *fouling* de las membranas, y que actualmente existen pocas aplicaciones reales, siendo la mayoría de ellas a escala laboratorio.

Los **contactores de membranas de fibra hueca** son otra tecnología prometedora para la recuperación del N de las aguas residuales. Se trata de un proceso en el que una corriente a tratar, rica en nitrógeno amoniacal y con un pH elevado, atraviesa una membrana hidrofóbica de microporos y se pone en contacto con una solución de extracción ácida (normalmente ácido sulfúrico: H_2SO_4). La membrana es permeable a los gases, de manera que el NH_3 , debido a la fuerza generada por la diferencia de concentración entre ambas soluciones, atraviesa la membrana y se mezcla con el H_2SO_4 , provocando la recuperación de N en forma de sal de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$). Los contactores de membrana de fibra hueca han sido aplicados con buenos resultados para la recuperación de nitrógeno del sobrenadante de la digestión anaerobia, obteniendo eficiencias de recuperación de hasta el 99% (Noriega-Hevia et al., 2020). Las ventajas de este proceso son que necesitan de poco espacio para su implantación, la facilidad de escalado que presentan, la elevada selectividad para la recuperación de amonio, el bajo consumo energético y la capacidad

para recuperar amonio en corrientes con bajas concentraciones (Darestani et al., 2017). Por otro lado, existen algunos inconvenientes asociados a los contactores de membrana, como son el *fouling* de las membranas y el proceso de *wetting*, que es la saturación de los poros de las membranas por una de las dos corrientes expuestas, humedeciendo los poros y limitando el flujo que atraviesa las membranas. Para dar solución a estos fenómenos, es necesario el mantenimiento de las membranas mediante limpiezas químicas de las mismas.

Existen otros procesos tecnológicos para la recuperación de nutrientes del agua basadas en procesos de membranas como son **la electrodiálisis** (mediante la aplicación de membranas de cationes y aniones dispuestas de forma alterna para generar un campo eléctrico) o los **sistemas bioelectroquímicos** (mediante la aplicación de membranas de intercambio catiónico que provocan el proceso de *stripping* del amonio). Las principales diferencias entre estos dos procesos es que la electrodiálisis oxida compuestos inorgánicos en vez de orgánicos y que este proceso no está catalizado por la acción de las bacterias. Una revisión exhaustiva de todas las tecnologías de recuperación de nutrientes basadas en membranas puede obtenerse del trabajo elaborado por Robles et al. (2020) y Noriega-Hevia (2021).

Por otro lado, en los últimos años ha tomado mucha importancia el **proceso de precipitación de estruvita** ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a partir de corrientes de agua residual con alto contenido de nutrientes (p.ej. efluentes de tratamientos anaerobios). A diferencia del **proceso de precipitación de hidroxiapatita** ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que sólo permite la recuperación de fósforo, la precipitación en forma de estruvita permite recuperar tanto fósforo como NH_4^+ de las aguas residuales. La estruvita obtenida en el proceso es un compuesto que puede utilizarse directamente como fertilizante, sin necesidad de post-procesos. Las ventajas agrícolas del uso de estruvita son:

- Se trata de un buen fertilizante que aporta fósforo, nitrógeno y magnesio en conjunto.
- Se disuelve lentamente, lo que la hace especialmente interesante para aquellos cultivos o zonas forestales que se abonan una vez cada muchos años, aumentando el grado de aprovechamiento por parte de las especies vegetales.

- Se trata de un compuesto que no contiene metales pesados, por lo que la posibilidad de contaminación de acuíferos se reduce notablemente.

El proceso de precipitación incontrolada de estruvita es un proceso espontáneo que ocurre de forma habitual en las EDAR tras el proceso de digestión anaerobia, especialmente en aquellas EDAR con proceso de eliminación biológica de fósforo. Esta precipitación supone un problema técnico, pues se acumula en tuberías y depósitos causando obstrucciones e inutilizando las instalaciones, lo que provoca aumentos importantes en los costes de mantenimiento.

El proceso de cristalización de estruvita en las depuradoras es un proceso complejo que precisa condiciones adecuadas de pH (entre 8-10), para lo cual es necesario la adición de NaOH al agua, lo que supone un coste añadido para desarrollar el proceso. Además, las concentraciones de nitrógeno, fósforo y magnesio, así como la concentración de otros iones como el calcio, deben ser las adecuadas para que el proceso de cristalización de estruvita se desarrolle de manera adecuada.

A pesar de que la recuperación de fósforo (PO_4^{3-}) mediante estruvita puede llegar a ser del 90% según la estequiometría equimolar (Le Corre et al., 2009), en la práctica difícilmente se alcanza un 25% de recuperación de los ortofosfatos presentes en el agua (Bohra et al., 2022). En relación a la recuperación de nitrógeno mediante estruvita en las EDAR, sólo es posible recuperar una pequeña fracción del nitrógeno presente en el influente (alrededor del 20%) utilizando este proceso de precipitación química. La cristalización de estruvita es una tecnología implantada ya en diversas EDAR a escala industrial (Saerens et al., 2021).

En el contexto actual de escasez de recursos naturales para la obtención de nutrientes y en el que es necesario reducir de manera estricta la concentración de nutrientes (N y P) en el efluente de las EDAR para cumplir la legislación vigente, la **tecnología de cultivos de microalgas** ha suscitado el interés de la comunidad científica en los últimos años puesto que permite recuperar simultáneamente nitrógeno y fósforo de las aguas residuales.

Las microalgas engloban un amplio conjunto de microorganismos que incluye tanto las microalgas eucariotas como las cianobacterias procariotas. Las microalgas verdes (p.ej. *Chlorella* sp., *Monoraphidium* sp. y *Scenedesmus* sp.) han sido las más estudiadas y utilizadas en el ámbito de las aguas residuales por su rápida adaptación al medio, su alta capacidad de asimilar nutrientes disueltos y su alta velocidad de crecimiento para la generación de biomasa. Generalmente, las microalgas son organismos fotoautótrofos que utilizan para su crecimiento carbono inorgánico (CO_2 y HCO_3^-) y nutrientes (nitrógeno y fósforo principalmente), obteniendo la energía necesaria de la luz mediante el proceso conocido como fotosíntesis. Las microalgas generan materia orgánica principalmente en forma de proteínas, lípidos, carbohidratos, hidrocarburos, pigmentos y otras moléculas pequeñas.

Los cultivos de microalgas permiten no sólo la eliminación de nutrientes de las aguas residuales, sino también otras ventajas como son la captación de CO_2 y la recuperación de nutrientes del agua en forma de biomasa que posee un alto valor añadido (Cai et al., 2013).

En el Capítulo 2 se describe el estado del arte de la utilización de microalgas para la recuperación de nutrientes de las aguas residuales que ha sido el objeto principal de esta tesis doctoral.

2 CULTIVOS DE MICROALGAS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

2.1 Las aguas residuales como sustrato para el cultivo de microalgas

Las microalgas son microorganismos que presentan una alta resistencia a los contaminantes orgánicos y metales pesados presentes en las aguas residuales. Las microalgas han sido cultivadas con éxito utilizando aguas residuales de diferentes orígenes: domésticas, industriales, agrícolas, lixiviados, etc. La posibilidad de reutilizar un recurso hídrico como las aguas residuales como medio de cultivo para el crecimiento de microalgas es una solución medioambiental muy interesante que contribuye a reducir el estrés hídrico (Subhadra & Edwards, 2011).

La tecnología basada en los cultivos de microalgas ofrece una gran oportunidad para la aplicación del concepto de Economía Circular en el sector de las aguas residuales dado que permite la recuperación de recursos que éstas contienen (agua, nutrientes y energía). La Figura 1.9 muestra un esquema de la implementación del modelo de Economía Circular en el tratamiento de aguas residuales mediante los cultivos de microalgas para el cumplimiento de los siguientes objetivos:

- **La eliminación de contaminantes de las aguas residuales:** la tecnología de cultivos de microalgas puede aplicarse en distintas fases del tratamiento de aguas residuales de una EDAR, tanto al tratamiento primario como al secundario o terciario (González-Camejo et al., 2021). Esto se debe a la facilidad que tienen las microalgas de asimilar los distintos contaminantes presentes en el agua tales como la materia orgánica (sólo las microalgas heterótrofas y mixotróficas), nutrientes (N, P, Mg, K, etc.), metales pesados, fármacos, pesticidas, etc. La principal aplicación de los cultivos de microalgas en depuración de aguas es como tratamiento terciario para conseguir reducir significativamente las concentraciones de N y P en el efluente, dado que las microalgas tienen una alta capacidad de asimilación de estos macronutrientes que son utilizados para el crecimiento celular.

- **El aprovechamiento de las aguas residuales como medio de cultivo:** los cultivos de microalgas necesitan grandes caudales de agua rica en nutrientes para desarrollarse. El aprovechamiento del agua residual como sustrato permite reducir notablemente los costes de los cultivos de microalgas. Además, el agua tratada mediante los cultivos de microalgas posee una alta capacidad de reutilización para diferentes fines.
- **La fijación de CO₂:** las microalgas poseen una alta capacidad de asimilación del C inorgánico disuelto en el agua durante el proceso de fotosíntesis. La fijación del CO₂ atmosférico contribuye de manera importante a la reducción de la huella de carbono de las EDAR. Además, es posible derivar corrientes de gases de combustión (p.ej. gases de motores de cogeneración) hasta los cultivos de microalgas, aportando estas corrientes una fuente de C adicional para las microalgas, logrando así reducir la generación de gases de efecto invernadero vertidos a la atmósfera que producen las EDAR.
- **La obtención de una biomasa con alto valor:** dada la composición de la biomasa algal que generan los cultivos de microalgas (carbohidratos, lípidos y proteínas, principalmente), ésta resulta ser un producto de alto valor que permite la generación de subproductos interesantes. Dentro de las aplicaciones de la biomasa algal se encuentran la generación de biocombustibles (biodiesel, bioetanol, biogás, biohidrógeno, etc.), biofertilizantes y productos utilizados en la industria cosmética (carotenoides, pigmentos, etc.).

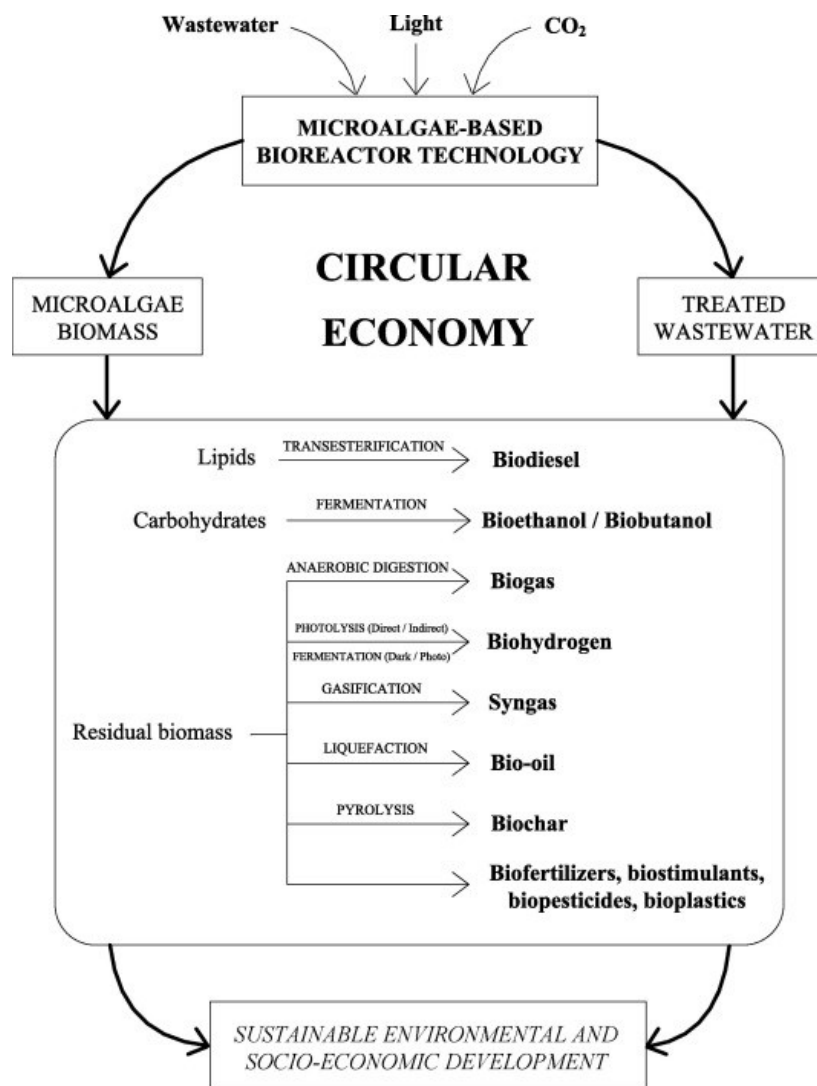


Figura 1.9. Implementación del modelo de Economía Circular en el tratamiento de aguas residuales mediante los cultivos de microalgas (Díaz et al., 2022).

Como se ha comentado, los cultivos de microalgas requieren grandes volúmenes de reactor debido a la baja concentración de sólidos a los que trabajan, normalmente con valores de sólidos suspendidos volátiles entre los 300 y los 1.000 mg·L⁻¹. El uso de las aguas residuales como sustrato para el cultivo de microalgas, en vez del uso de agua fresca, es una alternativa muy interesante que se encuentra alineada con el concepto de Economía Circular. En el ámbito de la producción de biocombustibles, algunos autores como Subhadra & Edwards (2011) han estudiado la huella hídrica asociada a cultivos de microalgas para aplicaciones a gran escala como la producción de biocombustibles,

remarcando la importancia del uso de agua no potable para que el proceso sea sostenible tanto desde el punto de vista económico como medioambiental. Yang et al. (2011) también estimaron que el uso de aguas residuales como medio de cultivo para la producción de biocombustibles permitía el ahorro de hasta el 90% de agua que requiere el proceso de cultivo.

Las microalgas poseen una alta capacidad de asimilación de componentes disueltos en el agua, en particular de N y P, dado que éstos son los dos macronutrientes esenciales para desarrollar su crecimiento. Las tasas de asimilación de nutrientes por parte de las microalgas se encuentran íntimamente relacionadas con su crecimiento, de manera que la ausencia de uno de los principales nutrientes (N y/o P) puede detener por completo o reducir significativamente el crecimiento celular. Por ello, para asegurar un crecimiento y una eliminación de nutrientes óptimos por parte de los cultivos de microalgas, es necesario que el agua utilizada como sustrato tenga unos valores de **ratio molar N:P** cercanos al valor óptimo, el cual viene representado por la fórmula molecular de las microalgas ($C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$), es decir, un ratio de 16:1 según la composición elemental media propuesta por Oswald (1988). Según esta composición elemental de las microalgas, un ratio molar N:P en el sustrato de 5:1 supone una limitación de nitrógeno para el crecimiento de las microalgas, mientras que un ratio molar N:P superior a 30:1 supone una limitación de fósforo (Larsdotter, 2006). Este ratio N:P óptimo es específico para cada especie de microalga, y normalmente se encuentra comprendido entre un rango de valores concretos. Por ejemplo, Arbib et al. (2013) evaluaron las tasas de eliminación de nutrientes en un cultivo formado por *Scenedesmus obliquus* bajo diferentes ratios N:P del medio de cultivo y concluyeron que el ratio N:P óptimo se encontraba entre 9:1 y 13:1. Diversos autores han reportado la habilidad de varias especies de microalgas para adaptar su composición molecular al ratio N:P existente en el medio de cultivo (Hall, 2009; Klausmeier et al., 2004), lo que les confiere una gran adaptabilidad a variaciones en la composición del agua residual influente y una mayor competitividad frente a otras especies.

La Tabla 1.1 muestra un resumen bibliográfico de trabajos en los que se ha utilizado agua residual real para el cultivo de microalgas y su composición de nutrientes. En esta tabla no se han incluido trabajos donde se ha utilizado agua residual sintética.

Tabla 1.1. Características de nutrientes de diversos tipos de agua residual real utilizadas para los cultivos de microalgas

Tipo de agua residual	Especie de microalgas	Escala	Concentración N _T (mg·L ⁻¹)	Concentración P _T (mg·L ⁻¹)	Ratio N/P	Referencia
Agua residual urbana (aguas negras)	<i>Chlorella</i> sp.	Laboratorio	35,5	4,9	16,0	Dang et al. (2023)
Agua residual urbana	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Laboratorio	95,9	7,0	30,3	Bhatnagar et al. (2010)
Efluente de AnMBR	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Laboratorio	67,9	4,6	32,7	Pachés et al. (2020)
Efluente de secundario	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Piloto	34,9	3,6	21,5	Ruiz et al. (2013)
Efluente de secundario	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Laboratorio	27,4	2,3	26,4	Wu et al. (2017)
Efluente de secundario	<i>Chlorella Vulgaris Neochloris Oleoabundans</i>	Laboratorio	66,9	26,0	5,7	Almomani & Örmeci (2016)
Agua residual urbana	<i>Scenedesmus obliquus Chlorella sorokiniana</i>	Laboratorio	52,6	8,5	13,7	Gupta et al. (2016)
Agua residual urbana	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Piloto	64,0 (TKN)	6,9	20,5	Kong et al. (2010)
Efluente de EDAR	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Piloto	14,3 (TKN)	1,2	26,4	Kong et al. (2010)
Efluente digestión anaerobia	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Piloto	128,6 (TKN)	120,6	2,4	Kong et al. (2010)

Por lo general, las aguas residuales siempre presentan una concentración de **macronutrientes (N y P)** superior a la que necesitan las microalgas para su crecimiento. Las aguas residuales también ofrecen a los cultivos de microalgas unas concentraciones suficientes de los **micronutrientes** esenciales que permite su crecimiento, tales como el calcio, potasio, magnesio, silicio, zinc, hierro, etc. (Mohsenpour et al., 2021).

Las microalgas también son capaces de asimilar otros contaminantes presentes en el agua tales como la materia orgánica (mediante metabolismo heterotrófico o mixotrófico), Mg, K, S, metales pesados, contaminantes emergentes (plaguicidas, fármacos, etc.), entre otros (Chai et al., 2021).

Las aguas residuales, dada su composición, resultan ser una corriente de agua muy interesante para su uso como medio de cultivo de microalgas, especialmente las aguas residuales con alto contenido en nutrientes (p.ej. efluente de la digestión anaerobia, sobrenadante de la deshidratación, aguas industriales, purines, lixiviados, etc.).

Las **aguas residuales urbanas** han sido ampliamente estudiadas como una fuente de nutrientes viable para el cultivo de microalgas. Aunque la concentración de nutrientes de las aguas residuales urbanas depende de la fase del proceso de tratamiento en la que se encuentre (agua residual sin tratar; efluente del tratamiento primario o efluente del tratamiento secundario), los cultivos de microalgas han mostrado una gran capacidad de asimilación del N disuelto (principalmente NH_4^+ , con pequeñas cantidades de NO_3^- y NO_2^-) y del P disuelto (básicamente PO_4^{3-}) tanto en experimentos en *batch* como en reactores con alimentación en continuo. No obstante, las concentraciones de biomasa que se obtienen con este tipo de aguas son limitadas (máximo de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) dado los valores limitados de nutrientes que éstas ofrecen: $20\text{-}40 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3\text{-}10 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ (Barbera et al., 2018). En particular, el uso de **aguas residuales urbanas sin tratar** como cultivo de microalgas ha sido empleado en diferentes trabajos de investigación, sobre todo a escala laboratorio. Este tipo de agua residual sin ningún tipo de tratamiento presenta generalmente una elevada concentración de sólidos suspendidos totales (SST), lo que afecta negativamente a la disponibilidad de luz y reduce la capacidad fotosintética de las microalgas (Guldhe et al., 2017). El **efluente del tratamiento primario** de una EDAR convencional también ha sido utilizado para el crecimiento de cultivos de microalgas, el cual ofrece un contenido de SST inferior al agua residual sin tratar debido al proceso

previo de sedimentación que ha sufrido. No obstante, el alto contenido de materia orgánica que todavía contiene el efluente del tratamiento primario puede provocar la proliferación de bacterias y el establecimiento de una fuerte competencia con las microalgas por el sustrato disponible (Guldhe et al., 2017). El **efluente del tratamiento secundario** de una EDAR convencional resulta ser más interesante que el efluente del tratamiento primario, puesto que se reduce el efecto de proliferación de bacterias al reducir mucho la materia orgánica disuelta disponible. No obstante, la baja cantidad de N y P que normalmente presentan los efluentes del tratamiento secundario limita el crecimiento de las microalgas (Gao et al., 2019).

Por otro lado, corrientes de aguas residuales urbanas con altas concentraciones de nutrientes como el **sobrenadante de la digestión anaerobia o de la deshidratación del fango** han sido utilizadas también para el cultivo de microalgas. Las mayores concentraciones de nutrientes de estas corrientes permiten alcanzar un mayor crecimiento de microalgas en los cultivos y unas mayores tasas de eliminación de nutrientes (Barbera et al., 2018; Wang et al., 2010a). No obstante, las altas concentraciones de NH_4^+ y otros componentes como urea, ácidos orgánicos, fenoles, pesticidas y metales pesados que pueden contener estos sobrenadantes pueden llegar a inhibir el proceso de crecimiento de las microalgas (Guldhe et al., 2017). Un método para contrarrestar estos efectos es llevar a cabo la dilución de los sobrenadantes previo al cultivo de microalgas (Acién-Fernández et al., 2016; Sepúlveda et al., 2015).

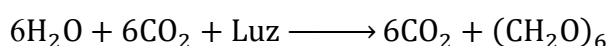
En los últimos años se ha estudiado la viabilidad de utilizar el **efluente de sistemas AnMBR** como sustrato para el cultivo de microalgas y para el tratamiento de esta corriente de agua residual (de Freitas et al., 2023; Pachés et al., 2020; Ruiz-Martínez et al., 2012; Yang et al., 2022). El efluente de un sistema AnMBR presenta un alto contenido de nutrientes (mayor que el efluente de un tratamiento secundario) en forma de NH_4^+ y PO_4^{3-} . Además, se trata de un agua libre de sólidos y con bajo contenido de materia orgánica (Giménez et al., 2014), lo que potencia el metabolismo fotoautótrofo de las microalgas y limita el crecimiento de las bacterias heterótrofas en los cultivos. La combinación de los sistemas AnMBR con los sistemas de cultivos de microalgas para el post-tratamiento del efluente, y una recirculación de la biomasa algal al sistema AnMBR para la producción de biogás, es una solución muy interesante como alternativa a los sistemas de tratamiento convencionales de las aguas residuales y se encuentra alineada

con el concepto de Economía Circular. Ruiz-Martínez et al. (2012) y Pachés et al. (2020) estudiaron a escala laboratorio la idoneidad del uso del efluente de un sistema AnMBR para el tratamiento de aguas residuales urbanas como medio de cultivo de microalgas, obteniendo resultados muy interesantes de eliminación de nutrientes y producción de biomasa. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en esta tesis se aborda el estudio a escala piloto de la aplicación de un cultivo de microalgas para el tratamiento del efluente de un sistema AnMBR que trata agua residual urbana real.

Las microalgas también pueden cultivarse con otro tipo de aguas residuales como las agrícolas o las industriales, pero su aplicación ha sido más escasa debido a los inconvenientes que presentan estas corrientes de agua. Las **aguas residuales agrícolas** presentan gran variabilidad en la concentración de nutrientes, pudiendo llegar a inhibir el crecimiento de los cultivos de microalgas por limitación de un nutriente esencial (Chiu et al., 2014). Por otro lado, las **aguas residuales industriales** pueden presentar carencias significativas de nutrientes y, además, pueden contener altas concentraciones de metales pesados u otros componentes tóxicos que inhiben el crecimiento de las microalgas (Tüzün et al., 2005).

2.2 El metabolismo de las microalgas

La capacidad de asimilación de nutrientes y otros contaminantes presentes en el agua por parte de las microalgas (y las cianobacterias) se basa en su metabolismo fotosintético. La **fotosíntesis** (Reacción 1.3) consiste en el conjunto de rutas metabólicas anabólicas mediante el cual los organismos fotoautótrofos sintetizan materia orgánica empleando la luz como fuente de energía para reducir el C inorgánico (CO_2 principalmente, y también HCO_3^-) produciendo como subproducto O_2 según la siguiente ecuación (Kong et al., 2021):



Reacción 1.3. Reacción de fotosíntesis.

La fotosíntesis se realiza en unos orgánulos específicos de las microalgas llamados cloroplastos (ver Figura 1.10).

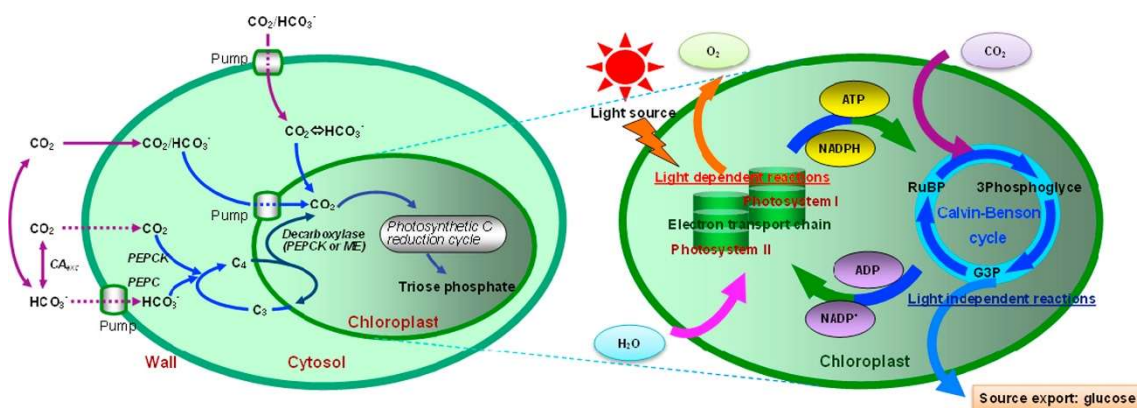


Figura 1.10. Esquema de reacciones asociadas a la fotosíntesis desarrolladas en los cloroplastos de las microalgas (Zhao & Su, 2014).

Desde el punto de vista fisiológico, el proceso de fotosíntesis se desarrolla en dos fases conocidas como “Fase lumínica”, en la que las reacciones sólo ocurren en presencia de luz, y la “Fase oscura”, que corresponde a las reacciones de fijación de C y que no requieren la presencia de luz, produciéndose tanto en presencia de luz como en oscuridad (ver Figura 1.11).

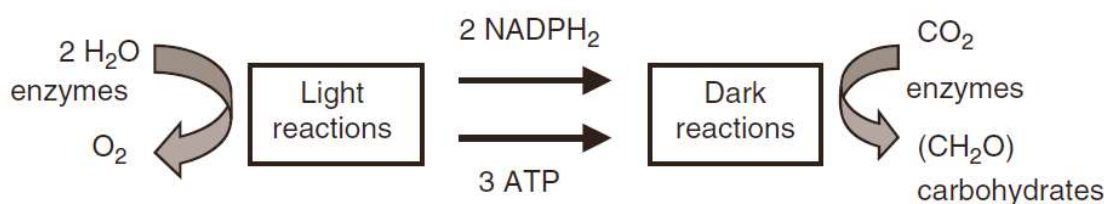


Figura 1.11. Esquema de las reacciones fotosíntesis correspondientes a la “Fase lumínica” y “Fase oscura” (Hall & Rao, 1994).

En la “Fase lumínica”, las reacciones tienen lugar en las membranas tilacoides y son catalizadas por los centros de reacción fotosintéticos (PSI y PSII). En esta fase, la energía procedente de los fotones que forman la luz es convertida en energía química

proporcionando el reductor bioquímico (NADPH_2) y un compuesto de alta energía (ATP). Para llevar a cabo este proceso, en el fotosistema II (PSII) los electrones son separados de las moléculas de H_2O y almacenados internamente como poder reductor, liberando O_2 en el proceso. A continuación, en el fotosistema I (PSI), la energía procedente de la luz es utilizada para reducir la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato de NADP a NADPH_2 y para formar adenosín trifosfato (ATP). De esta manera, las microalgas obtienen la energía y el poder reductor necesarios para poder fijar el C inorgánico y sintetizar biomasa (Reynolds, 2006).

En la “Fase oscura”, que se desarrolla en los estromas, el NADPH_2 y el ATP generados en la “Fase lumínica” son utilizados para reducir el CO_2 a carbohidratos mediante la reacción de carboxilación, en lo que se conoce como el Ciclo de Calvin (o también Ciclo de Benson-Calvin). La carboxilación está catalizada por la enzima central del ciclo de Calvin, la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO). Se denomina carboxilasa/oxigenasa porque, además de permitir la fijación de una molécula de CO_2 (carboxilación) a la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), esta enzima posee también la capacidad de catalizar la fijación de O_2 sobre la RuBP. En el caso en el cual la enzima RuBisCO reduce el O_2 en vez del CO_2 , se produce el efecto de **fotorrespiración**, que reduce el crecimiento de las microalgas dado que en este proceso la energía y el C fijado son desperdiciados. La fotorrespiración se potencia cuando la presión parcial de O_2 aumenta (Reynolds, 2006). Se amplía un poco más la información sobre la fotorrespiración en los Apartados 2.3.5 y 2.3.6.

Las microalgas en presencia de luz desarrollan principalmente un **metabolismo fotoautótrofo**, obteniendo energía de la luz a través del proceso de fotosíntesis antes descrito. No obstante, se conoce que algunos géneros de microalgas (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., etc.) pueden desarrollar también un **metabolismo heterótrofo**, obteniendo la energía y el C necesarios para el crecimiento de los compuestos orgánicos presentes en el agua (materia orgánica, glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, etc.). Mediante cultivos de microalgas heterótrofos, es posible superar la dependencia de la luz para el crecimiento de las microalgas, consiguiendo mayores productividades de biomasa y de lípidos, haciendo que este tipo de cultivos resulten muy interesantes para la obtención de biocombustibles (Ghaffar et al., 2023). El **metabolismo mixótrofo** resulta de la combinación del fotoautótrofo y heterótrofo, dependiendo de la disponibilidad de

sustratos y de las condiciones de luz (Ferreira et al., 2019). Marquez et al. (1993) reportaron que la especie *Spirulina platensis* desarrollaba los procesos de fotosíntesis y crecimiento heterótrofo de manera simultánea e independiente, y que la presencia de una fuente de C orgánico era lo que podía hacerle cambiar de tipo de metabolismo. A pesar de ello, las microalgas tienden a desarrollar un metabolismo de crecimiento fotoautótrofo debido a que éste es más rápido que el crecimiento heterótrofo (Babaei et al., 2016).

2.3 Parámetros que afectan al crecimiento de los cultivos de microalgas

Los principales parámetros que afectan al crecimiento de las microalgas son generalmente comunes para todas las especies microalgas. No obstante, existen unos valores mínimos, óptimos y máximos de cada parámetro que son específicos para cada especie de microalga. Por esta razón, los resultados obtenidos en experimentación sobre el rendimiento de los cultivos de microalgas (tasas de eliminación de nutrientes, productividades de biomasa, etc.) para un sistema de cultivo determinado (fotobiorreactores cerrados, *raceways*, etc.) suelen variar según la especie de microalgas considerada.

Son muchos los autores que han evaluado el efecto de los diferentes parámetros sobre el crecimiento de las microalgas (Binnal & Babu, 2017; Cabello et al., 2015; Gao et al., 2022; Ruiz-Martínez et al., 2015b; Ruiz-Martínez et al., 2016). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo a escala y en condiciones de laboratorio, es decir, en condiciones controladas y con volúmenes de reactor pequeños, operando normalmente en *batch*. Son pocos los estudios que evalúan los efectos de los diferentes parámetros en el comportamiento y el crecimiento de los cultivos de microalgas a escala piloto y en condiciones *outdoor*.

A continuación se describen los efectos de los principales parámetros a considerar en los cultivos de microalgas.

2.3.1 Luz

Los organismos fotosintéticos, como las microalgas y las cianobacterias, emplean solamente la fracción del espectro de la luz solar fotosintéticamente activa, es decir, aquella que se corresponde con longitudes de onda entre 350 y 700 nm. Esta fracción fotosintéticamente activa (PAR) supone un 43% de la radiación total emitida por el Sol (Janssen et al., 2003). En el caso de los cultivos de microalgas, se han registrado eficiencias de conversión luz-biomasa entre 1 y 4% en sistemas abiertos, siendo aún mayores estas eficiencias en fotobiorreactores cerrados (Stephens et al., 2010).

El crecimiento de las microalgas es directamente proporcional a la intensidad de luz recibida siempre que ésta se sitúe por debajo de un cierto valor máximo, lo que se conoce como **fotolimitación**. Los valores de intensidad de luz óptimos para la mayoría de las especies de microalgas se encuentran en el rango de 26-400 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Maltsev et al., 2021). A partir de este valor óptimo de intensidad de luz para el crecimiento, los sistemas fotosintéticos receptores (cloroplastos) que poseen las microalgas se ven dañados, y la fotosíntesis que desarrollan empieza a verse inhibida, de manera que parte de la energía lumínica recibida es disipada en forma de calor. A este fenómeno se le denomina **fotoinhibición** (Grobbelaar, 2010). Para la mayoría de las especies de microalgas, la fotoinhibición aparece a intensidades de luz por encima de 1.000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, aunque hay algunas especies más sensibles que ya muestran fotoinhibición a intensidades de 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Chowdury et al., 2020). La relación entre la capacidad fotosintética de las microalgas y la intensidad de luz se muestra en la Figura 1.12 (Béchet et al., 2013).

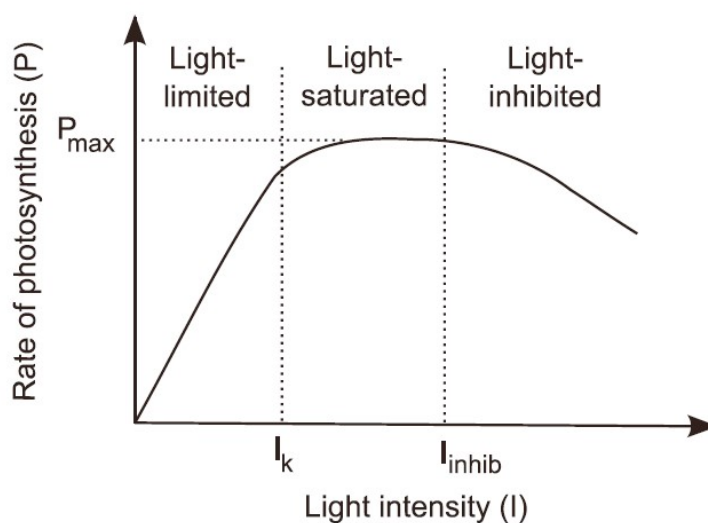


Figura 1.12. Relación entre la tasa de fotosíntesis (P) y la intensidad de luz (I) incidente, donde I_k es la intensidad de luz a partir de la cual se alcanza la saturación e I_{inhib} es la intensidad de luz a partir de la cual empieza la fotoinhibición (Béchet et al., 2013).

La disponibilidad de luz es el parámetro más importante que gobierna el crecimiento y la productividad de los cultivos de microalgas en condiciones *outdoor* (Chowdury et al., 2020). En este tipo de cultivos en los que se utiliza la luz solar como fuente principal de energía, las microalgas están expuestas a continuos cambios en la intensidad de luz debido a la variación diaria y estacional de la irradiación solar. Para mitigar los cambios bruscos en los niveles de luz, las microalgas poseen la capacidad de **fotoaclimatación**, que permite a las células adaptarse a dichos cambio y optimizar el uso de la luz disponible en cada momento (Dubinsky & Stambler, 2009).

Un factor que también es muy importante en los cultivos de microalgas, y que se encuentra relacionado con la luz, es la **distancia de penetración de la luz**, que depende de la intensidad de luz incidente en la superficie del fotobiorreactor, de la dispersión del material que conforma la superficie y de la atenuación de la luz a través del cultivo. La **atenuación de la luz** depende de varios factores como son la concentración de microalgas, la distancia del paso de luz (*light path*) del reactor, el tamaño de las células y el tipo de los pigmentos intracelulares (Wang et al., 2014a). Este efecto de atenuación provoca una distribución heterogénea de la luz a través del cultivo, generando un gradiente de intensidad de luz en la dirección de penetración. De este modo, las células

de microalgas que se encuentran muy cerca de la superficie iluminada del fotobiorreactor están expuestas a una mayor intensidad de luz, pudiendo causar incluso fotoinhibición, mientras que las células de microalgas situadas en la parte más profunda del fotobiorreactor apenas reciben luz, habiendo un volumen de microalgas que se encuentra siempre en completa oscuridad si el *light path* es suficientemente amplio (efecto sombra o *self-shading*) (Park & Lee, 2001). Debido a este efecto de atenuación de la luz en fotobiorreactores, se definen tres regiones claramente diferenciadas (Figura 1.13):

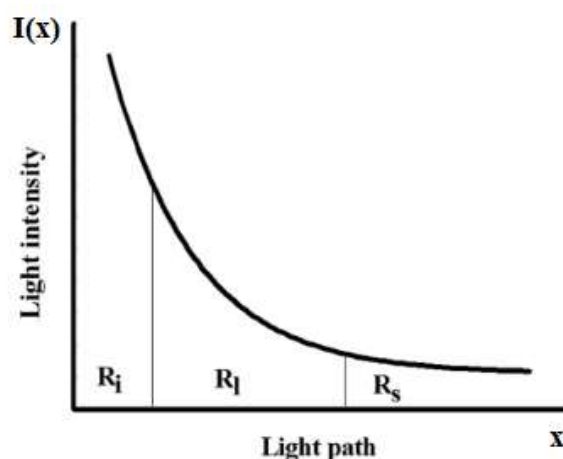


Figura 1.13. Curva típica de atenuación de la luz en fotobiorreactores para el cultivo de microalgas, donde se pueden definir tres regiones: R_i es la región que sufre fotoinhibición, R_l es la región con limitación de luz, y R_s es la región de estancamiento del crecimiento (Wang et al., 2014a).

El efecto de atenuación de la luz resulta ser el principal factor que limita la escalabilidad de los fotobiorreactores para una producción sostenible de microalgas (Anye Cho et al., 2021). Para reducir el efecto de la atenuación de la luz en los cultivos de microalgas *outdoor*, es importante que exista un buen mezclado del fotobiorreactor, de manera que el cultivo pase rápidamente de las zonas de luz a las zonas oscuras (ciclos de luz-oscuridad), lo que permite aumentar el aprovechamiento de la luz y, por tanto, la productividad del cultivo (Kubelka et al., 2018). También es posible reducir el efecto de atenuación de la luz mediante la aplicación de **iluminación artificial** (Su et al., 2012). Además, el uso de iluminación artificial contribuye a la producción continua de los cultivos de microalgas *outdoor*, aunque supone un mayor coste económico y energético.

Otro factor relacionado con la disponibilidad de luz que es necesario tener en cuenta en los cultivos de microalgas es el **volumen en zona oscura** (González-Camejo et al., 2021). El volumen en zona oscura representa aquellas zonas de los sistemas de cultivo en los que, por alguna razón, no reciben intensidad de luz (p.ej. los tanques de membranas en los fotobiorreactores de membrana). Según Richmond (2000), la proporción óptima entre el volumen de la zona iluminada de un reactor (V_I) y el volumen en zona oscura (V_O) es un V_I/V_O de 85:15, es decir, un 85% del volumen del reactor correspondería a zona fótica o iluminada mientras que un 15% de las microalgas estarían en zona de total oscuridad (sin crecimiento fotoautótrofo).

2.3.2 Temperatura

Otro factor importante que afecta al comportamiento de los cultivos de microalgas es la temperatura (Ras et al., 2013), debido a que ésta influye en las reacciones bioquímicas que tienen lugar durante el proceso de fotosíntesis. Además, dada la naturaleza de este factor ambiental (fundamentalmente generado por la radiación recibida), en sistemas *outdoor* su efecto se encuentra muy relacionado con el régimen de irradiación de luz solar incidente.

Al igual que ocurre con la luz, las microalgas son capaces de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, fuera del cual el crecimiento se ve inhibido y observándose una temperatura óptima en la cual el crecimiento es máximo. Esta temperatura óptima es específica para cada especie de microalga, estando ésta normalmente comprendida en el rango de 20-30°C (Enamala et al., 2018). Por ejemplo, Butterwick et al. (2005) estudiaron el comportamiento de la especie de microalga *Asterionella formosa* y los resultados mostraron que esta especie podía crecer entre un rango de temperaturas mínima y máxima de 5 y 30°C, respectivamente, presentando una temperatura óptima de 20°C (ver Figura 1.14).

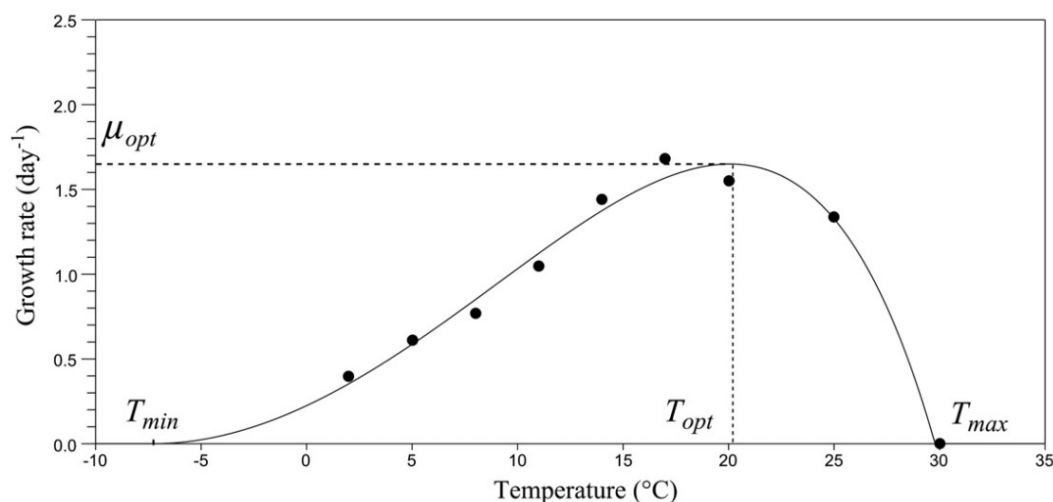


Figura 1.14. Modelo de temperatura calibrado para *A. Formosa* (Butterwick et al., 2005).

Existen muchas especies de microalgas que pueden soportar hasta 15°C por debajo de su temperatura óptima, reduciendo mucho su crecimiento, valor a partir del cual una disminución de unos grados menos de temperatura produce la muerte celular (Venkata Subhash et al., 2014). Por dicha razón, los climas fríos resultan ser un mal escenario para desarrollar cultivos de microalgas *outdoor*.

También existen otros estudios que reportan cómo algunas especies de **microalgas termo-tolerantes** son capaces de soportar temperaturas elevadas de hasta 40°C (Chowdury et al., 2020). Bernard (1995) estudió el efecto de la temperatura sobre la especie de microalga *Dunaliella tertiolecta*, observando que su temperatura óptima era de 32,6°C. Huang et al. (2012) también observaron que era viable la operación de cultivos de microalgas *outdoor* del género *Desmodesmus* sp. en climas tropicales con temperaturas de hasta 46°C e irradiaciones de luz de hasta 2.600 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

En sistemas de cultivo abiertos (p.ej. *algal ponds*), un incremento de temperatura se ve compensado con la evaporación del agua, regulándose de este modo la temperatura máxima que se alcanza en el medio de cultivo. En cambio, en la operación de sistemas cerrados o fotobiorreactores en zonas cálidas, algunas veces es necesario considerar un método de refrigeración adicional para controlar los incrementos bruscos de temperatura

diaria y estacional que puede afectar negativamente a la biomasa algal (González-Camejo et al., 2022).

Algunas especies microalgas tienen la capacidad de **aclimatación a temperaturas** fuera de sus valores óptimos (Ras et al., 2013; Yadav & Sen, 2017), de forma similar a lo que ocurre con la luz. Dos de los géneros de microalgas más utilizadas para el tratamiento de aguas residuales y producción de biomasa como *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. han demostrado ser capaces de adaptarse a temperaturas dentro del rango 5-35°C (Zhu et al., 2013).

La temperatura no sólo afecta al metabolismo de las microalgas, sino que también afectan a otros parámetros que influyen en su crecimiento como son la solubilidad del CO₂ en el medio o el equilibrio químico de las especies y del pH (Solimeno et al., 2015).

2.3.3 pH

El pH también es un factor muy relevante que afecta no sólo al crecimiento de las microalgas, sino también a la solubilidad de las especies de nutrientes inorgánicos y del CO₂ en el medio de cultivo (Qiu et al., 2017).

El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual del pH en el medio de cultivo debido a la acumulación de iones hidroxilo (OH⁻), lo que puede promover la eliminación de N en forma de amoníaco por *stripping* a la atmósfera y la eliminación de P por precipitación de ortofosfatos a pH superiores a 9 (Muñoz & Guieysse, 2006; Ruiz-Martínez et al., 2015b). Cuando el pH es muy ácido (pH < 3) se ha constatado que el crecimiento de las microalgas se ve reducido al afectar a las enzimas del citoplasma de las células (Baker et al., 1983; Chiranjeevi, & Mohan, 2016).

Como ocurre con la luz y la temperatura, existe un rango de pH en el cual el crecimiento de las microalgas es posible, encontrándose dentro de este rango un pH óptimo que maximiza el crecimiento, y fuera del cual el crecimiento se ve inhibido (Yadav & Sen, 2017). Este rango de pH depende de la especie de microalga considerada (Moheimani, 2013) y normalmente se encuentra en valores comprendidos entre 6 y 8 (Rai & Gupta, 2017; Zhu, 2015). Por ejemplo, Sánchez et al. (2008) obtuvieron un valor de pH óptimo

comprendido en el rango 7,5-8,5 para la producción de cultivos en continuo de *Scenedesmus almeriensis* bajo condiciones de laboratorio (ver Figura 1.15).

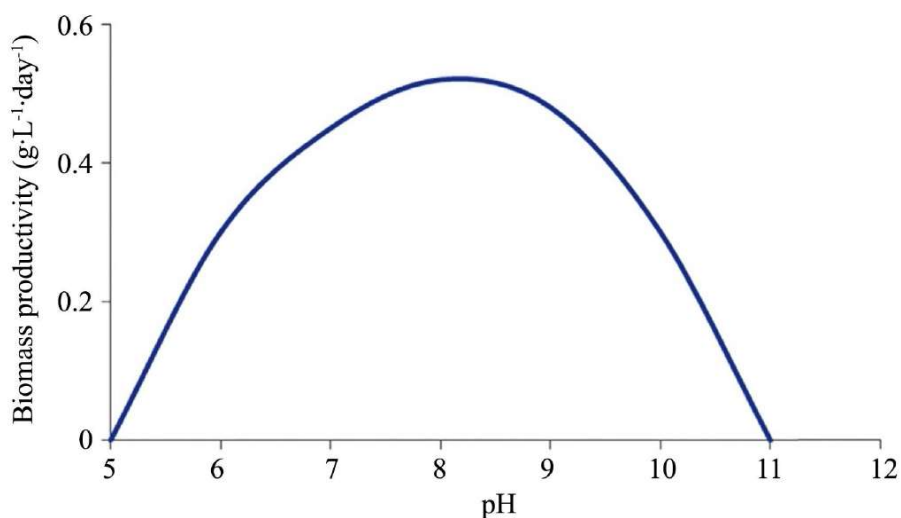


Figura 1.15. Influencia del pH en la productividad de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* (Chowdury et al. (2020): adaptado de Sánchez et al. (2008)).

En el caso de los cultivos *outdoor*, la gran actividad fotosintética provocada por las altas irradiaciones solares del mediodía puede incrementar mucho el pH, incluso por encima de 9, lo cual puede suponer grandes problemas para los cultivos de microalgas (Acién-Fernández et al., 2016). Para mitigar estos incrementos bruscos de pH en los sistemas de cultivo de microalgas debido a la actividad fotosintética, generalmente se suele aplicar un sistema de control de pH mediante la adición de aire atmosférico (0,03-0,06% de CO₂) o de una corriente enriquecida de CO₂ a través del sistema de aireación (Chowdury et al., 2020). En la aplicación de cultivos de microalgas a gran escala hay que tener en cuenta que la adición de una corriente rica en CO₂ puede suponer un sobre coste elevado.

CAPÍTULO 1

2.3.4 Nutrientes

Como se ha mencionado en el Apartado 2.2, los cultivos de microalgas con los que se ha llevado a cabo la experimentación en planta piloto en esta tesis doctoral desarrollan un metabolismo principalmente fotoautótrofo.

En los cultivos fotoautótrofos, los **principales nutrientes minerales disueltos** que las microalgas toman del medio y que necesitan para desarrollar su crecimiento son el carbono, el nitrógeno y el fósforo. El N y P son considerados los **macronutrientes esenciales** en los cultivos de microalgas, de modo que la ausencia o limitación de uno de ellos puede inhibir o reducir drásticamente el crecimiento de las microalgas (Zhu et al., 2013).

Por otro lado, existen otros **micronutrientes esenciales** que las microalgas necesitan para su crecimiento, tales como el calcio, azufre, potasio, magnesio, silicio, zinc, hierro, etc. Todos estos micronutrientes son aportados en cantidades suficientes en las aguas residuales cuando éstas se utilizan como medio para el cultivo de microalgas (Mohsenpour et al., 2021).

A continuación se describe el efecto de los principales nutrientes disueltos en el crecimiento de las microalgas.

2.3.4.1 Nitrógeno

El N es un nutriente esencial para el crecimiento de las microalgas ya que es el elemento básico para la síntesis de proteínas, vitaminas, pigmentos fotosintéticos y ácidos nucleicos (Richmond, 2004). El contenido de N en las microalgas varía generalmente entre un 3-12% en peso seco (Reynolds, 2006).

Las microalgas son capaces de asimilar N tanto de fuentes inorgánicas (p.ej. amonio NH_4^+ , nitrato NO_3^- , nitrito NO_2^-), como de fuentes orgánicas (p.ej. aminoácidos, urea, purines y nucleósidos) (Cai et al., 2013; Ross et al., 2018), siendo especialmente importantes el NH_4^+ y el NO_3^- . Diversos estudios han demostrado que la presencia de NO_2^- en ciertas concentraciones puede inhibir el crecimiento de microalgas (Abe et al.,

2002; González-Camejo et al., 2020). Diversos autores han observado que altas concentraciones de NH_4^+ también pueden inhibir el crecimiento de las microalgas (Razzak et al., 2017).

El NH_4^+ es la forma de N preferida por las microalgas ya que no precisa de ninguna reacción de reducción para ser asimilado por las células (ver Figura 1.16), lo que supone menos gasto de energía para las microalgas. A continuación, en orden de preferencia se encontraría el NO_2^- y luego el NO_3^- (Cai et al., 2013). Algunos estudios han mostrado que el consumo de NO_3^- no sucede mientras exista algo de NH_4^+ en el medio (Maestrini et al., 1986; Ross et al., 2018). Las aguas residuales urbanas contienen concentraciones de NH_4^+ aptas para el crecimiento de las microalgas, y superiores a las concentraciones de NO_2^- y NO_3^- , por lo que se trata de un sustrato idóneo para los cultivos de microalgas. Por lo general, el crecimiento observado de las microalgas sigue la cinética de Michaelis-Menten, es decir, es proporcional a la concentración de N en el medio hasta que ésta alcanza un valor en el que el crecimiento se ve ralentizado o inhibido (Wang et al., 2014a). Se ha podido comprobar en varias especies de microalgas que concentraciones muy altas de NH_4^+ pueden llegar a ser tóxicas y limitar el proceso de crecimiento celular de las microalgas (Collos & Berges, 2004). Park et al. (2010) observaron que valores de NH_4^+ por encima de $200 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ podían resultar tóxicos debido a la formación de amoníaco. Por otro lado, Ruiz-Martínez et al. (2014) observaron que valores de NH_4^+ por debajo de $10\text{-}13 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ limitaban el crecimiento de las microalgas.

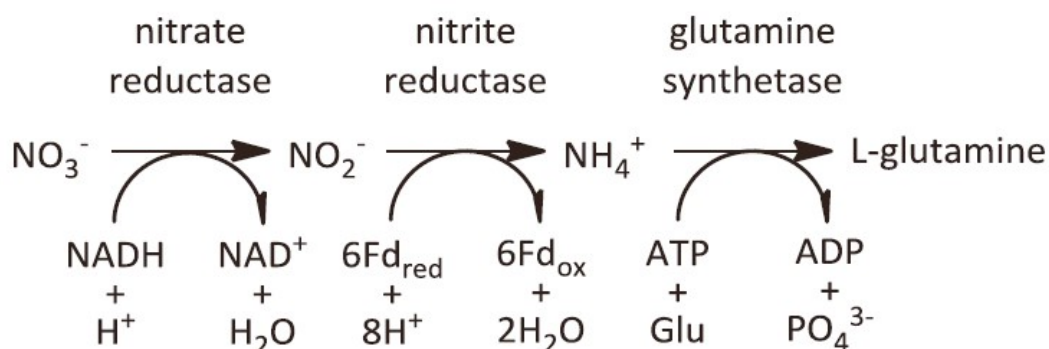


Figura 1.16. Esquema simplificado de la asimilación del nitrógeno inorgánico (Cai et al., 2013).

En cuanto a la composición de las microalgas, se ha observado que un déficit de N en el medio de cultivo microalgas promueve una síntesis de lípidos y carbohidratos preferentemente (Yang et al., 2011), lo cual es muy interesante para los cultivos con el fin de producción de biocombustibles. El déficit de N también ha sido relacionado con una disminución en el contenido de clorofila-a (Goiris et al., 2015) y con una reducción en la tasa de eliminación de P (Beuckels et al., 2015).

2.3.4.2 Fósforo

El P es otro nutriente esencial en el metabolismo de las microalgas ya que se utiliza en varias actividades del metabolismo celular tales como la transferencia de energía (ATP), la síntesis de ácidos nucleicos y ácidos desoxirribonucleicos (ADN) (Richmond, 2004).

Las microalgas toman preferentemente el P en forma de ortofosfatos (PO_4^{3-}), que es la principal especie de P presente en las aguas residuales. Generalmente, el contenido de P en las microalgas suele estar entre el 1 y 1,2% en peso seco (Reynolds, 2006). No obstante, en condiciones de abundancia de P existe un fenómeno llamado *luxury uptake* mediante el cual las microalgas pueden absorber del medio mucha más cantidad de P del que necesitan para el crecimiento y almacenarlo intracelularmente en forma de polifosfatos (Poly-P) para poder ser consumidos en condiciones de limitación de P en el medio. Gracias al almacenamiento interno de P generado por el *luxury uptake*, es posible observar cultivos de microalgas en los que el contenido de P alcanza hasta el 3% en peso seco (Powell et al., 2009). La relación entre el crecimiento de las microalgas y el contenido intracelular de P fue estudiada por Ruiz-Martínez et al. (2014), quienes observaron que el crecimiento celular de las microalgas en condiciones de ausencia de P puede ser soportado gracias al contenido intracelular de polifosfatos. Asimismo, estos autores también observaron un consumo de N asociado al crecimiento de microalgas en condiciones de ausencia de P, pero esta velocidad de consumo de N se va reduciendo conforme lo hacen las reservas de polifosfatos.

La cantidad de P presente en el medio y la cantidad de Poly-P almacenado intracelularmente afecta a los contenidos de lípidos y carbohidratos de las microalgas (Chowdury et al., 2020). En el ámbito de la eliminación de nutrientes de las aguas

residuales, se ha observado que la eliminación de N no depende de la disponibilidad de P en el medio (Beuckels et al., 2015).

2.3.4.3 Relación N y P

Las microalgas tienen la capacidad de ajustar su contenido de N y P en la biomasa dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en el medio, de manera que el contenido de N y P en la biomasa es menor cuando menor es el contenido de N y P en el medio, y viceversa. Así, diversos autores han concluido que la relación N:P en el medio de cultivo influye en la toma de nutrientes por parte de las microalgas, de modo que cuanto más próxima esté a la composición N:P de la biomasa, mayor productividad y toma de nutrientes tendrá lugar (Beuckels et al., 2015).

La relación N:P óptima en el medio de cultivo para el crecimiento de las microalgas depende de la especie de microalga considerada. Silva et al. (2015) estudiaron diferentes concentraciones molares N:P en el crecimiento de diversas especies de microalgas, y concluyeron que una relación 8:1 favorecía a la especie *Chlorella vulgaris*, mientras que una relación 16:1 favorecía a la especie *Pseudokirchneriella subcapitata*. Beuckels et al. (2015) también estudiaron las relaciones N:P del medio en cultivos de microalgas, y concluyeron que valores de N:P altos favorecen el crecimiento del género *Chlorella* sp., mientras que valores bajos de N:P favorecen al género *Scenedesmus* sp.

2.3.4.4 Carbono

En el metabolismo fotoautótrofo, las microalgas precisan de una fuente inorgánica de C para su crecimiento. De acuerdo con la fórmula molecular $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ para la biomasa algal propuesta por Oswald (1988), se constata que alrededor del 50% de la biomasa está compuesta por C, siendo este el componente principal que necesitan las microalgas para su crecimiento. Las microalgas pueden emplear como fuente de C el CO_2 gas y los iones de bicarbonato (HCO_3^-) disueltos en el medio de cultivo. La alta capacidad de bio-fijación de C por parte de las microalgas ha generado el interés y la aplicación de cultivos de microalgas para la descarbonización de corrientes de gases de combustión,

con el objetivo de reducir la huella de carbono de los procesos industriales (Ma et al., 2022). Esta aplicación de los cultivos de microalgas se explica con más detalle en el Apartado 2.4.2.

Dado que las aguas residuales normalmente están limitadas en C inorgánico, en los cultivos de microalgas que utilizan aguas residuales como medio de cultivo es necesario la adición de una fuente exógena de CO₂ para conseguir altas productividades de biomasa (Mohsenpour et al., 2021). No obstante, una concentración de CO₂ superior a 5% en el medio de cultivo puede inhibir el crecimiento (Zhao & Su, 2014). Bilanovic et al. (2009) también reportaron que la tasa de consumo de C del medio por parte de las microalgas se ve influenciada por la fuente de N presente en el medio de cultivo.

El género de microalgas *Chlorella* sp. está identificado como uno de los que más C puede asimilar. Fan et al. (2008) reportaron una tasa de consumo de 3,55 g CO₂·L⁻¹·d⁻¹ para la especie *Chlorella vulgaris* en un experimento de laboratorio utilizando un fotobiorreactor de membranas (MPBR).

2.3.5 Agitación

La agitación es un parámetro de operación de los sistemas de cultivo que también afecta al crecimiento de las microalgas. La agitación reduce los gradientes que se generan en los sistemas de cultivo de microalgas, esto es, gradientes de nutrientes, luz, temperatura y pH, consiguiendo una mezcla del cultivo más homogénea. Además, mediante la agitación se consigue evitar la sedimentación de las microalgas y la adherencia de éstas a las paredes del reactor (Yadav & Sen, 2017), lo cual podría generar un impacto negativo en el cultivo. La agitación promueve también la distribución de los gases a lo largo sistema de cultivo, y optimiza el régimen de luz en todo el cultivo sometiendo a las algas a ciclos rápidos de mezclado transfiriendo continuamente las microalgas de la zona iluminada a la zona oscura, lo que aumenta la capacidad de fotosíntesis del cultivo (Brindley et al., 2004). Una alta concentración de O₂ disuelto, combinada con las altas irradiaciones de luz solar que pueden darse en los cultivos *outdoor*, afectan negativamente a las células de las microalgas pudiendo provocar el efecto de fotorrespiración (Kunjapur & Eldridge,

2010). La agitación permite reducir y homogeneizar la concentración del oxígeno disuelto en el sistema de cultivo reduciendo el efecto negativo que produce sobre las microalgas.

La agitación en los cultivos de microalgas normalmente se lleva a cabo por: (1) aireación utilizando aire o una corriente rica en CO₂, (2) por bombeo generando una recirculación del cultivo de las microalgas dentro del sistema de cultivo, o (3) por agitación mecánica (p.ej. las palas rotatorias de un sistema de cultivo tipo *raceway*). A veces, se combinan diferentes métodos de agitación en un mismo cultivo (Chowdury et al., 2020). Sin embargo, no todas las especies de microalgas toleran una fuerte agitación que provea al sistema de cultivo de un buen mezclado, ya que algunas especies son sensibles al estrés hidrodinámico generado (Wang et al., 2012). Para Gudín & Chaumont (1991), la fragilidad de las células de las microalgas frente al estrés hidrodinámico es uno de los factores clave a estudiar en la producción a gran escala de cultivos en fotobiorreactores cerrados.

2.3.6 Otros factores que afectan al crecimiento de las microalgas

El nivel de **oxígeno disuelto** en los cultivos de microalgas debe estar controlado, ya que altas concentraciones pueden inhibir el crecimiento de las microalgas, sobre todo en sistemas de cultivo *outdoor* y con deficiencia de CO₂ en el medio (Wang et al., 2012). Concentraciones de O₂ disuelto por encima de la saturación a temperatura y presión estándar pueden afectar negativamente a los cultivos de microalgas (Park et al., 2011), que es el fenómeno conocido como fotorrespiración. Para minimizar zonas con altas concentraciones de O₂ disuelto en los sistemas de cultivo de microalgas, el sistema de agitación juega un papel muy importante (Suh & Lee, 2003).

La **salinidad** es otro factor que puede afectar al crecimiento de los cultivos de microalgas (Asulabh et al., 2012), sobre todo en los sistemas de cultivo abiertos *outdoor* y con altas temperaturas, en los que la fuerte evaporación induce a un incremento de la salinidad en el medio (Chowdury et al., 2020). Venkata Mohan & Devi (2014) estudiaron el estrés provocado por la salinidad en cultivos de microalgas y observaron un impacto positivo en la producción de lípidos inducido por este tipo de estrés.

El **modo y parámetros de operación** de los cultivos de microalgas también afecta a su crecimiento y la productividad. Por lo general, los cultivos de microalgas operados en *batch* tienden a generar cultivos que necesitan bajas concentraciones de nutrientes y obtienen bajas productividades en comparación con los cultivos operados en continuo (Mehrabadi et al., 2015). También se ha observado que los cultivos alimentados en continuo o semi-continuo generan una mayor cantidad de lípidos que los cultivos operados en *batch* (Wang et al., 2016). El tiempo de retención hidráulico (TRH) y el tiempo de retención celular (TRC) son parámetros de operación cruciales para el diseño de fotobiorreactores y para maximizar el crecimiento de las microalgas y la productividad (Behera et al., 2018).

2.4 Aplicaciones de los cultivos de microalgas

2.4.1 Eliminación de nutrientes y otros contaminantes presentes en las aguas residuales

Los cultivos de microalgas se han posicionado como una tecnología interesante para la **eliminación biológica de contaminantes** como alternativa a los tratamientos terciarios llevados a cabo en las EDAR convencionales. Esto se debe a la alta capacidad de asimilación de nutrientes y otros contaminantes disueltos presentes en las aguas residuales (N y P, metales pesados, fármacos, etc.). Se ha demostrado que los cultivos de microalgas destinados a la eliminación de nutrientes consumen hasta un 24% menos de energía que los tratamientos convencionales (Romero-Villegas et al., 2018). La Tabla 1.2 recoge una comparativa entre los tratamientos convencionales de aguas residuales y el tratamiento utilizando cultivos de microalgas.

Tabla 1.2. Comparativa entre el tratamiento de aguas residuales mediante cultivos de microalgas y los tratamientos convencionales.

Cultivos de microalgas	Tratamientos convencionales
Un enfoque económico y sostenible	Un enfoque poco económico y obsoleto
Muy eficiente para eliminación de nutrientes, materia orgánica y metales pesados	Poco eficiente en eliminación de materia orgánica y metales pesados
Operación muy sencilla	Operación compleja
Los distintos tipos de aguas residuales (urbanas, industriales, agrícolas, etc.) pueden ser tratadas con el mismo método	Cada tipo de corriente de agua residual necesita un tratamiento específico
Menor consumo energético	Mayor consumo energético
La fotosíntesis permite la oxigenación del agua para la eliminación de contaminantes (consorcios microalgas-bacterias)	Requiere oxigenación mecánica para la eliminación de contaminantes
No se requieren aditivos químicos para la eliminación de N y P	Se requieren aditivos químicos para la eliminación de P
Bajo coste de operación y mantenimiento	Alto coste de operación y mantenimiento
El proceso permite la captura de CO ₂ (mitigación de GEI)	El proceso provoca la generación de GEI
Compatible con los sistemas de tratamiento convencionales	El sistema de tratamiento es un proceso específico
Las eliminaciones de contaminantes (N y P, metales pesados, fármacos, etc.) pueden llevarse a cabo en una sola etapa de cultivo	La eliminación de los distintos contaminantes se lleva a cabo en diferentes etapas
Baja generación de fango	Alta generación de fango
El sistema está asociado a bajos ratios F/M	El sistema está asociado a altos ratios F/M

La principal aplicación de los cultivos de microalgas como fitorremediación es la **eliminación de nitrógeno y fósforo** de las aguas residuales. Ya se ha comentado en el Apartado 2.1 las diferentes corrientes de agua residual que pueden utilizarse como medio de cultivo, así como las concentraciones de N y P que contienen y que las microalgas absorben para su crecimiento. Existen multitud de estudios en la bibliografía que reportan datos de eliminación de nitrógeno y fósforo por parte de cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales (Cai et al., 2013; Díaz et al., 2022; Wan Mahari et al., 2022). En dichos estudios puede constatar que los porcentajes de eliminación de nutrientes en casi todos los casos son >80% tanto para el nitrógeno como para el fósforo, alcanzando en algunos casos hasta el 100% de eliminación de los nutrientes solubles presentes en el agua residual, consiguiendo un efluente libre de nutrientes que permitiría cumplir con la Directiva 98/15/CE en N_T y P_T para vertidos a medio natural, cuyos límites más restrictivos (para >100.000 H-e) están fijados en $10 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. En la Tabla 1.3 se muestran diferentes estudios de cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales con los valores de eliminación de N y P y productividades de biomasa obtenidos.

Tabla 1.3. Eliminación de nutrientes y productividad de biomasa obtenidos por cultivos de microalgas a partir de aguas residuales.

Tipo de agua residual	Especie de microalgas	Escala	Eliminación N _T (%)	Eliminación P _T (%)	Productividad (mg·L ⁻¹)	Referencia
Efluente de EDAR	<i>Chlorella</i> sp.	Laboratorio	89,1	80,9	-	Li et al. (2011)
Efluente de secundario	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Laboratorio	73,7	100	350	Wu et al. (2017)
Efluente digestión anaerobia	<i>Chlorella</i> sp.	Laboratorio	95	85	100	Ledda et al. (2015)
Efluente de AnMBR	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Laboratorio	97	100	48	Pachés et al. (2020)
Efluente de AnMBR	<i>Chlorella vulgaris</i>	Laboratorio	85	100	42	Pachés et al. (2020)
Agua residual urbana	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Laboratorio	87	80	108	Menna et al. (2015)
Efluente de secundario	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Piloto	74-82	70-90	87-136	Arbib et al. (2017)
Efluente de secundario	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Piloto	86-95	69-94	18-21	Arbib et al. (2013)
Efluente de secundario	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Piloto	62-77	51-63	5-8	Arbib et al. (2013)
Digestato	Consorcio algas	Piloto	96 (NH ₄ -N)	71 (PO ₄ -P)	27	Mantovani et al. (2020)
Agua residual de granja porcina	<i>Desmodesmus</i> sp.	Laboratorio	79,2	65,3	27-59	Chen et al. (2020)

Tabla 1.3 (Continúa). Eliminación de nutrientes y productividad de biomasa obtenidos por cultivos de microalgas a partir de aguas residuales.

Tipo de agua residual	Especie de microalga	Escala	Eliminación N _T (%)	Eliminación P _T (%)	Productividad (mg·L ⁻¹)	Referencia
Agua residual de la industria farmacéutica	<i>Tetraselmis indica</i>	Laboratorio	67 (NO ₃ -N)	71 (PO ₄ -P)	47-61	Amit et al. (2020)
Efluente digestión anaerobia	Consorcio microalgas-bacterias	Laboratorio	90,2	88,6	-	Ma et al. (2014)
Agua residual urbana	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Piloto	95 (NH ₄ -N)	81	-	Dahmani et al. (2016)
Efluente de secundario	Consorcio microalgas-bacterias	Laboratorio	95	94	-	Zamalloa et al. (2013)
Agua residual urbana	<i>Scenedesmus</i> sp.	Laboratorio	80 (NH ₄ -N) 86 (NO ₃ -N)	66	-	Baldev et al. (2021)
Agua residual de destilería (POME)	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Laboratorio	98,6	96	409	Cheah et al. (2020)
Efluente digestión anaerobia	<i>Tetraselmis suecica</i>	Laboratorio	96	72	59,8	Herold et al. (2021)
Agua residual de destilería (POME)	<i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp.	Laboratorio	86	72 (PO ₄ -P)	20,4 (<i>Scenedesmus</i> sp.) 440,3 (<i>Chlorella</i> sp.)	Hariz et al. (2019)
Agua residual urbana	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Laboratorio	86,9	68,2	-	Gupta et al. (2016)
Agua residual urbana	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Laboratorio	98,5	98	-	Gupta et al. (2016)
Agua residual de granja lechera (pre-tratada)	Consorcio algas	Laboratorio	100 (NH ₄ -N) 99,4 (NO ₃ -N)	98,8	376	Hena et al. (2015)

También es conocida la capacidad de las microalgas para eliminar otros contaminantes presentes en las aguas residuales como los **metales pesados, contaminantes emergentes o microcontaminantes**, que son sustancias que no podrían ser eliminadas únicamente aplicando tratamientos convencionales (Goswami et al., 2022a). Richards & Mullins (2013) llevaron a cabo diferentes experimentos con cultivos de microalgas concluyendo que éstos son capaces de asimilar metales pesados (hierro, aluminio, magnesio, bario, etc.) de lixiviados, llegando a eficiencias de eliminación de hasta el 95%. Singh et al. (2021) también obtuvieron resultados prometedores a través de ensayos con cultivos de *Scenedesmus incrassatulus*, observando que esta especie de microalga era capaz de eliminar de manera eficiente el cromo (52,54-96%), plomo (75-100%), cobre (45%-98%), mercurio (77-97%) y el cadmio (2-93%) de sistemas acuáticos contaminados. Por otro lado, Zhang et al. (2020) estudiaron la capacidad de las microalgas para la eliminación de compuestos fenólicos tanto a bajas concentraciones como a altas concentraciones donde el crecimiento de las microalgas se ve inhibido. En cuanto a la eliminación de microcontaminantes como los fármacos, Hom-diaz et al. (2017) utilizaron cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas negras y observaron eliminaciones de nutrientes >80% y eliminaciones de entre 30-80% de los fármacos activos presentes.

Un nuevo enfoque relacionado con el concepto de Economía Circular en el tratamiento de aguas residuales mediante cultivos de microalgas es la combinación de esta tecnología con poblaciones de bacterias, en lo que se conoce como **consorcios de microalgas-bacterias** (Gonçalves et al., 2017). Mediante esta combinación de microorganismos es posible eliminar simultáneamente tanto la materia orgánica como los nutrientes del agua residual en un único proceso, pudiendo equipararse al tratamiento secundario y terciario de una EDAR convencional. En los consorcios de microalgas-bacterias existen unas interacciones de simbiosis entre los dos tipos de microorganismos, de manera que, en presencia de luz, las microalgas generan O₂ que es utilizado por las bacterias para oxidar la materia orgánica, las cuales a su vez generan CO₂ que es utilizado por las microalgas como fuente de C (ver Figura 1.17). La aportación de O₂ por parte de las microalgas como alternativa a la agitación mecánica que se aplica en el reactor de fangos activados para el tratamiento secundario en una EDAR convencional podría suponer un ahorro energético importante. En los consorcios de microalgas-bacterias para el tratamiento de aguas con alta concentración de NH₄⁺ (p.ej. efluente de la digestión anaerobia) las bacterias

autótrofas también contribuyen a la eliminación de NH_4^+ , generando NO_2^- , y NO_3^- , los cuales pueden ser absorbidos por las microalgas como sustrato en ausencia de NH_4^+ (Cai et al., 2013).

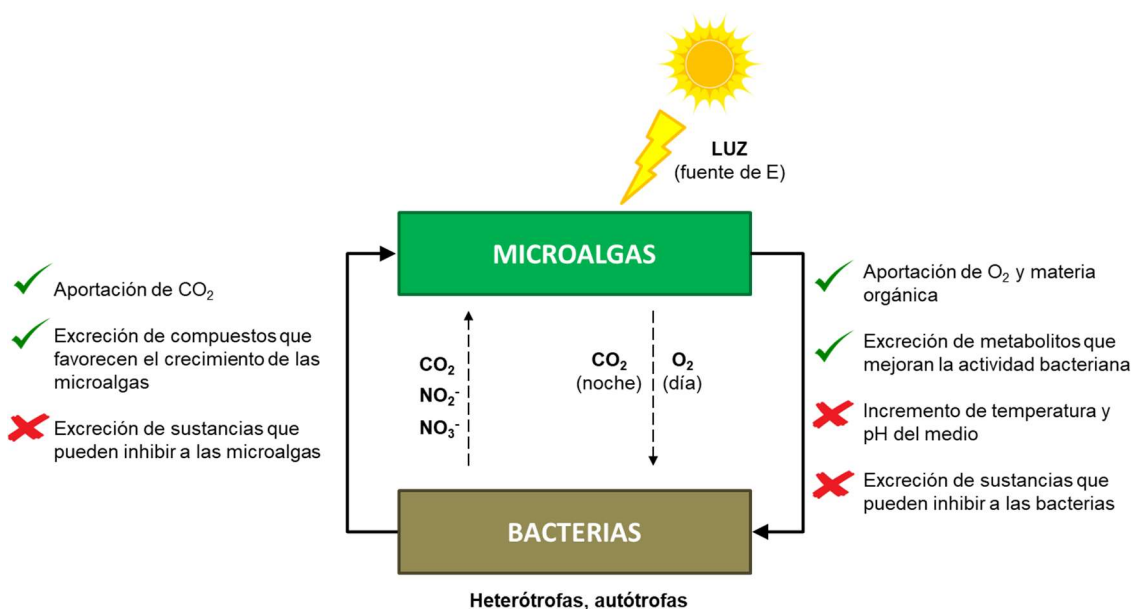


Figura 1.17. Interacciones en los consorcios de microalgas-bacterias (adaptado de Gonçalves et al. (2017) y Oruganti et al. (2022)).

Existen diversos estudios que han utilizado consorcios de microalgas-bacterias para el tratamiento de aguas residuales de diferentes orígenes para la eliminación simultánea de DBO, DQO, N y P, consiguiendo altas eficiencias de eliminación trabajando en sistemas abiertos tipo *raceway* (Hernández et al., 2016; Kim et al., 2014; Park & Craggs, 2011). También existen trabajos que demuestran la alta capacidad de este tipo de consorcios para la eliminación de contaminantes emergentes de las aguas residuales (López-Serna et al., 2019; Zambrano et al., 2021).

Por otro lado, las relaciones entre microalgas y bacterias no siempre son interacciones de simbiosis, sino que también pueden ejercer interacciones de competencia. Por ejemplo, las microalgas compiten con las bacterias autótrofas amonioxidasantes (AOB) por el NH_4^+ como sustrato. Dicha competencia es importante considerarla para optimizar el tratamiento de aguas microalgas mediante consorcios de microalgas-bacterias (González-Camejo et al., 2022). También se sabe que existen algunos componentes segregados por

las bacterias que pueden inhibir el crecimiento de las microalgas, y viceversa (Pratt et al., 1944; Wang et al., 2010b). También es importante remarcar algunos inconvenientes asociados a los consorcios respecto a los cultivos de microalgas, como son la imposibilidad de recuperar en forma de energía la materia orgánica presente en el agua residual (mediante biogás) y el efecto sombra que genera la biomasa bacteriana, reduciendo la disponibilidad de luz para las microalgas (Wágner et al., 2018).

2.4.2 Fijación de CO₂

También es posible utilizar los cultivos de microalgas para la fijación del CO₂ procedente de corrientes de gases de combustión que produce la actividad industrial. El CO₂ es un gas emitido a la atmósfera por las actividades humanas e industriales, y es la principal causa del efecto invernadero que sufre el planeta y que provoca el cambio climático a escala global. Actualmente, se considera que las especies vegetales (plantas, árboles, cultivos, etc.) contribuyen a la mitigación del 3-6% de las emisiones globales de CO₂. La eficiencia de las microalgas para la fijación de C es entre 10 y 50 veces superior que la que presentan las especies vegetales debido a las altas tasas de crecimiento de las microalgas (Cheah et al., 2015).

En los últimos años se han llevado a cabo estudios que presentan de forma muy completa las tasas de consumo de CO₂ de diversas especies de microalgas, siendo el género *Chlorella* sp. uno de los que más CO₂ es capaz de asimilar (Ho et al., 2011; Kong et al., 2021). La Figura 1.18 muestra valores de tasas de fijación de CO₂ de algunas especies de microalgas que se utilizan comúnmente en cultivos alimentados con agua residual:

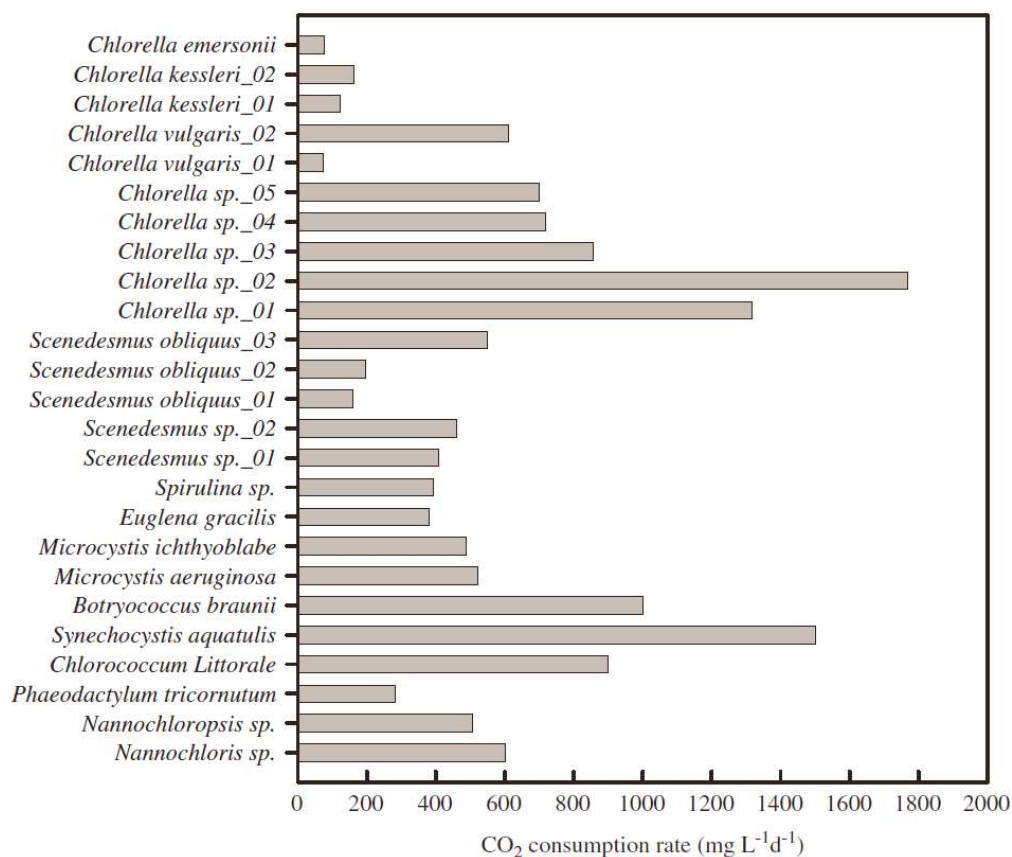


Figura 1.18. Tasas de fijación de CO₂ de diversos cultivos de microalgas evaluados en batch (Ho et al., 2011).

Existen otros estudios que han combinado el uso de agua residual como medio de cultivo de microalgas y las **corrientes de gases de combustión** con el fin de analizar el potencial de fijación de CO₂ y la revalorización de la biomasa algal producida como bio-combustibles (Li et al., 2015; Nayak et al., 2016; Praveenkumar et al., 2014). Los gases de combustión contienen entre 6-15% de CO₂ frente al 0,03-0,06% que se encuentra disponible en el ambiente atmosférico (Cheah et al., 2015). Esta técnica de fijación de CO₂ procedente de gases de combustión puede ayudar significativamente a la reducción de la huella de carbono que producen las EDAR, además de hacer uso de una fuente de carbono con coste cero. Normalmente, en los fotobiorreactores cerrados para el cultivo de microalgas es necesaria la adición de CO₂ externo para estabilizar el pH en torno al óptimo, por lo que el uso de gases de combustión como fuente de CO₂ permite reducir los costes de operación de los cultivos de microalgas.

Los gases de combustión procedentes de la quema de combustibles fósiles generalmente contienen concentraciones de SO_x y NO_x . Estos gases se ha demostrado que pueden afectar negativamente al crecimiento de las microalgas reduciendo la producción de biomasa (Negoro et al., 1991; Yadav & Sen, 2017). Otro factor que puede afectar negativamente a los cultivos de microalgas expuestos a gases de combustión es la temperatura a la que se encuentran los gases generados, de modo que sólo resisten aquellas especies tolerantes a altas temperaturas.

2.4.3 Generación de biomasa: biocombustibles, fertilizantes y productos de alto valor

Otro de los aspectos por el que los cultivos de microalgas resultan muy interesantes es que permiten obtener, como producto final, una biomasa que puede ser revalorizada con diferentes objetivos (medioambientales, comerciales o energéticos). La Figura 1.19 muestra una relación de posibles aplicaciones de la biomasa algal:

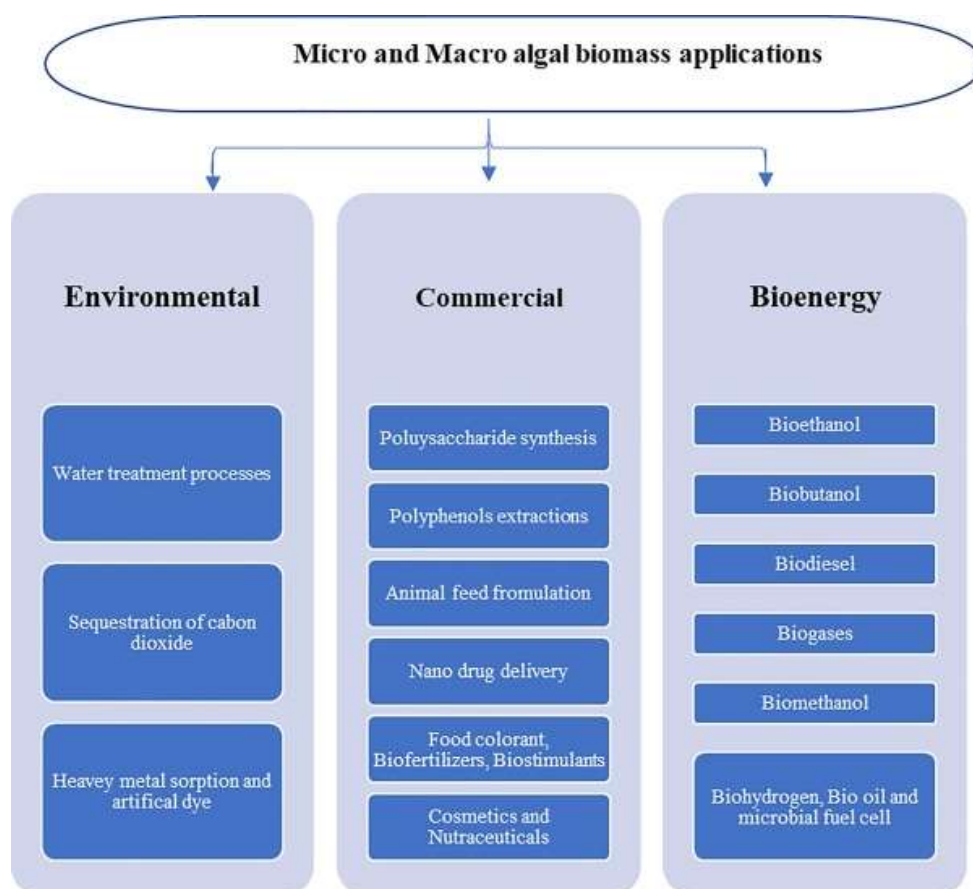


Figura 1.19. Aplicaciones de la biomasa algal (Thanigaivel et al., 2022).

La Figura 1.20 muestra también las aplicaciones de la biomasa algal, así como el tipo de transformaciones (químicos, bioquímicos y termoquímicos) para su obtención:

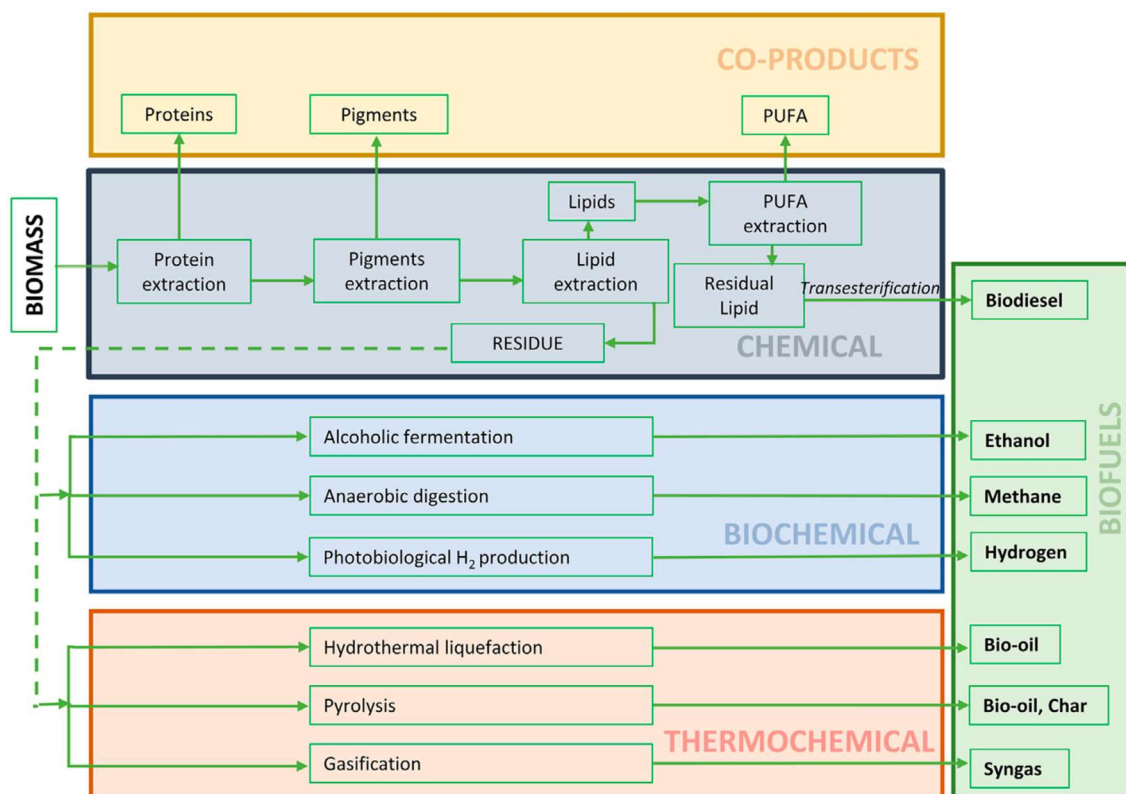


Figura 1.20. Aplicaciones y tipo de transformaciones de la biomasa algal (Nagi et al., 2021)

Entre las principales aplicaciones de la biomasa algal en la línea de la Economía Circular se encuentra la **recuperación de energía** de las aguas residuales. El contenido de energía en las aguas residuales es entre 2-4 veces superior a la energía usada en las EDAR para su tratamiento (Lu & Ren, 2016). En los últimos años, las microalgas han sido consideradas como una fuente renovable de energía ya que su biomasa puede ser reconvertida en energía (biocombustibles, biogás, H₂, etc.).

Una de las aplicaciones más importantes es la conversión de la biomasa algal en **biocombustibles** de tercera generación, tanto en biodiesel y bioetanol, que pueden llegar a reemplazar a otras fuentes como el diésel y la gasolina, respectivamente. Se ha demostrado que la generación de biocombustibles a partir de las microalgas puede ser una producción sostenible a gran escala (Hossain et al., 2019). No obstante, esta generación

a gran escala de biocombustibles a partir de microalgas requiere grandes cantidades de agua y nutrientes. El enfoque ideal sería la combinación de los cultivos de microalgas para la generación de biocombustibles junto con procesos de eliminación de nutrientes de las aguas residuales, lo que permite reutilizar de nuevo el agua dándole un segundo uso, y los nutrientes disueltos son utilizados por las microalgas como sustrato para su crecimiento. Un enfoque aún más sostenible consiste en utilizar, además, corrientes de gases de combustión como aporte de carbono inorgánico para el crecimiento de las microalgas (Yadav & Sen, 2017) (ver Figura 1.21).

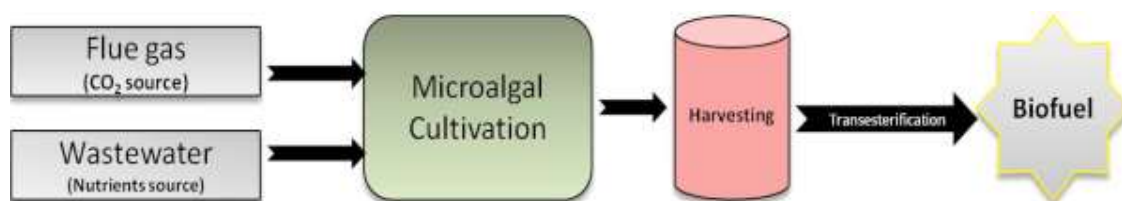


Figura 1.21: Esquema de cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, recuperación de nutrientes y biofijación de CO₂ procedente de gases de combustión, y generación de biomasa algal para biocombustibles (Yadav & Sen, 2017).

Las microalgas están formadas básicamente por carbohidratos, lípidos y proteínas. En algunos casos, el contenido en lípidos de las microalgas es alto y estos pueden ser extraídos y transformados en **biodiesel** por transesterificación enzimática o química (Chen et al., 2015b). La generación de biodiesel a partir de los cultivos de microalgas ha generado gran interés en la industria de biocombustibles ya que presenta algunas ventajas importantes frente al uso de otras fuentes de biomasa (Díaz et al., 2022):

- Ciertas especies de microalgas no requieren agua fresca para su cultivo, pudiendo desarrollarse perfectamente en agua salada o agua residual urbana.
- Contienen más energía por unidad de peso que los cultivos agrícolas, y además presentan una mayor tasa de crecimiento.
- La biomasa algal no sólo produce biocombustibles, sino que también permite obtener otros productos de alto valor añadido (p.ej. para la industria farmacéutica o cosmética).

- Pueden ser producidos en masa durante todo el año, pudiendo conseguir un suministro continuo de aceites para producir biocombustibles.

Otra fuente de energía como el **bioetanol** también puede obtenerse a partir de los carbohidratos de la biomasa algal generada en el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante el proceso de fermentación alcohólica (Goswami et al., 2022b; Srivastava et al., 2021). Este proceso de obtención de bioetanol a partir de cultivos de microalgas presenta ventajas frente a otros procesos (p.ej. bioetanol a partir de cultivos vegetales) ya que no necesita tierra cultivable y, además, reduce el impacto negativo de fijación de CO₂ atmosférico. La composición de las especies *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*, dos de las especies de microalgas que se utilizan para el tratamiento de aguas residuales, es idónea para la producción de biocombustibles ya que poseen un gran contenido de proteínas (63% y 58% del peso seco, respectivamente) y una alta digeribilidad (Maia et al., 2020). Modificando las condiciones ambientales de los cultivos de microalgas (p.ej. limitación de nutrientes) es posible alterar la composición molecular de estas, aumentando su contenido de lípidos y carbohidratos. De este modo, estudios realizados han demostrado que bajo condiciones de limitación de nitrógeno es posible aumentar el contenido de carbohidratos de *Spirulina* sp. y *Chlorella* sp. en cultivos hasta 59% y 66%, respectivamente (Braga et al., 2018; Zhu et al., 2014).

El hidrógeno está considerado como el combustible del futuro debido a la alta conversión en energía que posee (142 kJ·g⁻¹) y a la baja contaminación del producto de la combustión que genera, que es el vapor de agua (Batista et al., 2015). Actualmente, existen dos procesos para la **producción de biohidrógeno** a través de la biomasa algal: (1) fotosintéticamente a partir de la fotólisis del agua, y (2) mediante la fermentación oscura de la biomasa algal (Kandasamy et al., 2022). Existen algunos estudios sobre la producción de biohidrógeno por fermentación oscura a partir de cultivos de microalgas que utilizan aguas residuales urbanas como sustrato (Batista et al., 2015). No obstante, el elevado coste de producción de biohidrógeno por esta vía supone un problema para su escalabilidad, haciendo que sean más viables trabajar con otros biocombustibles como el bioetanol.

El proceso de recuperación de la biomasa algal en energía que resulta más factible técnica y económicamente a gran escala es la **producción de biogás** mediante digestión anaerobia de la biomasa (Acién-Fernández et al., 2018; Park et al., 2011). Esto se debe a que a través de la digestión anaerobia es posible convertir el 65% del total de biomasa en biogás, mientras que los procesos de reconversión en biodiesel y bioetanol sólo consiguen transformar el 30% y 40% del total de biomasa, respectivamente (Vanthoor-Koopmans et al., 2013). Además, la producción de biogás a través de la digestión anaerobia de microalgas es una tecnología madura que permite su aplicación a gran escala. El biogás generado por digestión anaerobia contiene principalmente entre 50-70% de CH₄ y 30-50% de CO₂ dependiendo del sustrato utilizado y de las condiciones de operación del reactor (Wu et al., 2021), siendo el CH₄ el gas que contribuye al poder calorífico del biogás para su conversión en energía. Los estudios realizados sobre digestión anaerobia de microalgas muestran que es posible obtener hasta 200 L de metano por cada kg de biomasa algal (Acién-Fernández et al., 2018). Un inconveniente a tener en cuenta en la digestión anaerobia de los cultivos es que las células de las microalgas suelen tener un grosor de pared rígida que dificulta el proceso inicial de hidrólisis de la digestión, lo que limita significativamente la producción de metano. Sin embargo, existen algunos métodos de pretratamiento de la biomasa algal (ultrasónicos, enzimáticos, termoquímicos e hidrotermales) que ayudan a contrarrestar dicho inconveniente, aumentando la producción de metano (Kandasamy et al., 2022).

Los cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales combinados con una digestión anaerobia posterior de la biomasa algal generada para la obtención de biogás es una tecnología muy interesante que potencia la Economía Circular dentro de una EDAR. Además, si el biogás generado en la digestión anaerobia es reconducido otra vez a través del cultivo de microalgas, la capacidad de absorción de CO₂ de éstas como fuente de carbón inorgánico durante la fotosíntesis ayuda a incrementar la calidad del biogás generado (Nagarajan et al., 2019).

La biomasa algal generada en los cultivos de microalgas para la recuperación de nutrientes (N y P) de las aguas residuales puede utilizarse directamente como **biofertilizante** para la agricultura, reduciendo la dependencia de utilización de fertilizantes químicos y fomentando la Economía Circular (Santos & Pires, 2018). El **biochar** se obtiene mediante pirólisis en ausencia de aire a partir de la biomasa algal. La

aplicación de biochar como fertilizante permite prevenir la pérdida de nutrientes del suelo mediante la liberación gradual de los principales nutrientes (N y P), lo que aumenta la eficiencia de estos y aumenta la productividad de las cosechas (Mukherjee et al., 2011). Además, el biochar permite mejorar las características fisicoquímicas del suelo, aumentando el C y N residual y mejorando el pH y la conductividad eléctrica del mismo (Rizwan et al., 2018).

La composición molecular de las microalgas también ha resultado de interés para la **industria alimentaria** tanto doméstica como animal (aportación de componentes para el desarrollo de colorantes, suplementos alimenticios y nutracéuticos, alimento para la acuicultura y cría de animales, etc.). El género de microalgas *Spirulina* sp. es el más utilizado para este tipo de aplicaciones (Kandasamy et al., 2022; Rizwan et al., 2018).

Algunos de los **componentes de alto valor añadido** que generan las microalgas han atraído también el interés comercial de la industria farmacéutica, tales como el betacaroteno, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los antioxidantes, la ficocianina o la astaxantina (Pulz & Gross, 2014).

2.5 Tecnologías utilizadas para el cultivo de microalgas

Un sistema completo de cultivo de microalgas para cualquier aplicación (recuperación/eliminación de nutrientes, generación de biocombustibles, etc.) está normalmente formada por cuatro fases:

1. Pre-tratamiento del agua utilizada para el medio cultivo (si fuera necesario).
2. Sistema de cultivo para la recuperación de nutrientes y producción de biomasa.
3. Proceso de cosechado (*harvesting*) de la biomasa.
4. Transformación de la biomasa en el subproducto final deseado.

Además, cuando la aplicación principal de los cultivos de microalgas es la eliminación de nutrientes de las aguas residuales, existe otra frase intermedia entre la fase 2) y 3) que es la reutilización del efluente generado o el vertido al medio natural.

En los siguientes apartados se describen las principales tecnologías existentes para los sistemas de cultivo de microalgas (Apartado 2.5.1) y para el cosechado o *harvesting* de la biomasa algal que se genera (Apartado 2.5.2).

2.5.1 Tipos de sistemas para el cultivo de microalgas

Los cultivos de microalgas han sido ampliamente estudiados a escala laboratorio para conocer los comportamientos de las microalgas ante diferentes parámetros (luz, temperatura, pH, CO₂, carga de nutrientes, etc.) en condiciones controladas *indoor*. Muchas veces, estos cultivos a escala laboratorio también se utilizan para predecir el comportamiento que éstos tendrán en su ampliación gran escala (Benner et al., 2022). La ampliación a gran escala supone un cambio de las condiciones ambientales de los cultivos, pasando de unas condiciones controladas *indoor* a la variabilidad de luz (irradiación solar) y temperatura que ofrece las condiciones ambientales *outdoor*. Trabajando en condiciones *outdoor* también existe la posibilidad de contaminación de los cultivos de microalgas, sobre todo en los sistemas abiertos, por la introducción de parásitos y predadores (como los rotíferos o los ciliados), los cuales pueden provocar una importante reducción de la producción (Chanquia et al., 2021).

En el ámbito del tratamiento de aguas residuales mediante cultivos de microalgas, la elección del sistema de cultivo es uno de los factores clave para el éxito del proceso (González-Camejo et al., 2021). Los principales sistemas para el cultivo de microalgas en suspensión a gran escala son los fotobiorreactores cerrados y los sistemas abiertos (Arutselvan et al., 2022). Alternativamente, existen los sistemas híbridos que son aquellos sistemas que utilizan la combinación de ventajas que ofrecen los sistemas abiertos y los fotobiorreactores cerrados para aumentar la eficiencia y reducir los costes (Khor et al., 2022).

Existen otros sistemas de cultivo de microalgas que han sido menos aplicados a gran escala como son los sistemas de cultivos inmovilizados (biofilms), los fotobiorreactores flotantes, las bolsas de plástico y los fotobiorreactores de membrana. La Figura 1.22 muestra las tecnologías más comúnmente utilizadas para el cultivo de microalgas:

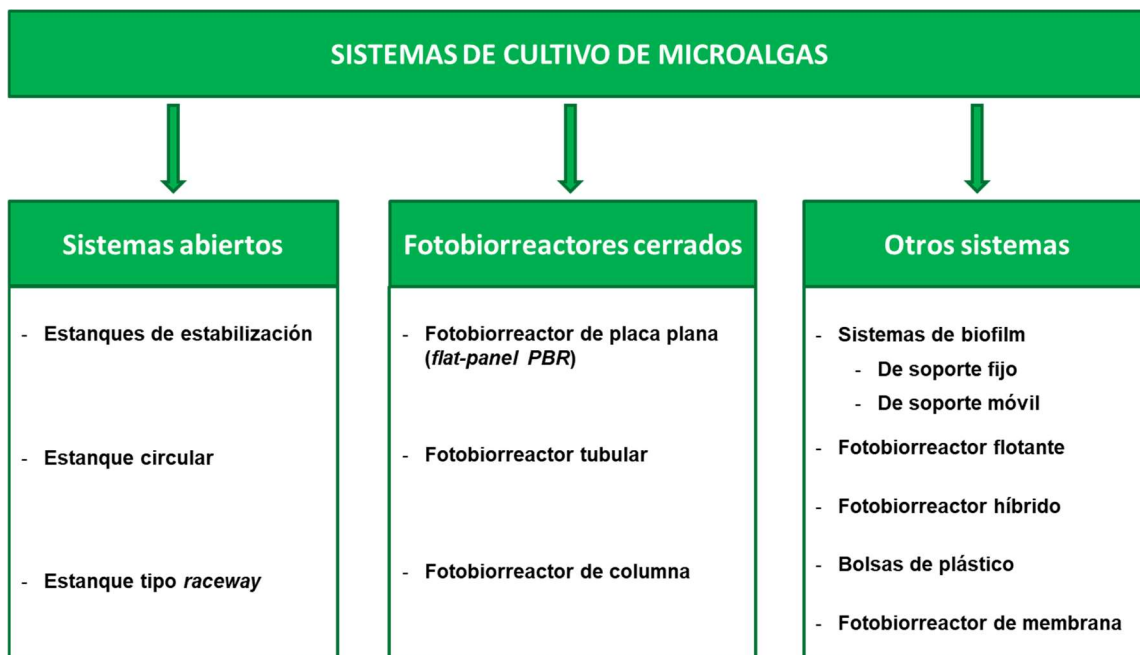


Figura 1.22. Principales tecnologías para el cultivo de microalgas
(Arutselvan et al., 2022; Khor et al., 2022).

2.5.1.1 *Sistemas abiertos (algal ponds)*

Los sistemas abiertos son los primeros sistemas que se implantaron para el cultivo de microalgas, en los cuales la superficie superior del cultivo de microalgas se encuentra en contacto con la atmósfera.

Las **ventajas** del uso de estos sistemas son los bajos costes de implantación, mantenimiento, operación y monitorización que suponen, así como la alta eficiencia de absorción del CO₂ atmosférico (Ali et al., 2022). Por estas razones, sobre todo por su bajo coste, los sistemas abiertos han sido la solución más extendida para la producción de microalgas a gran escala (Arutselvan et al., 2022; Benner et al., 2022). Por el contrario, las **desventajas** de los sistemas abiertos son las altas necesidades de superficie al operar

normalmente con altos TRC, las pérdidas de agua por evaporación (que provoca un aumento de la salinidad), la alta dependencia de los factores climáticos (luz solar y temperatura), la baja eficiencia fotosintética y el alto riesgo de contaminación a los que están expuestos (hongos, bacterias, protozoos, etc.) (Ali et al., 2022; Sung et al., 2022).

Existen diversas configuraciones de sistemas abiertos, como son los estanques de estabilización, los estanques circulares y los estanques tipo *raceway* (ver Figura 1.23):

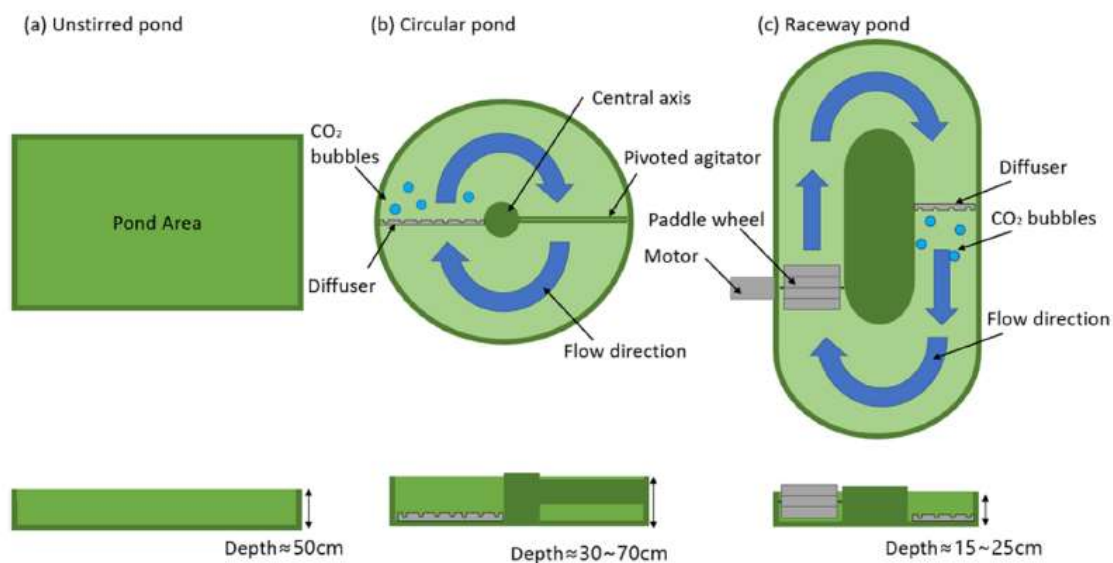


Figura 1.23. Sistemas de cultivo abiertos (*algal ponds*) (Khor et al., 2022).

Los **estanques de estabilización** son sistemas de cultivo extensivos, sin mezclado ni aireación, muy simples de operar y económicos, pero requieren mucha superficie. Antiguamente se utilizaban para la depuración de aguas en pequeñas poblaciones rurales. Se trata de sistemas en los que se generan consorcios de microalgas-bacterias debido a la alta exposición a la contaminación. En el ámbito del tratamiento de aguas, los estanques de estabilización trabajan con altos TRC, y su eficiencia de eliminación de contaminantes se encuentra muy ligada a las condiciones ambientales, pudiendo ser prácticamente nula durante los meses invernales (González-Camejo et al., 2021). Existen aplicaciones a gran escala para la producción y comercialización de biomasa que utilizan este tipo de sistemas extensivos y que trabajan con microalgas extremófilas como las del género *Dunaliella* sp. (Arutselvan et al., 2022).

Otros sistemas abiertos que mejoran el aprovechamiento de la luz solar son los estanques circulares y los tipo *raceway*, cuya diferencia principal es la configuración en planta y el sistema de agitación del cultivo.

Los **estanques circulares** incorporan un brazo giratorio en el centro para mezclar el cultivo adecuadamente y provocar que el cultivo circule de manera circular. Existen aplicaciones de estanques circulares para la producción de las especies de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas* sp. (Chang et al., 2017). Los estanques circulares no se acaban aplicando a gran escala debido a la baja calidad de mezclado y a la facilidad de contaminación (Arutselvan et al., 2022).

Los **estanques tipo *raceway***, o también llamados HRAP (*High Rate Algal Ponds*), son los sistemas abiertos más extendidos en la industria de producción de biomasa para la obtención de biocombustibles, contribuyendo en un 95% de la producción total (Ali et al., 2022). La configuración de un estanque *raceway* (Figura 1.24) consiste en una pista de canales de baja profundidad (normalmente entre 15-25 cm) a través de los cuales circula el cultivo de microalgas que es movido por una rueda de paletas, la cual regula la agitación y la mezcla del cultivo deseada. Estos sistemas mejoran el diseño de los otros tipos de sistemas abiertos, mejorando el control de la operación sobre el mezclado y las condiciones del cultivo (Mohsenpour et al., 2021). Con los sistemas *raceway* es posible conseguir concentraciones de biomasa de entre 250-1.000 mg·L⁻¹ (Arutselvan et al., 2022) y alcanzar productividades de microalgas muy similares a las obtenidas en los fotobiorreactores cerrados (en torno a los 14-50 g·m²·d⁻¹) (Suali & Sarbatly, 2012). Esta productividad puede verse mejorada todavía si se incluye un sistema de transferencia de CO₂.

En el ámbito de la depuración de aguas, el estanque tipo *raceway* es considerado como el único sistema de cultivo factible para el tratamiento intensivo de aguas residuales (González-Camejo et al., 2021). Otros autores consideran que hay que combinar el tratamiento de aguas residuales con otro tipo de aplicación de la biomasa algal generada (p.ej. biocombustibles) para que el proceso resulte viable económicamente y poder introducir así el concepto de Economía Circular (Díaz et al., 2022).



Figura 1.24. Sistema abierto tipo *raceway* para el cultivo de microalgas (<https://www.earthrise.com>; Bahadar & Bilal Khan, 2013).

2.5.1.2 Sistemas cerrados (*closed photobioreactors*)

Los fotobiorreactores cerrados (o simplemente fotobiorreactores) fueron introducidos como sistemas de cultivo que mejoraban las limitaciones asociadas a los sistemas abiertos. En estos sistemas, el cultivo de microalgas se encuentra encerrado en el interior de una estructura transparente (vidrio, plástico, metacrilato, etc.) que le confiere una baja o nula posibilidad de intercambio de gases con la atmósfera (Chang et al., 2017).

Las **ventajas** de los fotobiorreactores cerrados frente a los sistemas abiertos son (Chang et al., 2017):

- Mejor control y optimización de los factores ambientales como temperatura, luz, pH, CO₂.
- Mejor control de los contaminantes exteriores que podrían introducirse en el cultivo.
- Mejor control de la evaporación de agua.
- Se minimizan las pérdidas de CO₂.
- Mejor transferencia de calor a través del cultivo.

CAPÍTULO 1

La principal ventaja de los fotobiorreactores cerrados es la mejora en la utilización de la luz al incrementar considerablemente la **relación superficie iluminada-volumen (S/V)** respecto a los sistemas abiertos. El ratio S/V es uno de los factores más importantes en el diseño de un fotobiorreactor. Gracias a esta ventaja, los cultivos de microalgas en fotobiorreactores consiguen alcanzar productividades de biomasa mucho mayores que en los sistemas abiertos (Mohsenpour et al., 2021). Otra mejora importante de los fotobiorreactores cerrados es que permiten obtener una biomasa algal de mayor calidad para la obtención de subproductos ya que es mucho más fácil controlar el monocultivo (Chang et al., 2017).

Por el contrario, existen algunas **desventajas** asociadas a los sistemas cerrados para el cultivo de microalgas, como son las siguientes (Ali et al., 2022):

- El alto coste de implantación, operación y mantenimiento.
- El daño celular provocado por estrés mecánico e hidrodinámico derivado del proceso de agitación para el mezclado y/o aireación.
- El sobrecalentamiento del cultivo inducido por las altas irradiaciones solares recibidas, sobre todo en climas cálidos.
- El ensuciamiento (*biofouling*) de las paredes de los fotobiorreactores, que reducen el paso de la luz y requiere de un mantenimiento para su control.

El **diseño** de los fotobiorreactores tiende a ser vertical, con una alta relación S/V, para mejorar el aprovechamiento de la luz recibida y reducir las necesidades de superficie de los cultivos (Posten, 2009). Existen diversas configuraciones de fotobiorreactores cerrados (Figura 1.25), siendo los más comunes los fotobiorreactores tubulares, los fotobiorreactores de columna y los fotobiorreactores de placa plana (*flat-panel photobioreactors*)

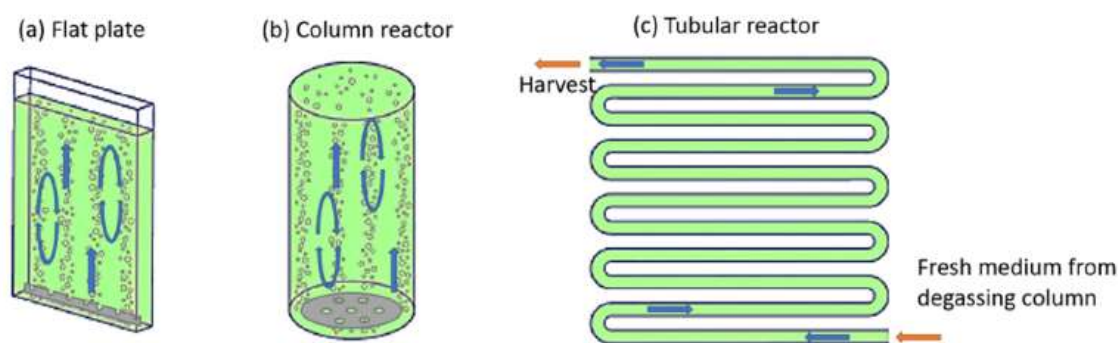


Figura 1.25. Sistemas de cultivo cerrados (*closed photobioreactors*) (Khor et al., 2022).

Los **fotobiorreactores tubulares** consisten en un conjunto de tubos verticales u horizontales transparentes (normalmente con diámetros inferiores a los 10 cm) que permiten la penetración de la luz, alcanzando una alta relación S/V (Huang et al., 2017). La introducción de gas (aire atmosférico o corriente enriquecida de CO₂) en el fotobiorreactor se lleva a cabo mediante difusores. Con el burbujeo se consigue el mezclado del cultivo, la transferencia de masa de CO₂ y la eliminación de O₂ producido durante la fotosíntesis. Generalmente es necesaria la introducción de una unidad de desgasificación en el circuito para el control de la concentración de O₂ disuelto que genera el cultivo de microalgas, que puede alcanzar concentraciones por encima del 400% de saturación, inhibiendo el proceso de crecimiento celular (Chisti, 2007). La recirculación del cultivo a lo largo del fotobiorreactor tubular se lleva a cabo mediante bombeo mecánico o con sistemas tipo *airlift* (impulsores de agua), lo cual supone un elevado coste y puede dañar las células de las microalgas (Vo et al., 2019). Wang & Lan (2018) compararon en un fotobiorreactor tubular el estrés celular producido por estos dos sistemas de recirculación en cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* y concluyeron que el sistema *airlift* tiene un impacto de estrés menor en las células.

Los **fotobiorreactores de columna** consisten en una estructura cilíndrica vertical que contiene el cultivo siendo este aireado por la parte inferior mediante difusores. Se trata de un diseño sencillo y de bajo coste, que permite una óptima transferencia de masa gas-líquido. No obstante, se trata de un tipo de fotobiorreactores que son difíciles de aplicar a gran escala debido a que, al aumentar el volumen, aumenta el diámetro y se reduce la

distancia de penetración de la luz por el efecto sombra. Para evitar el efecto sombra en el interior del fotobiorreactor de columna, a veces se implantan sistemas de iluminación interior (Ugwu et al., 2008). Este tipo de fotobiorreactores también presenta otro problema relacionado con la verticalidad, y es que se trata de una posición de captación de luz ineficiente sobre todo en las horas cercanas al mediodía (Chanquia et al., 2021; Ugwu et al., 2008).

Los **fotobiorreactores de placa plana (*flat-panel*)** (ver Figura 1.26) son los tipos de fotobiorreactores más robustos, formados mediante láminas de plástico, vidrio o metacrilato, pudiendo alcanzar volúmenes importantes con una relación S/V muy alta (Vo et al., 2019). Este tipo de fotobiorreactor consigue una mejor eficiencia fotosintética, mayores productividades y densidades de biomasa que el resto de fotobiorreactores (Janssen et al., 2003), y suponen un menor consumo energético durante la operación (Pereira et al., 2013). La acumulación de O₂ disuelto en este tipo de fotobiorreactor es mucho menor que en los fotobiorreactores tubulares (Ugwu et al., 2008). La aireación del reactor se lleva a cabo a través de tubos perforados que se instalan cercanos a las paredes para evitar el *biofouling*. A veces, este tipo de aireación puede generar zonas muertas y estrés en las células de las microalgas (Verma & Srivastava, 2018). Otras desventajas de los fotobiorreactores de placa plana son la dificultad y altos costes para su aplicación a gran escala y la dificultad para controlar la temperatura del cultivo (Chanquia et al., 2021).

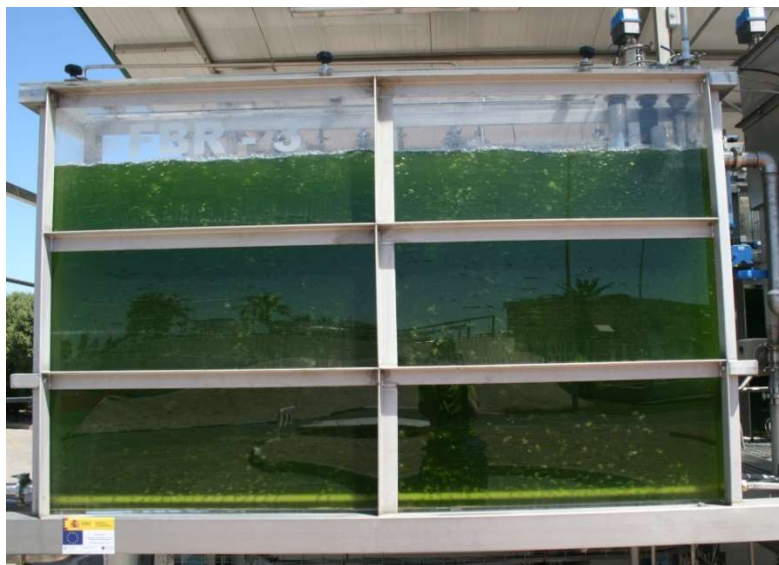


Figura 1.26. Fotobiorreactor de placa plana utilizado para la experimentación en planta piloto de esta tesis.

En el ámbito del tratamiento de aguas residuales, se ha observado que los cultivos de microalgas en fotobiorreactores cerrados obtienen mejores tasas de eliminación de nutrientes que los sistemas abiertos, especialmente en la eliminación de P (Mohsenpour et al., 2021). No obstante, todavía se necesitan más estudios para conocer mejor el potencial de los cultivos de microalgas en fotobiorreactores cerrados para la eliminación/recuperación de nutrientes y su posible aplicación a gran escala.

2.5.2 Procesos para la cosecha (*harvesting*) de la biomasa algal

El proceso de cosecha o *harvesting* consiste en una fase necesaria y consecutiva a los sistemas de cultivo de microalgas en suspensión para la separación de la biomasa algal producida del agua. Este proceso está considerado como una de las mayores limitaciones para la viabilidad económica de los cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y/o la producción de biocombustibles a gran escala. Existen tres problemas básicos relacionados con el proceso de *harvesting* (Olguín, 2012):

- El tamaño de las células de las microalgas es muy pequeño (en torno a los 3-30 μm).
- Los sistemas de cultivos más comunes trabajan con concentraciones de microalgas relativamente bajas, y con grandes volúmenes de agua.
- El coste total del proceso de *harvesting* supone entre un 20-40% del coste total del cultivo de microalgas, pudiendo ser incluso mayor cuando la aplicación final es la obtención de productos de alto valor (p.ej. metabolitos o nutracéuticos).

Existen diversos métodos que se utilizan para llevar a cabo el *harvesting* de la biomasa producida en los cultivos de microalgas, siendo los más comúnmente utilizados los siguientes: centrifugación, sedimentación, coagulación-floculación, flotación y filtración.

El método de **centrifugación** es un proceso físico de *harvesting* provocado por la acción de una aceleración centrípeta que permite separar la biomasa algal del agua del medio de

cultivo por diferencia de densidad. La centrifugación resulta un método de separación muy eficiente y rápido, y es adecuado para la mayoría de las especies de microalgas ya que se adapta a los distintos tamaños celulares. Este método es recomendable para aplicaciones a escala piloto o laboratorio, pero no para su uso a gran escala o en aplicaciones comerciales. Además, el método de centrifugación puede dañar a las células de las microalgas por el esfuerzo cortante generado durante el proceso (Harun et al., 2010; Japar et al. 2017; Razzak et al., 2017).

El método de **sedimentación** es un proceso físico comúnmente utilizado en el tratamiento de aguas residuales que consiste en la separación de la biomasa del agua mediante la decantación de las partículas suspendidas que poseen diferentes densidades y tamaños. Aunque es un proceso muy utilizado normalmente en cultivos de bacterias para el tratamiento de aguas residuales, la sedimentación es un proceso que obtiene bajas eficiencias de separación en los cultivos de microalgas dada la baja sedimentabilidad de la biomasa algal, y además es un proceso que requiere largos tiempos de retención (Enamala et al., 2018; Razzak et al., 2017). Diversos autores han demostrado que mediante la adición de coagulantes es posible mejorar significativamente la eficiencia de la sedimentación de las microalgas. Golueke & Oswald (1965) consiguieron una efectividad del 85% en el *harvesting* de microalgas mediante un proceso de floculación-sedimentación con adición de alumbre. También se ha observado que en los consorcios de microalgas-bacterias, las sustancias exopoliméricas (EPS) generadas por las bacterias favorece la formación de estructuras estables de gránulos de biomasa algal, mejorando el tamaño y favoreciendo la sedimentación (Fallahi et al., 2021).

El método de **coagulación-floculación** es un método químico comúnmente utilizado en las aguas residuales para la eliminación de sólidos no sedimentables. Este método consiste en la adición de un coagulante, que es un compuesto químico formado por partículas con carga opuesta a la que presenta la superficie de las microalgas, de manera que ambas cargas se neutralizan y se generan partículas coloidales. A continuación, se añade un floculante, que es un aditivo químico que favorece la agrupación de las partículas coloidales en la formación de flóculos con un mayor tamaño favoreciendo la sedimentación. Generalmente se utiliza cloruro férrico, sulfato férrico, cloruro de aluminio o sulfato de aluminio como floculantes, obteniendo buenas eficiencias de separación de la biomasa. No obstante, las partículas de estos aditivos químicos aportan

riesgo de contaminación en el sobrenadante y, además, se adhieren a la superficie de las microalgas y puede generar la disrupción celular e interferir en la extracción de lípidos. Existen también otro tipo de aditivos naturales como el quitosano, que es un floculante que permite obtener altas eficiencias, pero sólo es posible trabajar con él a pH muy ácido (Enamala et al., 2018; Razzak et al., 2017). En los últimos años también ha aparecido una técnica basada en la floculación, pero utilizando bio-floculantes en vez de aditivos químicos para la generación de flóculos. La **bio-floculación** parece tener un recorrido interesante como proceso de *harvesting* de microalgas, aunque se necesitan muchos más estudios para poder aplicarla a gran escala (Japar et al. 2017; Olgún, 2012).

El método de **flotación** es un proceso físico que también es utilizado en la línea de fangos de una EDAR convencional y que ofrece una gran eficiencia de separación a bajo coste. Consiste en la introducción de una gran cantidad de burbujas de aire en el medio de cultivo, de manera que estas se adhieran a la superficie de las microalgas, provocando su ascensión por flotabilidad y acumulándose en la parte superior del tanque de flotación facilitando su recogida por medios mecánicos. Como ocurre con el proceso de floculación, la flotación también requiere de la adición de químicos, en este caso surfactantes (sulfato de aluminio, sulfato férrico, bromuro de cetiltrimetilamonio, quitosano, etc.), para la estabilidad de la espuma generada y para aumentar la hidrofobicidad de las microalgas (Alkarawi et al., 2018; Enamala et al., 2018; Razzak et al., 2017).

El método de **filtración** consiste en un proceso físico mediante el cual la biomasa algal se conduce a través de un filtro o elemento filtrante que posee un tamaño de poro inferior al tamaño de las células de las microalgas que se quieren separar. Los métodos de filtración que se suelen utilizar son: (1) filtración por presión o vacío, (2) filtración de extremo cerrado o (3) filtración mediante membranas (microfiltración y ultrafiltración) (Enamala et al., 2018; Razzak et al., 2017). Las **membranas de filtración** aparecen como una de las tecnologías más competitivas para realizar el *harvesting* de la biomasa, ya que es un sistema que ofrece múltiples ventajas como por ejemplo (Drexler & Yeh, 2014; Japar et al., 2017; Marbelia et al., 2014; Udaiyappan et al., 2017):

CAPÍTULO 1

- Genera poco estrés hidrodinámico en las células microalgas, y no necesita de aditivos químicos para aumentar la eficiencia de la separación, reduciendo el riesgo de contaminación. De esta manera, se aumenta la calidad de la biomasa separada, lo que es especialmente importante para la obtención de productos de alto valor añadido (p.ej. bio-combustibles).
- Es un proceso menos sensible a la especiación química, a los parámetros de calidad del agua influente (p.ej. pH) y a las características de las microalgas (p.ej. tamaño de las células, sedimentabilidad, etc.).
- Facilita la recuperación de nutrientes de las aguas residuales, ya que permite desacoplar el TRH del TRC, pudiendo trabajar con mayores cargas de nutrientes en el sistema de cultivo y aumentar la producción de biomasa.
- Permite la obtención de un efluente de alta calidad y libre de sólidos, con alto potencial de recuperación.
- Permite un alto control del proceso de *harvesting*.

Por el contrario, las membranas de filtración tienen algunos inconvenientes que es importante considerar (Drexler & Yeh, 2014; Razzak et al., 2017):

- El *fouling* o ensuciamiento de las membranas requiere de un mantenimiento operativo durante el proceso de filtración (mediante la programación de fases de relajación y contralavado) y de un mantenimiento químico (mediante aditivos) para la regeneración de las membranas.
- Supone un alto coste energético al requerir de altas presiones para el proceso de filtración, mayor cuanto menor es el tamaño del poro de las membranas.

En la Tabla 1.4 se resumen las ventajas e inconvenientes de las tecnologías explicadas para el proceso de *harvesting* de la biomasa algal.

Tabla 1.4. Eficiencia, ventajas e inconvenientes de las tecnologías de *harvesting* de microalgas.

Tecnología	Eficiencia	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Centrifugación	80-95%	<ul style="list-style-type: none"> - Método muy rápido y con alta eficiencia de recuperación de recursos (80% de la biomasa en 2-3 minutos) - Apto para un amplio rango de especies de microalgas 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto coste energético, de operación y mantenimiento - Posibilidad de daño celular por estrés mecánico - Sólo para aplicaciones a pequeña escala 	Harun et al., 201 Japar et al. 2017 Razzak et al., 2017
Sedimentación	10-50%	<ul style="list-style-type: none"> - Método simple y de bajo coste - Interesante para grandes volúmenes de agua - Fácil de mantener y operar 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajas eficiencias por mala sedimentabilidad de la biomasa algal - Tiempos altos de operación - Baja calidad del efluente 	Enamala et al., 2018 Razzak et al., 2017 Golueke & Oswald, 1965 Fallahi et al., 2021
Coagulación-floculación	70-90%	<ul style="list-style-type: none"> - Acelera el proceso de sedimentación - Alta eficiencia - Posibilidad de aplicación a gran escala 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto riesgo de contaminación si no se utilizan floculantes naturales - Posibilidad de provocar disrupción celular - Coste de los aditivos químicos 	Enamala et al., 2018 Razzak et al., 2017 Japar et al., 2017 Olguín, 2012
Flotación	80-90%	<ul style="list-style-type: none"> - Alta eficiencia - Bajo coste - Método sencillo - Posibilidad de aplicación a gran escala 	<ul style="list-style-type: none"> - Riesgo de contaminación debido al uso de compuestos químicos - Posibilidad de provocar disrupción celular - Coste de los aditivos (surfactantes) 	Alkarawi et al., 2018 Enamala et al., 2018 Razzak et al., 2017
Filtración	70-95%	<ul style="list-style-type: none"> - Alta calidad del efluente - Alta eficiencia - Fácil operación - Bajo estrés hidrodinámico 	<ul style="list-style-type: none"> - Fenómeno de <i>fouling</i> o ensuciamiento de las membranas (necesidad de contralavados y limpiezas químicas) - Alto coste energético 	Drexler & Yeh, 2014 Japar et al., 2017 Marbelia et al., 2014 Udaiyappan et al., 2017

2.5.3 El fotobiorreactor de membranas (MPBR)

Generalmente, los cultivos de microalgas se consideran poco eficientes cuando el objetivo principal es la eliminación de nutrientes de las aguas residuales. Esto se debe a que las microalgas tienen una velocidad de crecimiento muy baja, por lo que para obtener unas tasas de eliminación de nutrientes elevadas, es necesario trabajar con altos tiempos de retención celular (TRC). Por otro lado, los fotobiorreactores necesitan una alta carga de nutrientes para mantener una tasa alta de crecimiento, es decir, un tiempo de retención hidráulico (TRH) bajo, sobre todo cuando el influente del fotobiorreactor son aguas residuales de baja carga. No obstante, operar a TRH bajos en los fotobiorreactores produce el lavado (*washout*) de la biomasa, haciendo que el proceso de eliminación nutrientes y producción de biomasa disminuya significativamente.

Como solución a estos problemas aparece la tecnología del fotobiorreactor de membranas (MPBR, del inglés *Membrane Photobioreactor*). Se trata de una tecnología novedosa que combina dos procesos en un mismo sistema: el proceso de cultivo de microalgas en un fotobiorreactor y el proceso de *harvesting* utilizando membranas de filtración (ver Figura 1.27). De esta manera, es posible desacoplar el TRH del TRC durante la operación del fotobiorreactor, lo que supone unas **ventajas** importantes en el proceso de recuperación de nutrientes en el cultivo de microalgas como son (Goh et al., 2022):

- Se evita el proceso de lavado de la biomasa en el fotobiorreactor, pudiendo trabajar a concentraciones más altas de biomasa (altos TRC), reduciendo las necesidades de espacio. Por otro lado, al desacoplar el TRH del TRC, es posible trabajar con una mayor carga de nutrientes en el fotobiorreactor (TRH más bajos) manteniendo el TRC y mejorando significativamente el proceso de eliminación de nutrientes y la productividad de biomasa. Por ejemplo, Solmaz & Işık (2020) estudiaron a escala laboratorio diversos TRH entre 24-72 h manteniendo el TRC en 3 días, obteniendo los mejores valores de eliminación de nutrientes ($5,55 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y $0,40 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) y producción de biomasa ($118 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) para el TRH más bajo de 24 h.

- Se consigue un mejor control y automatización del proceso al poder trabajar con valores TRC y TRH distintos: control de la carga de nutrientes, control de la disponibilidad de luz, control del proceso filtración, etc.
- Se consigue una alta eficiencia del proceso de *harvesting* de la biomasa gracias a las membranas de filtración, pudiendo controlar la concentración final de la biomasa que es purgada del sistema.

Sin embargo, existen ciertas **desventajas** a tener en cuenta en la operación de un MPBR como son:

- Al trabajar con concentraciones más altas de sólidos en el fotobiorreactor, se debe controlar el efecto sombra (*self-shading*) del cultivo para evitar una disminución en la velocidad del proceso de crecimiento. A nivel de diseño del fotobiorreactor, para evitar este fenómeno es necesario trabajar con distancias de paso de luz (*light path*) más pequeñas, lo que supone una reducción del volumen del reactor.
- Lo normal en la aplicación de sistemas MPBR es trabajar con tanques de membranas externos, por la facilidad que ello supone para la operación y mantenimiento de las membranas. Los tanques de membrana suelen ser tanques opacos al paso de la luz, estando el volumen de cultivo de microalgas que contienen en zona oscura, sin actividad fotosintética. Es importante optimizar el volumen reservado a los tanques de membrana para mantener la efectividad de los sistemas MPBR (González-Camejo et al., 2021). En la Figura 1.27 se muestran las distintas configuraciones de los sistemas MPBR en relación con la ubicación de los módulos de membranas.
- El mantenimiento de las membranas es importante para el control del ensuciamiento (*fouling*) generado por las segregaciones biológicas de las microalgas con el fin de mantener su capacidad filtrante. El control de las membranas puede ser físico cuando el *fouling* es reversible (mediante fases de contralavado o por agitación mediante la aireación) o químico en el caso de *fouling* irreversible (mediante limpieza química de las membranas). La limpieza

química supone la paralización del tanque de membrana durante el proceso de limpieza y un coste extra por los reactivos utilizados.

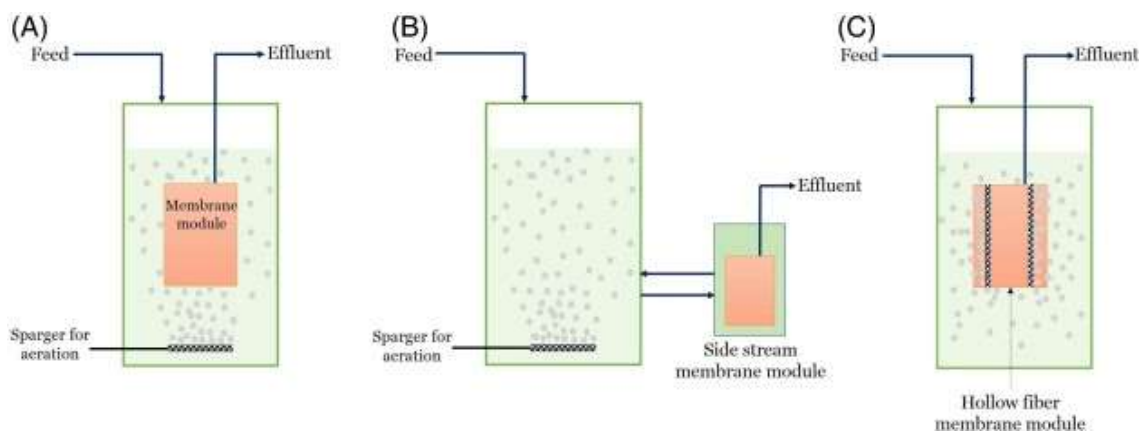


Figura 1.27. Configuraciones de fotobiorreactor de membranas (MPBR): (A) MPBR con membranas sumergidas y aireación mediante difusores, (B) MPBR con tanque de membranas externo, (C) MPBR con membranas sumergidas y aireación a través de las membranas (Nagarajan et al., 2023).

Actualmente existen pocos estudios a escala piloto o industrial relacionados con la aplicación del uso de los MPBR para la producción de biomasa o para la eliminación de nutrientes del agua residual, estando la mayoría de los estudios encontrados en bibliografía desarrollados a escala laboratorio (Ye et al., 2021).

3 MODELACIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO DE MICROALGAS

3.1 Modelación matemática de los procesos biológicos

La modelación matemática de procesos (físicos, químicos o biológicos) es una técnica que permite representar, entender, predecir y optimizar los procesos mediante el uso de expresiones matemáticas y unas condiciones de contorno.

Históricamente, el uso de la modelación matemática para el diseño de nuevas EDAR, así como para la ampliación y optimización de las ya existentes, ha permitido obtener excelentes resultados (Serralta, 2004). La modelación matemática de los procesos biológicos en el tratamiento de aguas permite (Salgado & Pires, 2023):

1. Entender mejor el comportamiento dinámico de los principales parámetros (bióticos y abióticos) que afectan a los procesos.
2. Entender mejor los mecanismos que rigen el fenómeno observado.
3. Predecir parámetros del proceso y analizar su sensibilidad.
4. Calcular los valores máximos y mínimos de las variables del proceso.
5. Optimizar el diseño de experimentos y el testeo de diferentes hipótesis.
6. Evaluar los costes de implantación y operación del proceso.
7. Facilitar la escalabilidad del proceso, permitiendo su optimización y un mejor control.

De manera general, los modelos matemáticos pueden clasificarse en tres tipos según el nivel de profundidad teórica de los procesos considerados (ver Figura 1.28):

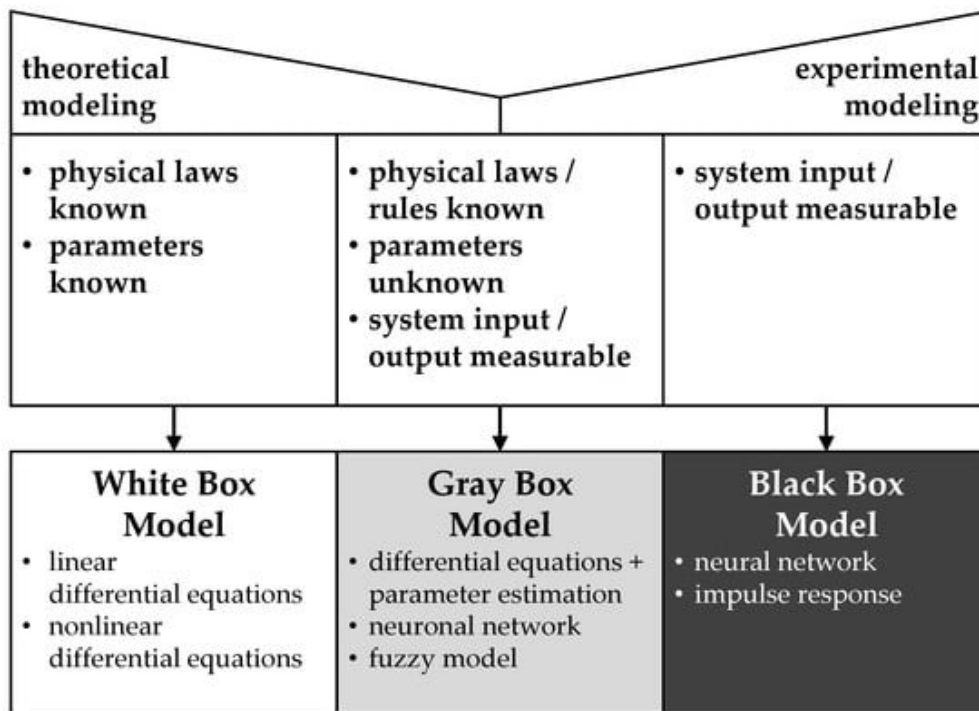


Figura 1.28. Tipos de modelos matemáticos según el nivel de detalle de los procesos considerados (Heiker et al., 2021).

- **Modelos mecanicistas (*white box*):** en este tipo de modelos se describen todos los procesos (físicos, químicos y biológicos) mediante ecuaciones diferenciales lineales y no lineales que incluyen un alto nivel de conocimiento de la física, las estructuras y los parámetros de los procesos sin considerar ninguna restricción. Se trata del grupo de modelos que ofrecen un mayor detalle de los procesos, lo que permite representar fielmente el sistema real y obtener resultados muy ajustados a la realidad observada. Sin embargo, dado que se trata de modelos que no consideran ninguna aproximación, éstos requieren un diseño e implementación muy complejos que incluye un elevado número de parámetros que deben ser calibrados. Los modelos mecanicistas se emplean en tareas de diseño y optimización en los que se requiere una alta precisión.

- **Modelos empíricos (*black box*):** estos modelos matemáticos crean una respuesta del sistema sin ningún conocimiento de las relaciones físicas con las variables de entrada y sin considerar la complejidad del sistema. Los modelos empíricos permiten ajustar los datos del proceso a una función que reproduce los resultados observados experimentalmente de manera aproximada. Dentro de los modelos empíricos encontramos las redes neuronales artificiales o los modelos estadísticos. Estos modelos describen las relaciones funcionales entre las entradas y las salidas del modelo y son eficientes para representar el comportamiento de un proceso como una tendencia. Al contrario que en los modelos mecanicistas, los modelos empíricos precisan de un número de parámetros reducido, haciendo más sencilla la etapa de calibración y tratamiento matemático. El uso de los modelos empíricos está limitado al intervalo de condiciones considerado para su definición, pudiendo presentar problemas a la hora de reproducir situaciones diferentes a las utilizadas en la calibración.
- **Modelos semiempíricos (*grey box*):** estos modelos son una solución de compromiso entre los modelos mecanicistas y empíricos, en los cuales se incluyen aproximaciones físicas y en donde los procesos son agrupados y, por tanto, los parámetros que intervienen incluyen el efecto simultáneo de diversos fenómenos que son difíciles de desacoplar. Aunque los modelos semiempíricos tienen menos parámetros que los modelos mecanicistas, el rango de valores que éstos pueden presentar es más amplio.

Los modelos empleados comúnmente en el tratamiento de aguas son mecanicistas o semiempíricos, donde se relacionan las variables de estado de los procesos de manera que su resolución proporciona la trayectoria seguida por estas variables en función del tiempo.

La Figura 1.29 muestra las etapas o fases que intervienen en la elaboración de un modelo matemático:

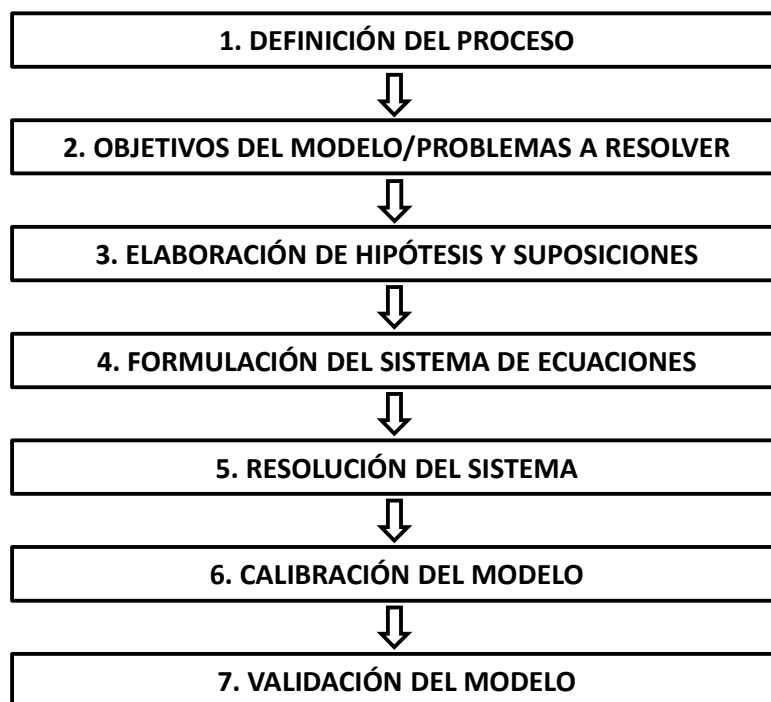


Figura 1.29. Fases en la elaboración de un modelo matemático (adaptado de Donoso Bravo (2021)).

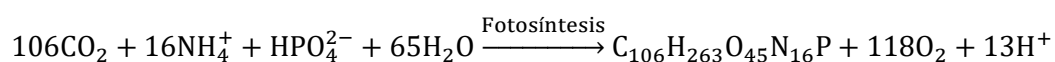
La formulación resultante de un modelo matemático de los procesos que tienen lugar en el tratamiento de aguas es la combinación de las ecuaciones de conservación de materia y energía junto con las ecuaciones de velocidad de los procesos implicados (físicos, químicos y/o biológicos). La definición del modelo también puede incorporar restricciones como, por ejemplo, las leyes de equilibrio químico. Una vez formulado el modelo, este se puede aplicar a un sistema concreto y comparar con los datos experimentales. Las diferencias observadas pueden ser utilizadas para afinar e incluso redefinir el modelo hasta conseguir una mejor representación de los datos experimentales.

Por otro lado, a la hora de definir o elegir un modelo matemático hay que tener en cuenta que un aumento en el número de procesos y parámetros considerados (como en el caso de los modelos mecanicistas) suele provocar una disminución en la variabilidad de los valores de los parámetros, es decir, con valores similares de los parámetros es posible representar un amplio rango de escenarios. En ocasiones, aumentar la complejidad del modelo matemático puede evitar la necesidad de determinar experimentalmente el valor de determinados parámetros, disminuyendo los esfuerzos de calibración necesarios.

3.1.1 Estequiometría y cinética de los procesos biológicos

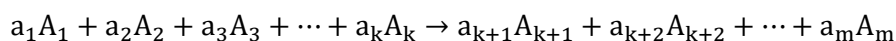
Las transformaciones que llevan a cabo los microorganismos en los procesos biológicos que se dan en el tratamiento de aguas (hidrólisis, crecimiento, lisis, etc.) pueden describirse por medio de reacciones bioquímicas, de modo que dichas transformaciones pueden definirse mediante relaciones estequiométricas y ecuaciones cinéticas.

Las relaciones estequiométricas relacionan las cantidades de reactivos que se consumen en un proceso con las cantidades de productos que se generan. Por ejemplo, la relación estequiométrica para la producción de microalgas según la fórmula molecular $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ definida por Oswald (1988) es la que se muestra en la Reacción 1.4:



Reacción 1.4. Relación estequiométrica de la producción de microalgas en la fotosíntesis.

La fórmula general de una relación estequiométrica puede escribirse como en la Reacción 1.5:



Reacción 1.5. Fórmula general de una relación estequiométrica.

Donde A_i son los componentes de la reacción (reactivos $i \leq k$; productos $i > k$), y a_i son los coeficientes estequiométricos de los reactivos y productos.

Reordenando la Reacción 1.5 y extendiéndola a un conjunto de n reacciones, se obtiene el siguiente conjunto de ecuaciones:

CAPÍTULO 1

$$\begin{array}{cccccccccccc}
 v_{1,1}A_1 + v_{2,1}A_2 + \cdots + v_{k,1}A_k + v_{k+1,1}A_{k+1} + v_{k+2,1}A_{k+2} + \cdots + v_{m,1}A_m = 0 \\
 v_{1,2}A_1 + v_{2,2}A_2 + \cdots + v_{k,2}A_k + v_{k+1,2}A_{k+1} + v_{k+2,2}A_{k+2} + \cdots + v_{m,2}A_m = 0 \\
 \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \quad \quad \quad \vdots \\
 v_{1,n}A_1 + v_{2,n}A_2 + \cdots + v_{k,n}A_k + v_{k+1,n}A_{k+1} + v_{k+2,n}A_{k+2} + \cdots + v_{m,n}A_m = 0
 \end{array} \tag{Ec. 1.1}$$

En la expresión anterior el coeficiente $v_{i,j}$ representa el coeficiente estequiométrico normalizado del componente i en la reacción química j . Para cualquier componente k , los coeficientes estequiométricos de las reacciones en las que participe como reactivo serán negativos, en las que participe como producto serán positivos, y en aquellas que no participe serán cero. Por tanto, la velocidad neta de transformación de un componente será la suma de las velocidades de reacción en las que este participa, multiplicadas por sus correspondientes coeficientes estequiométricos tal y como se muestra en la Ec. 1.2:

$$r_i = \sum_{j=1}^n v_{i,j} \cdot r_j \tag{Ec. 1.2}$$

Donde r_i [$M \cdot L^3 \cdot T^{-1}$] es la velocidad de transformación del componente i , $v_{i,j}$ es el coeficiente estequiométrico del componente i en la reacción j , y r_j [$M \cdot L^3 \cdot T^{-1}$] es la velocidad con la que tiene lugar la reacción j .

Si el resultado de la ecuación anterior es negativo, el componente estará desapareciendo del sistema en el proceso global, mientras que si es positivo dicho componente estará siendo generado.

Normalmente, en los procesos biológicos que tienen lugar en el tratamiento de aguas residuales, la concentración del sustrato, los nutrientes y los aceptores de electrones utilizados afectan a la velocidad de crecimiento, de modo que, en ausencia de uno o varios de estos componentes, la velocidad de crecimiento se ve limitada (factores limitantes). También existen otros factores abióticos como la temperatura que afectan a la velocidad de crecimiento, habiendo un rango de valores en los que el crecimiento se ve aumentado y otro rango en el que éste se ve inhibido. Para tener en cuenta estas limitaciones en el

crecimiento de los microorganismos, existen dos tipos de modelos alternativos que se pueden usar (Lee et al., 2015):

- **Modelos interactivos o multiplicativos:** en estos modelos se supone que todos los factores influyen de forma simultánea al crecimiento global de los microorganismos (Ec. 1.3). La función más utilizada en este tipo de modelos para representar el efecto de los diferentes factores es la función de descrita por Monod (1949).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f(x_1) \cdot f(x_2) \cdot f(3) \dots f(x_i) \quad (\text{Ec. 1.3})$$

Donde μ [T^{-1}] y μ_{\max} [T^{-1}] son la velocidad de crecimiento de los microorganismos calculada en el modelo y la máxima, respectivamente; y $f(x_i)$ son las funciones que representan el efecto de los diferentes factores considerados.

- **Modelos no-interactivos (Ley del Mínimo):** estos modelos se basan en que la velocidad de crecimiento global de los microorganismos se ve afectada solamente por el factor más limitante de todos los que se consideran (Ec. 1.4). De esta forma, la tasa o velocidad de crecimiento será la mínima obtenida por las funciones independientes de cada factor. Este tipo de modelos se utilizan normalmente para introducir el concepto de co-limitación de factores.

$$\mu = \mu_{\max, \min}(f(x_1) \cdot f(x_2) \cdot f(3) \dots f(x_i)) \quad (\text{Ec. 1.4})$$

Donde $\mu_{\max, \min}$ [T^{-1}] es la velocidad máxima con respecto al factor más limitante.

En la modelación matemática de los procesos que tienen lugar en los sistemas de tratamiento de aguas residuales suelen emplearse los modelos interactivos o multiplicativos.

3.1.2 Formato y notación de los modelos

La forma más ampliamente aceptada para presentar los modelos matemáticos que representan los procesos biológicos que tienen lugar en el tratamiento de aguas residuales es la notación matricial. Este tipo de notación fue utilizada por primera vez por Henze et al. (1987) en la presentación del modelo matemático ASM1 (Activated Sludge Model No. 1) para el cálculo de los procesos biológicos que tienen lugar en el reactor de fangos activados de una EDAR.

La notación matricial consiste en poner los coeficientes estequiométricos $v_{i,j}$ en una tabla, conocida como matriz estequiométrica, indicando cómo varía cada componente i (presentados en la fila superior de la matriz), en cada uno de los procesos j (presentados en la primera columna de la matriz). En la Tabla 1.5 se muestra la representación esquemática de la matriz para un modelo con n componentes y m procesos. Además de los coeficientes estequiométricos, es necesario presentar en la matriz (o en una tabla independiente) las ecuaciones de velocidad para cada uno de los procesos (r_j).

Tabla 1.5. Matriz estequiométrica para un modelo con n componentes y m procesos.

Componentes $\rightarrow i$	A_1	A_2	...	A_n	Velocidad de crecimiento (r_j)
Procesos $\downarrow j$					
1	$v_{1,1}$	$v_{1,2}$...	$v_{1,n}$	r_1
2	$v_{2,1}$	$v_{2,2}$...	$v_{2,n}$	r_2
...
m	$v_{m,1}$	$v_{m,2}$...	$v_{m,n}$	r_m

La aparición del modelo ASM1 supuso, además de la aparición de un nuevo concepto de simulación dinámica de los procesos de tratamiento de aguas residuales, un avance importante en la estandarización de la notación y estructura de los modelos matemáticos. La notación utilizada permite distinguir entre los componentes solubles, representados por una letra S seguida del subíndice que representa cada componente, y los componentes particulados, representados con una letra X seguida de su correspondiente subíndice. En cuanto a los parámetros del modelo, cabe distinguir entre parámetros estequiométricos y

parámetros cinéticos. Los parámetros estequiométricos se utilizan para el cálculo de los coeficientes estequiométricos de cada proceso mientras que los parámetros cinéticos son aquellos que se utilizan en las expresiones cinéticas de cada proceso.

Para la determinación de los coeficientes estequiométricos es necesario aplicar las ecuaciones de continuidad o conservación a cada uno de los procesos considerados en la matriz. En cada proceso se aplican tantas ecuaciones de continuidad como materiales sujetos a conservación se hayan definido previamente. Estos materiales sujetos a conservación son DQO, C, N, P, carga eléctrica, etc. La ecuación de continuidad aplicada a cualquier proceso j y al material c sujeto a conservación es la siguiente:

$$\sum_{i=1}^n v_{j,i} \cdot i_{c,i} = 0 \quad (\text{Ec. 1.5})$$

Donde $v_{j,i}$ es el coeficiente estequiométrico del componente i en el proceso j , n es el número total de componentes y $i_{c,i}$ es el factor de conversión o contenido del material c por cada unidad del componente i , el cual permite el paso de las unidades del componente i a las del material c al que se le aplica la ecuación de conservación.

Normalmente, los factores de conversión se presentan en una matriz conocida como “matriz de composición” (Gujer & Larsen, 1995). La matriz de composición para el ejemplo anterior se muestra en la Tabla 1.6. Esta matriz de composición tiene tantas columnas como componentes considerados y tantas filas como el número de materiales sujetos a conservación.

Tabla 1.6. Matriz de composición para un modelo con n componentes y m materiales a conservar.

Componentes → i	A_1	A_2	...	A_n
	Materiales ↓ c			
1	$i_{1,1}$	$i_{1,2}$...	$i_{1,n}$
2	$i_{2,1}$	$i_{2,2}$...	$i_{2,n}$
...
m	$i_{m,1}$	$i_{m,2}$...	$i_{m,n}$

En esta tesis doctoral se desarrolla un modelo matemático para el crecimiento de microalgas para el tratamiento de aguas residuales utilizando el formato y notación descritos en este apartado.

3.2 Modelación matemática del crecimiento de cultivos de microalgas

Con el objetivo de predecir y optimizar el proceso de crecimiento de las microalgas bajo diferentes condiciones y mejorar el entendimiento de los procesos metabólicos que tienen lugar en los cultivos de microalgas, la modelación matemática del proceso aparece como una herramienta interesante que permite relacionar diversos factores (luz, temperatura, pH, concentración de nutrientes, etc.) con los parámetros clave de los cultivos de microalgas (tasa de consumo de nutrientes, tasa de crecimiento, productividad de biomasa, etc.) sin necesidad de desarrollar experimentos de laboratorio para el estudio de cada efecto de manera separada (Darvehei et al., 2018).

En general, los modelos matemáticos que han sido desarrollados para representar el crecimiento de microalgas pueden clasificarse en dos grupos: (1) modelos que consideran la cinética de crecimiento dependiente de un único factor (generalmente la luz), y (2) modelos que consideran múltiples factores, como los diferentes sustratos (N, P, CO₂, etc.) y las condiciones ambientales (luz, pH, temperatura, etc.) (Bekirogullari et al., 2020; Lee et al., 2015). En el segundo caso, para la elección del modelo idóneo para la simulación del crecimiento de las microalgas es necesario adoptar una solución de compromiso entre la complejidad de la estructura del modelo y la facilidad o usabilidad que permite su cálculo matemático.

La mayoría de los modelos matemáticos del crecimiento de microalgas consideran únicamente el metabolismo fotoautótrofo, dado que éste es el principal metabolismo que presentan las microalgas verdes y las cianobacterias, siendo muy escasos los modelos que consideran el crecimiento heterótrofo o mixótrofo. Por otro lado, dada la complejidad de procesos que tienen lugar durante la fotosíntesis, prácticamente todos los modelos matemáticos de microalgas existentes son modelos semiempíricos (*grey box*) que no entran a definir en detalle las reacciones metabólicas que tienen lugar en el interior de las células (Shoener et al., 2019). La mayoría de los modelos de microalgas tampoco

consideran la historia de los cultivos, es decir, aquel estado anterior en el que se encontraba el cultivo (ausencia de nutrientes en el medio, exposición a altas temperaturas, etc.) y cuyo efecto incide significativamente en el crecimiento actual. También son escasos los modelos de microalgas que consideran el efecto de la hidrodinámica en el cultivo. Sin estas consideraciones, la modelación de microalgas se ve limitada en la exactitud del modelo para predecir el crecimiento de los cultivos (Shoener et al., 2019).

3.2.1 Modelación del efecto de la luz

La luz es el principal factor que debe considerarse en los modelos matemáticos de crecimiento las microalgas ya que es la fuente de energía necesaria para la fotosíntesis.

Según Béchet et al. (2013), existen tres tipos de modelos matemáticos para considerar el efecto de la luz:

- **Modelos Tipo I:** estos modelos consideran la tasa global de fotosíntesis de un cultivo en función únicamente de la irradiación de luz incidente (I_0). Estos modelos son los más simples y fáciles de utilizar, pero han de ser utilizados con prudencia en condiciones *outdoor*, sobre todo fuera del rango de intensidades utilizadas durante la experimentación (Bekirogullari et al., 2020).
- **Modelos Tipo II:** son modelos que consideran la tasa global de fotosíntesis de un cultivo como la suma de las tasas de fotosíntesis locales según la luz que recibe cada porción de volumen en los que se divide el reactor. Estos modelos son la solución de compromiso que normalmente se adopta ya que permiten mejorar los resultados obtenidos por los modelos Tipo I pero sin incrementar significativamente la complejidad del cálculo matemático.
- **Modelos Tipo III:** se trata de modelos que consideran el gradiente de luz a través del cultivo y, además, los ciclos cortos de luz a los que se ven expuestas las células de cada parte del volumen del reactor. Estos modelos prácticamente no se aplican ya que precisan un elevado número de datos de entrada.

La Figura 1.30 muestra la relación típica entre la tasa de fotosíntesis de las microalgas y la intensidad de luz incidente, que ya se explicó en el Apartado 2.3.1:

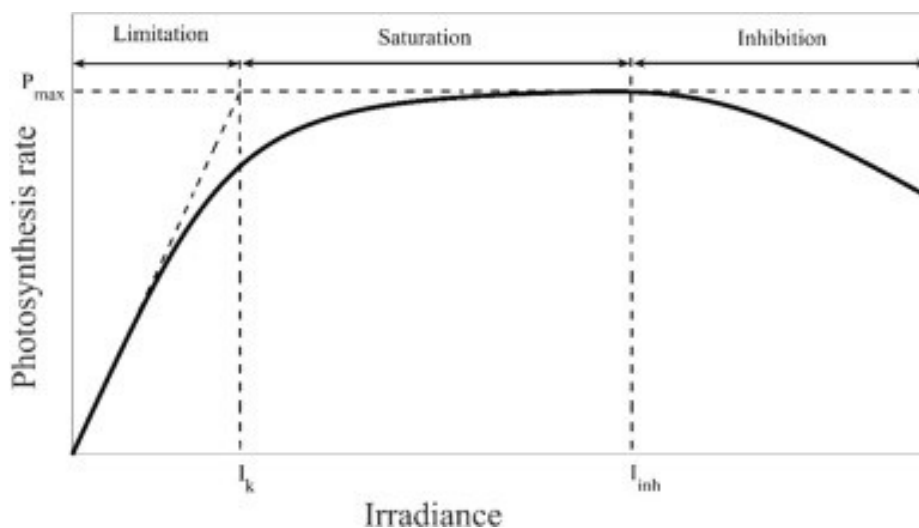


Figura 1.30. Relación entre la tasa de fotosíntesis (P) y la intensidad de luz (I) incidente, donde I_k corresponde con la intensidad de luz a partir de la cual se alcanza la saturación e I_{inh} es la intensidad de luz a partir de la cual empieza la inhibición (Darvehei et al., 2018).

Un fenómeno que tiene lugar en el interior de los cultivos de microalgas es la atenuación de la luz producido por el efecto sombra, el cual provoca una reducción de la intensidad de luz conforme los rayos atraviesan el cultivo debido a la densidad de células. Este fenómeno se suele representar mediante la Ley de Beer-Lambert (Beer, 1852), que considera una reducción de carácter exponencial representada matemáticamente según la Ec. 1.6 (ver Figura 1.31):

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-(k_a + X \cdot k_b) \cdot z} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Donde $I(z)$ [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] es la intensidad de luz a una profundidad z [m] desde la superficie donde incide la luz, I_0 [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] es la luz incidente en la superficie, k_a [m^{-1}] es el coeficiente de atenuación del medio líquido, X [$\text{g SST} \cdot \text{m}^{-3}$] es la concentración de sólidos suspendidos totales, y k_b [$\text{m}^2 \cdot \text{g SST}^{-1}$] es el coeficiente de atenuación de los sólidos suspendidos.

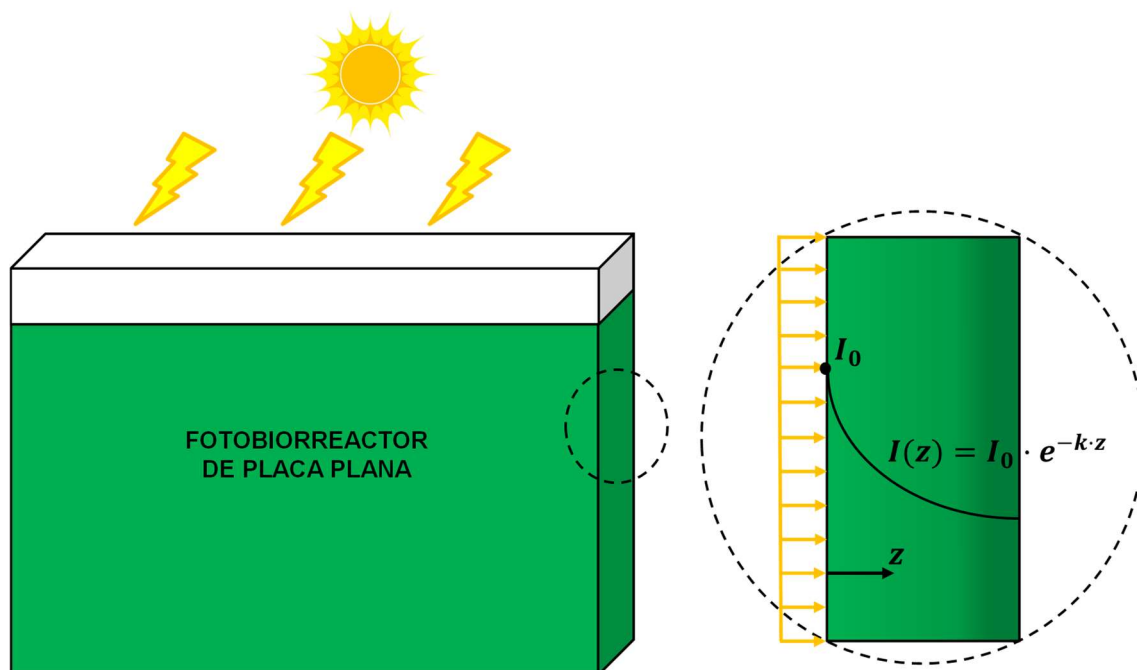


Figura 1.31. Representación de la atenuación de la luz descrita por la Ley de Beer-Lambert.

Para la modelación matemática de la luz en los modelos Tipo I, la ecuación más utilizada es la que presentaron Tamiya et al. (1953) (ver Ec. 1.7), basada en la ecuación de Monod para el crecimiento de bacterias en las aguas residuales, la cual calcula la tasa específica de crecimiento de las microalgas (μ) de la siguiente manera:

$$\mu(I) = \mu_{\max} \cdot \frac{I}{I + K_I} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Donde μ_{\max} [d^{-1}] es la velocidad máxima de crecimiento, I [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] es la intensidad de luz y K_I [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] es la constante de semisaturación para la intensidad de luz.

La ecuación introducida por Tamiya ha sido utilizada en multitud de estudios *indoor* (p.ej. Béchet et al., 2015; Lee et al., 1987; Molina-Grima et al., 1996), aunque presenta el inconveniente de que únicamente es válida en el tramo de limitación de luz (ver Figura 1.30), es decir, cuando no aparece el efecto de fotoinhibición debido a intensidades altas de luz que pueden dañar a las células.

Similar a la ecuación de Tamiya, los autores Smith (1936) y Jassby & Platt (1976) también propusieron sendas ecuaciones (Ec. 1.8 y Ec. 1.9, respectivamente) no lineales que permiten calcular el crecimiento de las microalgas teniendo en cuenta el efecto de saturación de luz:

$$\mu(I) = \mu_{\max} \cdot \frac{\alpha \cdot I}{\sqrt{\mu_{\max}^2 + (\alpha \cdot I)^2}} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

$$\mu(I) = \mu_{\max} \cdot \tanh \frac{\alpha \cdot I}{\mu_{\max}} \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Donde α [$\text{m}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$] es la pendiente inicial de la curva PI (Figura 1.30).

Existen otras expresiones para el cálculo del crecimiento de microalgas en la zona de limitación de luz (Bannister, 1979; Chalker, 1980; van Oorschot, 1955) aunque su aplicación ha sido realmente escasa.

La expresión matemática más famosa y utilizada para representar el efecto de la luz en los cultivos de microalgas es la ecuación propuesta por Steele (1962) (Ec. 1.10):

$$\mu(I) = \mu_{\max} \cdot \frac{I}{I_{\text{opt}}} \cdot e^{\left(1 - \frac{I}{I_{\text{opt}}}\right)} \quad (\text{Ec. 1.10})$$

Donde I_{opt} [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] es la intensidad de luz óptima para la especie o consorcio de microalgas que forman el cultivo.

La ecuación de Steele permite representar de manera precisa el efecto de saturación y fotoinhibición que provoca la luz en los cultivos de microalgas (ver Figura 1.30). Esta ecuación representa que a partir de una intensidad de luz óptima (I_{opt}), donde se produce el crecimiento máximo (μ_{\max}), que depende de la especie de microalgas considerada, el crecimiento empieza a verse inhibido debido al efecto de la fotoinhibición.

Similar a la ecuación de Steele para la representación matemática de los efectos de la saturación de luz y la fotoinhibición, aunque menos utilizada en la práctica, es la expresión propuesta por Peeters & Eilers (1978) (Ec. 1.11):

$$\mu(I) = \mu_{\max} \cdot \frac{2 \cdot \mu_{\max}(1 + \beta) \frac{I}{I_{\text{opt}}}}{\left(\frac{I}{I_{\text{opt}}}\right)^2 + 2 \cdot \frac{I}{I_{\text{opt}}} \cdot \beta + 1} \quad (\text{Ec. 1.11})$$

Donde β es el coeficiente de atenuación de la luz.

Otros autores también han desarrollado ecuaciones que representan el efecto de saturación y fotoinhibición (Aiba, 1982; Lee et al., 1987) pero que han sido mucho menos utilizadas en la práctica. También hay autores, como Eilers & Peeters (1993) o Geider et al. (1998) que, además de modelar estos dos efectos de la luz observados en los cultivos de microalgas, aportaron expresiones matemáticas para modelar de manera dinámica el proceso de fotosíntesis y el efecto de fotoaclimatación (explicado en el Apartado 2.3.1). Para ello, estos autores introdujeron en el modelo componentes que consideran los pigmentos fotosintéticos (la clorofila) y la historia de las células de las microalgas.

3.2.2 Modelación del efecto de la temperatura

El efecto que produce la temperatura en los cultivos de microalgas se explicó en el Apartado 2.3.2. Pocos son los modelos de microalgas que incluyen el efecto dinámico de la temperatura (variación diaria y estacional) para predecir el comportamiento de los cultivos de microalgas.

En los modelos de crecimiento de microalgas que consideran la temperatura del cultivo, la mayoría utilizan una ecuación simple de carácter exponencial (Ec. 1.12) como es la expresión propuesta por Arrhenius (1889):

$$\mu(T) = \mu_{\max} \cdot e^{\left(\frac{E_a}{kT}\right)} \quad (\text{Ec. 1.12})$$

Donde E_a [$\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2}$] es la energía de activación, k [$\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$] es la constante de Boltzmann, y T [K] es la temperatura absoluta del medio de cultivo.

La ecuación de Arrhenius ha sido ampliamente utilizada para reproducir el crecimiento bacteriano que tiene lugar en los tratamientos biológicos de una EDAR. En su aplicación para el crecimiento de microalgas, esta ecuación funciona de manera adecuada en rangos

de temperatura bajos por debajo de la temperatura óptima de crecimiento de las especies consideradas, que normalmente se encuentra en el rango 20-30°C (según la especie). No obstante, a partir de esta temperatura óptima (T_{opt}), la velocidad de crecimiento que predice esta ecuación tiende al infinito, lo cual es absurdo ya que se conoce que las microalgas sufren inhibición a temperatura elevadas (por encima de T_{opt}) debido a que éstas afectan negativamente a la actividad enzimática de las células. Para poder representar este efecto asimétrico de la temperatura en el crecimiento de las microalgas, existen dos ecuaciones (Ec. 1.13 y Ec. 1.14) que permiten ajustar fácilmente la curva simulada a los valores observados. Estas ecuaciones se presentan en la Tabla 1.7 y su representación gráfica en la Figura 1.32.

La Ec. 1.13 fue propuesta por Rosso et al. (1993) y es conocida como curva CTMI (Cardinal Temperature Model with Inflexion), y consta de tres parámetros que es necesario ajustar y tienen sentido físico: temperatura mínima de crecimiento (T_{min}), temperatura máxima de crecimiento (T_{max}) y temperatura óptima de crecimiento (T_{opt}). Por otro lado, la Ec. 1.14 fue propuesta por Ratkowsky et al. (2005) y dispone de cuatro parámetros a ajustar: a y b (que son dos parámetros para el ajuste de la curva), T_{mi} y T_{max} . Ambas ecuaciones consideran que el crecimiento por debajo de T_{min} y por encima de T_{max} es nulo. Aunque estas dos ecuaciones simulan muy bien el comportamiento de las microalgas frente a la variación de la temperatura, éstas no han sido prácticamente utilizadas en los modelos de crecimiento de microalgas, pero sí para el crecimiento de bacterias (Shoener et al., 2019).

Tabla 1.7. Ecuaciones que modelan el efecto asimétrico de la temperatura del cultivo (T), donde T_{min} [°C] y T_{max} [°C] son las temperaturas mínimas y máximas, respectivamente, a partir de las cuales el crecimiento se ve inhibido, b y c son parámetros para ajustar la curva a los datos experimentales.

Ecuación	Referencia
$\mu(T) = \mu_{max} \cdot \frac{(T - T_{max}) \cdot (T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})^2 \cdot (T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max}) \cdot (T_{opt} - T_{min} - 2T)}$	(Ec. 1.13) Rosso et al. (1993)
$\mu(T) = \mu_{max} \cdot (b \cdot (T - T_{min}))^2 \cdot (1 - e^{c \cdot (T - T_{max})})$	(Ec. 1.14) Ratkowsky et al. (2005)

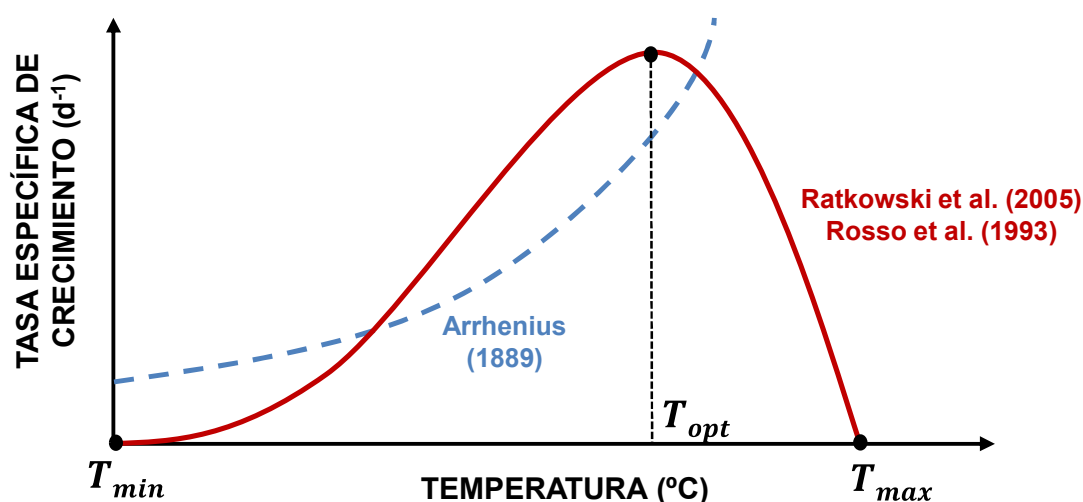


Figura 1.32. Representación gráfica de las curvas generadas por las ecuaciones de modelos de microalgas que consideran el efecto de la temperatura.

Existen algunos autores que han intentado modelar la interdependencia de la luz y la temperatura mediante la aplicación de un modelo acoplado. Por ejemplo, Dermoun et al. (1992) propusieron la siguiente expresión (Ec. 1.15) que calcula el crecimiento de las microalgas teniendo en cuenta que la tasa de crecimiento máxima y la intensidad de luz óptima son funciones que dependen de la temperatura:

$$\mu(T, I) = 2 \cdot \mu_{max}(T)(1 + \beta_I) \cdot \frac{\frac{I}{I_{opt}(T)}}{1 + 2\beta_I \cdot \frac{I}{I_{opt}(T)} + \left(\frac{I}{I_{opt}(T)}\right)^2} \quad (\text{Ec. 1.15})$$

Donde $\mu_{max}(T)$ [d^{-1}] es la tasa máxima de crecimiento específico a una temperatura T [$^{\circ}C$], β_I es una constante, I [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] es la intensidad de luz incidente, y $I_{opt}(T)$ [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] es la intensidad de luz óptima para la fotosíntesis a una temperatura T [$^{\circ}C$].

Por otro lado, el efecto de la aclimatación a la temperatura (explicado en el Apartado 2.3.2) de los cultivos de microalgas que han reportado algunos autores (p.ej. de-Bashan et al., 2008; Zhu et al., 2013) no ha sido tenido en cuenta en ninguno de los modelos mecanicistas consultados en el desarrollo de esta tesis doctoral.

3.2.3 Modelación del efecto de la concentración de nutrientes

Como se ha explicado en el Apartado 0, los principales nutrientes que afectan al crecimiento de las microalgas son el N, P y C inorgánico.

La mayoría de los estudios desarrollados con cultivos de microalgas ponen de manifiesto que la tasa de asimilación de nutrientes depende directamente de la concentración de estos nutrientes en el medio de cultivo, siendo esta tasa de asimilación proporcional a la concentración de nutrientes disponibles hasta que dicha concentración alcanza un valor a partir del cual el crecimiento se ve ralentizado. Para representar este comportamiento, la mayoría de los modelos de microalgas desarrollados han utilizado la conocida función de Monod (1949) para describir la tasa específica de crecimiento de las microalgas (μ) y que viene representada por la siguiente expresión (Ec. 1.16):

$$\mu(S) = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_S} \quad (\text{Ec. 1.16})$$

Donde μ_{\max} [d^{-1}] es la velocidad máxima de crecimiento, S [$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$] es la concentración de sustrato (N, P, CO_2 , etc.) presente en el medio de cultivo, y K_S [$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$] es la constante de semisaturación para el sustrato considerado, es decir, aquella concentración de sustrato que permite desarrollar un crecimiento igual a $\mu_{\max}/2$.

La Tabla 1.8 muestra un resumen bibliográfico de diversos autores que han modelado la toma de nutrientes presentes en el medio de cultivo mediante una función de Monod:

Tabla 1.8. Referencias de modelos matemáticos de crecimiento de microalgas que han considerado la ecuación de Monod.

Sustrato	Especie de microalgas	Referencia
Nitrógeno	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Thalassiosira pseudinana</i>	Marsullo et al. (2015)
Nitrógeno	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Chlorella</i> sp.	Eriksen et al. (2006)
Nitrógeno	<i>Scenedesmus</i> sp.	Solimeno et al. (2015)
Nitrógeno	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Zambrano et al. (2016)
Nitrógeno, Fósforo	Diatomeas Cianobacterias <i>Chrysophyceae</i> Consorcio microalgas	Haario et al. (2009)
Nitrógeno, Fósforo	<i>Scenedesmus</i> sp.	Xin et al. (2010)
Fósforo	<i>Scenedesmus</i> sp. <i>Micractinium</i> sp.	Wang et al. (2014b)
Fósforo	<i>Micropcystis aeruginosa</i>	Chen et al. (2015a)
Nitrógeno, Fósforo	<i>Spirulina platensis</i> .	Concas et al. (2010)
Nitrógeno, Fósforo, CO ₂	Consorcio microalgas	Broekhuizen et al. (2012)
Fósforo, CO ₂	<i>Chlamydomonas acidophila</i>	Spijkerman et al. (2011)
CO ₂	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Goldman et al. (1974)
CO ₂	<i>Chlorella</i> sp. <i>Oscillatoria</i> sp.	Novak & Brune (1985)

A pesar del uso extensivo de la ecuación de Monod en los modelos de microalgas, esta ecuación falla cuando aparece el efecto inhibitor de un sustrato cuando éste se encuentra en altas concentraciones. Este efecto inhibitor se ha constatado, por ejemplo, en cultivos de microalgas con alta presencia de amonio (Collos & Berges, 2004; Park et al., 2010).

En estos casos, la función de Andrews o Andrews-Haldane (Andrews, 1968; Haldane, 1930) (Ec.1.17) consigue representar adecuadamente el crecimiento de las microalgas a los datos observados mediante la adición de una constante de inhibición (K_I [$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$]) a la función de Monod (ver Figura 1.33A):

$$\mu(S) = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (\text{Ec. 1.17})$$

Diversos autores han utilizado la función de Andrews-Haldane en la modelación del crecimiento de microalgas. Lee & Zhang (2016) utilizaron esta función para introducir el efecto inhibitor del amonio en altas concentraciones, mientras que Chen & Johns (1994) y Moya et al. (1997) la introdujeron para la inhibición por acetato en la modelación del crecimiento heterótrofo de microalgas.

Otra ecuación importante en la modelación de microalgas es la ecuación propuesta por Droop (1968) que introdujo el concepto del almacenamiento intracelular de nutrientes. Durante la experimentación desarrollada por este autor con cultivos de microalgas *Monochrysis lutheri* para el estudio del consumo de Vitamina B12, éste observó que la cinética de crecimiento no dependía tanto de la concentración de vitamina presente en el medio de cultivo, sino de la “Quota” o concentración de vitamina almacenada intracelularmente (Q [$\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$]) respecto a la concentración mínima de vitamina para la subsistencia celular (q [$\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$]). La expresión que propuso Droop para simular el crecimiento teniendo en cuenta la cantidad de sustrato almacenado intracelularmente es la que se presenta en la Ec. 1.18. La Figura 1.33B muestra la relación entre la tasa específica de crecimiento y el contenido intracelular del sustrato considerado (Q).

$$\mu(S) = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{q}{Q}\right) \quad (\text{Ec. 1.18})$$

Algunos autores que consideraron en sus modelos la ecuación de Droop fueron Ambrose (2006), Bougaran et al. (2010), Guest et al. (2013), Kwon et al. (2013) y Wágner et al. (2016), los cuales consideraron mediante esta función la acumulación interna de N y P. Otros autores sólo consideraron el almacenamiento de uno de los nutrientes en sus modelos mediante la ecuación de Droop:

- **Acumulación de N:** Benavides et al., (2015), Mairet et al. (2011), Quinn et al. (2011).
- **Acumulación de P:** Grover (1991), Nan & Dong (2004), Yamamoto et al. (2012).

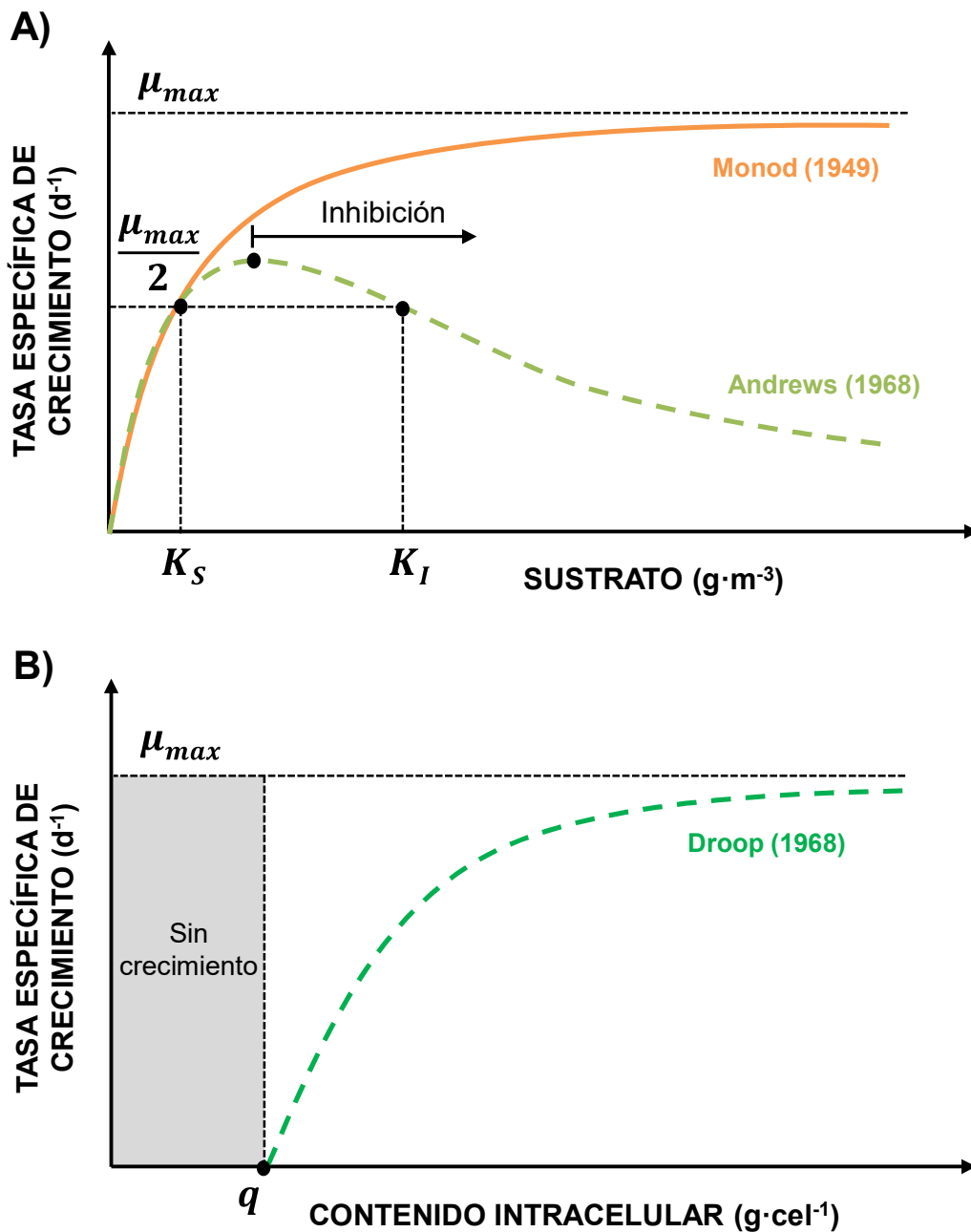


Figura 1.33. Funciones básicas en la modelación del crecimiento de las microalgas según la cantidad de sustrato: (A) Funciones de Monod y Andrews; (B) Función de Droop.

Siguiendo el concepto de almacenamiento intracelular de nutrientes, diversos autores trataron de modelar el fenómeno de *luxury uptake* de P (Powell et al., 2009), que es el proceso mediante el cual las microalgas son capaces de absorber del medio mucha más cantidad de P del que necesitan para su crecimiento y son capaces de almacenarlo intracelularmente en forma de polifosfato (Poly-P) como reservas para ser consumido en condiciones de limitación de P en el medio. Por ejemplo, Ruiz-Martínez et al. (2014, 2015a) utilizaron la función de regulación alostérica de Hill (Ec. 1.19) para modelar la acumulación de P y poder simular el *luxury uptake* observado en experimentos de laboratorio con cultivos de microalgas, obteniendo muy buenos resultados de ajuste de la curva:

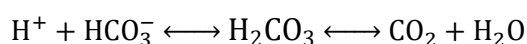
$$\frac{dS_{PO4}}{dt} = K_{max} \cdot \frac{K_{XPP}^n}{K_{XPP}^n + \left(\frac{X_{PP}}{X_{ALG}}\right)^n} \quad (\text{Ec. 1.19})$$

Donde X_{PP}/X_{ALG} [g P·g SST⁻¹] es el contenido intracelular de Poly-P, K_{max} [g P·m⁻³·d⁻¹] es la velocidad máxima de almacenamiento de Poly-P, K_{XPP} [g P·g SST⁻¹] es la constante de semisaturación del X_{PP}/X_{ALG} , es decir, aquel valor de X_{PP}/X_{ALG} que reduce a la mitad la velocidad de acumulación de Poly-P, y n es el número de Hill o el coeficiente de regulación.

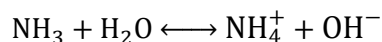
3.2.4 Modelación del efecto del pH

Como se ha explicado en el 2.3.3, el pH del medio de cultivo es un factor importante que afecta también al crecimiento de las microalgas. Por lo general, el impacto del pH en los cultivos de microalgas es limitado cuando el rango de pH del medio se encuentra entre 5-8,5 (Shoener et al., 2019), siendo este el rango de valores donde normalmente se encuentra el pH óptimo para el crecimiento de las diferentes especies de microalgas. Valores de pH < 3 y pH > 9 pueden limitar de manera drástica el crecimiento de las microalgas.

Hay que tener en cuenta que el pH varía en función del equilibrio ácido-base de las diferentes especies que se encuentran en la fase líquida, como por ejemplo las relacionadas con el CO₂ (Reacción 1.6) o NH₄⁺ (Reacción 1.7):



Reacción 1.6. Equilibrio ácido-base del carbono inorgánico disuelto.



Reacción 1.7. Equilibrio ácido-base del amonio.

Por tanto, cuando las microalgas consumen CO_2 o NH_4^+ disueltos, alteran el equilibrio ácido-base y se produce una variación de pH. Esta variación del pH puede ser muy importante durante la fotosíntesis en cultivos *outdoor* cuando la luz solar que llega al cultivo es muy elevada debido al consumo de CO_2 , pudiendo disparar el pH por encima de 9, lo que puede producir un efecto adverso en el crecimiento de las microalgas al favorecer el *stripping* de amoníaco a la atmósfera y la precipitación de ortofosfatos. Por esta razón, en cultivos *outdoor* es tan importante la inyección de una fuente de CO_2 a través del sistema de aireación para el control del pH.

A pesar de la importancia del cálculo del pH y del equilibrio ácido-base en los cultivos, son muy pocos los modelos de microalgas desarrollados que introducen este cálculo en sus ecuaciones (Darvehei et al., 2018; Shoener et al., 2019). La mayoría de los modelos que simulan el pH lo hacen suponiendo que este es función únicamente del bicarbonato (HCO_3^-) presente en el sistema (p.ej. Decostere et al., 2016 y Fernández et al., 2010).

Uno de los modelos matemáticos referencia para simular el crecimiento de las microalgas es el River Water Quality Model 1 (RWQM1) desarrollado por Reichert et al. (2001). Este modelo utiliza un sistema de ecuaciones diferenciales para modelar el equilibrio ácido-base para el C inorgánico, el amonio y el fosfato. Este método fue posteriormente mejorado por Broekhuizen et al. (2012), quienes introdujeron un sistema de ecuaciones diferencial-algebraicas para el cálculo del pH mediante la introducción de un balance de cargas en el sistema.

Un método también muy interesante para el cálculo de la variación del pH es el que proponen Serralta et al. (2004) para la modelación del tratamiento de aguas en un sistema de fangos activados. Este método consiste en calcular el equilibrio ácido-base de todas

las especies que pueden encontrarse en la fase líquida e introducir un balance de protones y alcalinidad. Serralta et al. (2004) modelaron el efecto del pH en el crecimiento de las bacterias PAO mediante la Ec. 1.20 que resulta de una combinación de la cinética de Monod y de la inhibición no competitiva para la concentración de protones:

$$f_{\text{pH}} = \frac{\frac{S_H}{S_H + K_{S,H}} \cdot \frac{K_{I,H}}{S_H + K_{I,H}}}{\frac{S_{H,\text{opt}}}{S_{H,\text{opt}} + K_{S,H}} \cdot \frac{K_{I,H}}{S_{H,\text{opt}} + K_{I,H}}} \quad (\text{Ec. 1.20})$$

Donde S_H [mol $\text{H}^+ \cdot \text{L}^{-1}$] representa la concentración de protones libres, $K_{S,H}$ [mol $\text{H}^+ \cdot \text{L}^{-1}$] y $K_{I,H}$ [mol $\text{H}^+ \cdot \text{L}^{-1}$] son las constantes de semisaturación e inhibición para el S_H , respectivamente, y $S_{H,\text{opt}}$ representa la concentración óptima de S_H obtenida a partir de la Ec. 1.21:

$$S_{H,\text{opt}} = \sqrt{K_{S,H} \cdot K_{I,H}} \quad (\text{Ec. 1.21})$$

La Ec. 1.20 podría ser perfectamente utilizada para simular el efecto del pH en el crecimiento de las microalgas.

3.2.5 Modelos existentes para el crecimiento de microalgas que consideran varios factores

Los modelos desarrollados para simular el crecimiento de microalgas que pueden consultarse en la bibliografía varían mucho en complejidad, desde los que sólo modelan la influencia de una única variable en el crecimiento de las microalgas, hasta modelos que incorporan la influencia de múltiples variables como serían la luz, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, el pH, etc.

A pesar de la mayor complejidad que suponen los modelos que introducen la influencia de múltiples factores en el crecimiento de las microalgas, estos son la mejor opción cuando se intentan aplicar a cultivos de microalgas a gran escala en cultivos de *outdoor*, donde las condiciones ambientales (disponibilidad de nutrientes, luz, temperatura, etc.)

presentan una alta variabilidad, tanto a nivel diario como estacional, y se combinan los efectos de diferentes factores en el crecimiento de las microalgas.

La revisión bibliográfica para el desarrollo de esta tesis pone de manifiesto que no existe un consenso en la estructura y formulación que deben cumplir los modelos matemáticos para el crecimiento de microalgas, y que no existe tampoco un modelo global que incorpore el efecto de todos los factores bióticos y abióticos identificados como significativos en los cultivos de microalgas.

Por ejemplo, el modelo PHOBIA (Wolf et al., 2007) es un modelo de biofilm que considera el crecimiento conjunto de bacterias (heterótrofas, nitrificantes y fotoautótrofas) y microalgas para el tratamiento de aguas residuales. El modelo PHOBIA considera el crecimiento de microalgas a partir de N soluble (amonio y nitrato), pero no tiene en cuenta el P (ortofosfatos) en el crecimiento, lo que supone una limitación de este modelo para simular el tratamiento terciario de una EDAR. Además, este modelo introduce el efecto de la luz en el crecimiento de las microalgas a través de la ecuación de Peeters & Eilers, pero no considera el efecto de la temperatura.

Por otro lado, el modelo RWQM1 (River Water Quality Model 1) modificado que desarrollaron Broekhuizen et al. (2012) permite simular un sistema de cultivo de microalgas tipo *raceway*, considerando los efectos del pH y el sustrato (N, P y C inorgánico), pero no tiene en cuenta el efecto de la temperatura que puede afectar de manera importante en los cultivos *outdoor*. Tanto el modelo PHOBIA como el RWQM1 calculan la biomasa de las microalgas como DQO ($\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$), lo que permite el cierre de los balances de materia entre los diferentes componentes orgánicos y grupos de microorganismos considerados. Sin embargo, en ambos modelos, el crecimiento a partir de nutrientes se describe mediante una cinética de Monod, sin tener en cuenta el almacenamiento interno de nutrientes, ni el crecimiento a partir de estos nutrientes almacenados. Otros autores como Ambrose et al. (2006), Guest et al. (2013), Bernard et al. (2009) y Wágner et al. (2016) sí que consideran el almacenamiento interno de nutrientes (N y/o P) mediante la introducción de la función de Droop en el proceso de crecimiento de microalgas.

Bernard et al. (2009) propusieron un modelo matemático para la simulación de un fotobiorreactor que incorpora la limitación de luz según la Ley de Beer-Lambert que tiene en consideración la limitación de luz por el efecto sombra en el interior de los cultivos de microalgas. Según Bernard et al. (2009), el crecimiento de las microalgas depende de la intensidad de luz que recibe el cultivo y de la disponibilidad de nitrógeno almacenado intracelularmente. Sin embargo, este modelo no considera otros factores importantes como la temperatura y la concentración de fósforo disponible.

Wágner et al. (2016) desarrollaron un modelo (el ASM-A) bastante completo de crecimiento de microalgas basado en la estructura de formato y notación utilizada en los modelos ASM (Activated Sludge Models) publicados por Henze et al. (2000). La utilización de este formato y notación es muy interesante ya que ha sido ampliamente utilizada y testada en el tratamiento de aguas, ofreciendo un consenso generalizado en la nomenclatura de variables, definición de los procesos, definición de matrices del modelo, etc., además de dejar la puerta abierta a un futuro nexo con un modelo global que permita simular conjuntamente los procesos desarrollados por las microalgas y bacterias en el tratamiento de aguas residuales, así como su interacción. El modelo ASM-A considera el crecimiento fotoautótrofo y heterótrofo de las microalgas. Además, este modelo introduce el concepto de que el crecimiento y la toma de nutrientes son procesos desacoplados, de manera que sólo contempla el crecimiento a partir de los nutrientes almacenados internamente. Si bien el modelo ASM-A tiene en cuenta el efecto de la luz en el crecimiento fotoautótrofo a través de una función de Steele que incluye el fenómeno de la fotoinhibición, deja fuera del modelo el efecto de la temperatura.

Otro modelo de microalgas interesante es el propuesto por Solimeno et al. (2015), que incluye en el modelo los efectos del sustrato disponible (N y C inorgánico) usando la función de Monod, la temperatura mediante una función desarrollada por Dauta et al. (1990) y la luz mediante la función de Peeters & Eilers. No obstante, el modelo no considera la acumulación interna de nutrientes ni el fósforo en el crecimiento. Además, tanto el modelo de Solimeno et al. (2015) como el de Bernard et al. (2009) han sido validados en experimentos de laboratorio y considerando como medio de cultivo de microalgas agua residual sintética. Es conocido que las tasas de eliminación de nutrientes y producción de biomasa a escala laboratorio, en condiciones controladas, y utilizando agua residual sintética son muy distintas a los valores que se obtendrían en cultivos a gran

escala en condiciones *outdoor* y utilizando agua residual real, por lo que es posible que los modelos matemáticos no sean del todo fiables en condiciones distintas a las utilizadas durante la validación. En general, la mayoría de los modelos de microalgas consultados no llevan a cabo incluso el proceso de validación del modelo. También es importante remarcar que, en la mayoría de los modelos de microalgas, los parámetros se calibran en experimentos de laboratorio, en condiciones controladas *indoor*, donde sólo uno o dos factores varían para poder estudiar el efecto de estos factores por separado. Este proceso de calibración puede resultar en valores de parámetros que luego no superen el proceso de validación en cultivos de microalgas a gran escala *outdoor*, que es la aplicación más interesante de los modelos de microalgas para simular el proceso de recuperación de residuos de las aguas residuales.

Por otro lado, resulta importante considerar los procesos de transferencia de masa entre las fases líquida y gas (*stripping*) que puede darse en los cultivos de microalgas. Esta importancia radica sobre todo en los procesos de *stripping* relacionados con los componentes CO_2 y NH_3 , puesto que estos componentes pueden afectar significativamente al equilibrio químico ácido-base y al pH del cultivo, y estos, a su vez, afectar al proceso de crecimiento de las microalgas como se ha comentado en el 3.2.4. Según el trabajo desarrollado por Shoener et al. (2019), quienes analizaron más de 300 modelos de microalgas distintos, sólo el 17% de los trabajos incorporaban el proceso de *stripping* en su formulación, y sólo el 13% incluía el cálculo del equilibrio químico ácido-base y el efecto del pH.

La Tabla 1.9 recoge un resumen de los modelos matemáticos para cálculo del crecimiento de microalgas desarrollados por diferentes autores y que se han comentado anteriormente. Todos los modelos de la Tabla 1.9 contemplan el crecimiento fotoautótrofo (que es el que principalmente desarrollan las microalgas), y se indica también aquellos modelos que consideran el crecimiento heterótrofo. También se detallan las variables que contemplan los distintos modelos (sustratos –N, P y C inorgánico–, luz, temperatura y pH) y se indica la función escogida para modelar la toma de nutrientes (Monod o Droop) y el efecto de la luz (Tamiya, Andrews, Steele, Peeters & Eilers, Jassby & Platt o Smith). Por último, en la Tabla 1.9 se indican aquellos modelos de microalgas que contemplan el crecimiento conjunto con bacterias (consorcios de microalgas-bacterias) y el proceso de *stripping* de gases.

Tabla 1.9. Revisión bibliográfica de modelos matemáticos para el cálculo del crecimiento de las microalgas, incluyendo las variables que contemplan y la función utilizada para modelar el efecto del sustrato y de la luz (P&E: Peeters & Eilers; J&P: Jassby & Platt).

Modelos	Crecimiento autótrofo											Crecimiento heterótrofo	T ^a	pH	Crecimiento bacterias	Stripping de gases
	Nutrientes				C inorgánico	Luz										
	Droop	Monod	Acumulación N	Acumulación P		Tamiya	Andrews	Steele	P&E	P&J	Smith					
Ambrose et al. (2006)																
Wolf et al. (2007)																
Broekhuizen et al. (2012)																
Guest et al. (2013)																
Bernard et al. (2009)																
Zambrano et al. (2016)																
Solimeno et al. (2015)																
Wagner et al. (2016)																

En esta tesis doctoral se presenta un modelo novedoso para la simulación del crecimiento de microalgas y la recuperación de nutrientes de las aguas residuales, que considera los siguientes factores y procesos:

- Los nutrientes esenciales para el crecimiento (N, P y C inorgánico).
- El proceso de almacenamiento interno de polifosfatos en condiciones de abundancia de P (*luxury uptake*) y el crecimiento de las microalgas en dos condiciones distintas dependiendo de la disponibilidad de P en el medio: (1) crecimiento a partir de ortofosfato en condiciones de abundancia de P, y (2) crecimiento a partir de los polifosfatos acumulados internamente en condiciones de escasez de P.
- El efecto de la luz, el fenómeno de auto-sombra (*self-shading*) y la fotoinhibición.
- El efecto de la temperatura.
- El cálculo del equilibrio químico ácido-base y del pH.
- Los procesos de desabsorción o *stripping* de gases (CO₂, O₂, NH₃).

Los procesos de calibración y validación de este modelo de microalgas han sido desarrollados a partir de datos obtenidos en un fotobiorreactor de membranas (MPBR) a escala piloto para el tratamiento de agua residual real, en concreto del efluente de un sistema AnMBR.

REFERENCIAS

- Abe, K., Imamaki, A., Hirano, M., 2002. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. J. Appl. Phycol. 14 (2), 129–134. <https://doi.org/10.1023/A:1019599216554>
- Acién-Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., María, J., 2018. Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. Front. Sustain. Food Syst. 2:59. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00059>
- Acién-Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M.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? Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 9013–9022. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Aiba, S., 1982. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms: in microbial reactions. Adv. Biochem. Eng. 23, 85–156. <https://doi.org/10.1515/9783112620748-003>
- Ali, S.S., El-Sheekh, M., Manni, A., Ruiz, H. A., Elsamahy, T., Sun, J., Schagerl, M., 2022. Microalgae-mediated wastewater treatment for biofuels production: A comprehensive review. Microbiol. Res. 265, 127187. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127187>
- Alkarawi, M.A.S., Caldwell, G.S., Lee, J.G.M., 2018. Continuous harvesting of microalgae biomass using foam flotation. Algal Res. 36, 125–138. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.018>
- Almomani, F.A., Örmeci, B., 2016. Performance Of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris Oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate, Ecol. Eng. 95, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.038>
- Ambrose, R.B., 2006. WASP7 Benthic Algae-Model Theory and User's Guide: US Environmental Protection Agency. Office of Research and Development, USA.
- Amit, Nayak, J.K., Ghosh., U.K., 2020. Microalgal remediation of anaerobic pretreated pharmaceutical wastewater for sustainable biodiesel production and electricity generation J. Water Process Eng., 35, Article 101192, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101192>
- Andrews, J.F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. Biotechnol. Bioeng. 10, 707–723. <https://doi.org/10.1002/bit.260100602>
- Anye Cho, B., Carvalho Servia, M.Á., Del Río Chanona, E.A., Smith, R., Zhang, D., 2021. Synergising biomass growth kinetics and transport mechanisms to simulate light/dark cycle effects on photo-production systems. Biotechnol. Bioeng., 118 (5), 1932–1942. <https://doi.org/10.1002/bit.27707>

- Arbib, Z., de Godos, I., Ruiz, J., Perales, J.A., 2017. Optimization of pilot high rate algal ponds for simultaneous nutrient removal and lipids production. *Sci. Total Environ.* 589, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.206>
- 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. *Ecol. Eng.*, 52, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.089>
- Arrhenius, S., 1889. Über die Dissociationswärme und den Einfluss der Temperatur auf den Dissociationsgrad der Elektrolyte. *Z. Phys. Chem.* 4U, 96–116. <https://doi.org/10.1515/zpch-1889-0408>
- Arutselvan, C., Seenivasan, H.K., Lewis Oscar, F., Ramya, G., Thuy Lan Chi, N., Pugazhendhi, A., Thajuddin, N., 2022. Review on wastewater treatment by microalgae in different cultivation systems and its importance in biodiesel production *Fuel*, 324, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124623>
- Asulabh, K.S., Supriya, G., Ramachandra, T.V., 2012. Effect of salinity concentrations on growth rate and lipid concentration in *Microcystis* sp., *Chlorococcum* sp. and *Chaetoceros* sp. In: LAKE: National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems, pp. 27–32.
- Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., Cetecioglu, Z., 2018. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresource Technology*, 268, pp. 773–786. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.042>
- Babaei, A., Mehrnia, M.R., Shayegan, J., Sarrafzadeh, M.H., 2016. Comparison of different trophic cultivations in microalgal membrane bioreactor containing N-riched wastewater for simultaneous nutrient removal and biomass production. *Process Biochemistry* 51(10), 1568–1575. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.011>
- Bahadar, A., Bilal Khan, M., 2013. Progress in energy from microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, pp. 128–148. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.029>
- Baker, M.D., Mayfield, C.I., Inniss, W.E., Wong, P.T.S., 1983. Toxicity of pH, heavy metals and bisulfite to a freshwater green alga, *Chemosphere* 12, 35–44. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(83\)90177-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(83)90177-7)
- Baldev, E., Mubarak Ali, D., Pugazhendhi, A., Thajuddin, N., 2021. Wastewater as an Economical and Ecofriendly green Medium for Microalgal Biofuel Production. *Fuel* 294, 120484. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120484>
- Bannister, T., 1979. Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation. *Limnol. Oceanogr.* 24(1), 76–96. <https://doi.org/10.4319/lo.1979.24.1.0076>

CAPÍTULO 1

- Barbera, E., Bertucco, A., Kumar, S., 2018. Nutrients recovery and recycling in algae processing for biofuels production. *Renew. Sust. Energy Rev.* 90, 28–42. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.004>
- Batista, A.P., Ambrosano, L., Graca, S., Sousa, C., Marques, P.A., Ribeiro, B., Botrel, E.P., Castro Neto, P., Gouveia, L., 2015. Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production - An integrated microalgae-based approach. *Bioresource Technology*, 184, pp. 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.064>
- Batstone, D.J., Hülsen, T., Mehta, C.M., Keller, J., 2015. Platforms for energy and nutrient recovery from domestic wastewater: A review. *Chemosphere* 140, 2–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.021>
- Béchet, Q., Chambonnière, P., Shilton, A., Guizard, G., Guieysse, B., 2015. Algal productivity modeling: a step toward accurate assessments of full-scale algal cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 987–96. <https://doi.org/10.1002/bit.25517>
- Béchet, Q., Shilton, A., Guieysse, B., 2013. Modeling the effects of light and temperature on algae growth: state of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnol. Adv.* 31(8), 1648–63. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Beer, A., 1852. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Ann. Phys.* 162, 78–88. <https://doi.org/10.1002/andp.18521620505>
- Behera, B., Acharya, A., Gargey, I.A., Aly, N., Balasubramanian, P., 2018. Bioprocess engineering principles of microalgal cultivation for sustainable biofuel production. *Bioresour. Technol. Reports* 5, 297–316. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.08.001>
- Bekirogullari, M., Figueroa-Torres, G.M., Pittman, J.K., Theodoropoulos, C., 2020. Models of microalgal cultivation for added-value products - a review. *Biotechnol. Adv.* 44, Article 107609, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107609>
- Benavides, M., Hantson, A.-L., Van Impe, J., Vande Wouwer, A., 2015. Parameter identification of Droop model: an experimental case study. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 1783–1793. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1419-2>
- Benner, P., Meier, L., Pfeffer, A., Krüger, K., Oropeza Vargas, J.E., Weuster-Botz, D., 2022. Lab-scale photobioreactor systems: principles, applications, and scalability. *Bioprocess Biosyst Eng* 45, 791–813. <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02711-1>
- Bernard, O., 1995. Etude expérimentale et théorique de la croissance de *Dunaliella tertiolecta* (chlorophyceae) soumise à une limitation variable de nitrate: utilisation de la dynamique transitoire pour la conception et la validation des modèles. PhD Thesis. University Pierre et Marie Curie, France.

- Bernard, O., Masci, P., Sciandra, A., 2009. A photobioreactor model in nitrogen limited conditions, in: MATHMOD 09 Vienna. pp. 1521–1530. <https://hal.science/hal-03523391>
- Beuckels, A., Smolders, E., Muylaert, K., 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bhatnagar, A., Bhatnagar, M., Chinnasamy, S., Das, K.C., 2010. *Chlorella minutissimada* - promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161, 523–536. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8771-0>
- Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T., Shelef, G., 2009. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – response surface methodology analysis. *Energy Convers Manage*, 50, pp. 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.09.024>
- Binnal, P., Babu, P.N., 2017. Optimization of environmental factors affecting tertiary treatment of municipal wastewater by *Chlorella protothecoides* in a lab scale photobioreactor. *Journal of Water Process Engineering* 17, 290–298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.05.003>
- Bohra, V., Ahamad, K.U., Kela, A., Vaghela, G., Sharma, A., Deka, B.J., 2022. Energy and resources recovery from wastewater treatment systems. *Clean Energy and Resource Recovery*, pp. 17–36, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-90178-9.00007-X>
- Bougaran, G., Bernard, O., Sciandra, A., 2010. Modeling continuous cultures of microalgae colimited by nitrogen and phosphorus. *J. Theor. Biol.* 265, 443–54. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.04.018>
- Braga, V.S., Mastrantonio, D.J.S., Costa, J.A.V., Morais, M.G., 2018. Cultivation strategy to stimulate high carbohydrate content in *Spirulina* biomass. *Bioresour. Technol.*, 269, pp. 221–226, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.105>
- Brindley, C., Garcia-Malea, M.C., Acién-Fernández, F.G., Fernandez, J.M., Garcia, J.L. and Molina, E., 2004. Influence of Power Supply in the Feasibility of *Phaeodactylum Tricornutum* Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 87, 723–733. <https://doi.org/10.1002/bit.20179>
- Broekhuizen, N., Park, J.B.K., McBride, G.B., Craggs, R.J., 2012. Modification, calibration and verification of the IWA River Water Quality Model to simulate a pilot-scale high rate algal pond. *Water Research* 46, 2911–2926. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.011>
- Butterwick, C., Heaney, S.I., Talling, J.F., 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. *Freshwater Biology*, 50(2), 291–300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01317.x>

CAPÍTULO 1

- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresour. Technol.* 181, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renew. Sust. Energy Rev.* 19, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Chai W.S., Tan W.G., Halimatul Munawaroh H.S., Gupta V.K., Ho S.-H., Show P.L., 2021. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. *Environ. Pollut.*, 269, Article 116236. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116236>
- Chalker, B.E., 1980. Modeling light saturation curves for photosynthesis: an exponential function. *J. Theor. Biol.* 84(2). 205–215. [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(80\)80004-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(80)80004-x)
- Chang, J. S., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Tan, C. H., Nagarajan, D., Phong, W. N., 2017. Photobioreactors. *Current developments in biotechnology and bioengineering*, Elsevier (2017), pp. 313–352. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00011-2>
- Chanquia, S.N., Vernet, G., Kara, S., 2021. Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives. *Eng. Life Sci.* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100070>
- Cheah, W.W.Y., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., Juan, J.C., 2015. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresour. Technol.*, 184, pp. 190–201, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.026>
- Cheah, W.Y., Show, P.L., Yap, Y.J., Mohd Zaid, H.F., Lam, M.K., Lim, J.W., 2020. Enhancing Microalga *Chlorella Sorokiniana* CY-1 Biomass and Lipid Production in palm Oil Mill Effluent (POME) Using Novel-Designed Photobioreactor. *Bioengineered* 11, 61–69. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1704536>
- Chen, F., Johns, M.R., 1994. Substrate inhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* by acetate in heterotrophic culture. *Process Biochem.* 29, 245–252. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80064-2](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80064-2)
- Chen, G.Q., 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38, 2434–2446. <https://doi.org/10.1039/b812677c>
- Chen, M., Fan, M., Liu, R., Wang, X., Yuan, X., Zhu, H., 2015a. The dynamics of temperature and light on the growth of phytoplankton. *J. Theor. Biol.* 385, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.07.039>
- Chen, W.H., Lin, B.J., Huang, M.Y., Chang, J.S., 2015b. Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: A review. *Bioresour. Technol.* 184, 314–327. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.11.050>

- Chen, Z., Shao, S., He, Y., Luo, Q., Zheng, M., Zheng, M., 2020. Nutrients Removal from Piggery Wastewater Coupled to Lipid Production by a Newly Isolated Self-Flocculating Microalga *Desmodesmus* Sp. PW1. *Bioresour. Technol.* 302, 122806. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122806>
- Chiranjeevi, P. and Mohan, S.V., 2016. Critical Parametric Influence on Microalgae Cultivation towards Maximizing Biomass Growth with Simultaneous Lipid Productivity. *Renewable Energy*, 98, 64–71 <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.063>
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Chen, T.Y., Chang, Y.B., Kuo, C.M., Lin, C.S., 2014. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresour. Technol.* 184, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.080>
- Chowdury, K.H., Nahar, N., Deb, U.K., 2020. The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for Biofuel Production: A Review. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering*, 9(4), 185–215. <https://doi.org/10.4236/cweee.2020.94012>
- Collos, Y., Berges, J.A., 2004. Nitrogen metabolism in phytoplankton. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Oxford: EOLSS Publishers, Oxford, UK.
- Concas, A., Pisu, M., Cao, G., 2010. Novel simulation model of the solar collector of BIOCOIL photobioreactors for CO₂ sequestration with microalgae. *Chem. Eng. J.* 157, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.059>
- Cordell, D., Drangert, J.-O., White, S., 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob. Environ. Chang.*, 19 (2), pp. 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Dahmani, S., Zerrouki, D., Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F., 2016. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in outdoor open raceway pond using domestic wastewater as medium in arid desert region *Bioresour. Technol.*, 219, pp. 749–752. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.019>
- Dang, B.T., Bui, X.T., Nguyen, T.T., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Lin, C., Chen, S.S., 2023. Effect of biomass retention time on performance and fouling of a stirred membrane photobioreactor. *Sci. Total Environ.* 864, Article 161047. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161047>
- Darestani, M., Haigh, V., Couperthwaite, S.J., Millar, G.J., Nghiem, L.D., 2017. Hollow fibre membrane contactors for ammonia recovery: Current status and future developments. *J. Environ. Chem. Eng.*, 5, pp. 1349–1359, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.02.016>

CAPÍTULO 1

- Darvehei, P., Bahri, P.A., Moheimani, N.R., 2018. Model development for the growth of microalgae: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 97, pp. 233–258. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027>
- Dauta, A., Devaux, J., Piquemal, F., Boumnick, L., 1990. Growth rate of four freshwater algae in relation to light and temperature. *Hydrobiologia* 207, 221–226. <https://doi.org/10.1007/BF00041459>
- de-Bashan, L.E., Trejo, A., Huss, V.A.R., Hernandez, J.P., Bashan, Y., 2000. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresour Technol.* 99, pp. 4980–4989. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.065>
- Decostere, B., De Craene, J., Van Hoey, S., Vervaeren, H., Nopens, I., Van Hulle, S.W.H., 2016. Validation of a microalgal growth model accounting with inorganic carbon and nutrient kinetics for wastewater treatment. *Chem. Eng. J.* 285, 189–197. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2015.09.111>
- de Freitas, B.B., Overmans, S., Sanchez-Medina, J., Hong, P.-Y., Lauersen, K.J., 2023. Biomass generation and heterologous isoprenoid milking from engineered microalgae grown in anaerobic membrane bioreactor effluent, *Water Research*, 229, 119486, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119486>
- Dermoun, D., Chaumont, D., Thebault, J.-M., Dauta, A., 1992. Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: Light and temperature. *Bioresour. Technol.* 42, 113–117. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90069-A](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90069-A)
- Díaz, V., Leyva-Díaz, J.C., Almécija, M.C., Poyatos, J.M., Muñío, M.M., Martín-Pascual, J., 2022. Microalgae bioreactor for nutrient removal and resource recovery from wastewater in the paradigm of circular economy. *Bioresour. Technol.* 363, Article 127968. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127968>
- Donoso Bravo, A. 2021. Fundamentos de modelación y bioprocesos. In *Modelación Mecánica de (Bio)Procesos*, pp. 1–20. ALPHA Education Press.
- Drexler, I.L.C., Yeh, D.H., 2014. Membrane applications for microalgae cultivation and harvesting, a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 13, pp. 487–504. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9350-6>
- Droop, M.R., 1968. Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis Lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 48, 689–733. <https://doi.org/10.1017/S0025315400019238>
- Dubinsky, Z., Stambler, N., 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications. *Aquat Microb Ecol* 56, 163–176. <https://doi.org/10.3354/ame01345>
- Eilers, P.H.C., Peeters, J.C.H., 1993. Dynamic behaviour of a model for photosynthesis and photoinhibition. *Ecol. Model.* 69, 113–133. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(93\)90052-T](https://doi.org/10.1016/0304-3800(93)90052-T)

- Enamala, M.K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., R. Yadavalli, B. Kolapalli, T.V. Aradhyula, J. Velpuri, C. Kuppam, 2018. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renew. Sust. Energy Rev.* 94, 49–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>
- Eriksen, N.T., Riisgård, F.K., Gunther, W.S., Lønsmann Iversen, J.J., 2006. On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 19, 161–174. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9122-y>
- Eskicioglu, C., Galvagno, G., Cimon, C., 2018. Approaches and processes for ammonia removal from side-streams of municipal effluent treatment plants. *Bioresource Technology* 268, pp. 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.020>
- Fallahi, A., Rezvani, F., Asgharnejad, H., Khorshidi, E., Hajinajaf, N., Higgins, B., 2021. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: a review. *Chemosphere* 272, Article 129878. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129878>
- Fang, L.L., Valverde-Pérez, B., Damgaard, A., Plósz, B.G., Rygaard, M., 2016. Life cycle assessment as development and decision support tool for wastewater resource recovery technology. *Water Res.* 88, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.016>
- Fan, L.-H., Zhang, Y.-T., Zhang, L., Chen, H.-L., 2008. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *J. Membr. Sci.*, 325, pp. 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.07.044>
- Fernández, I., Peña, J., Guzman, J.L., Berenguel, M., Ación-Fernández, F.G., 2010. Modelling and control issues of pH in tubular photobioreactors. *IFAC Proc. Vol.* 43, 186–191. <https://doi.org/10.3182/20100707-3-BE-2012.0046>
- Ferreira, G.F., Ríos Pinto, L.F., Maciel Filho, R., Fregolente, L.V., 2019. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renew. Sust. Energy Rev.* 109, 448–466. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.052>
- Gao, F., Cui, W., Xu, J.P., Li, C., Jin, W.H., Yang H.L., 2019. Lipid accumulation properties of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* in membrane photobioreactor (MPBR) fed with secondary effluent from municipal wastewater treatment plant. *Renew. Energy* 136, 671–676. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.038>
- Gao, L., Ding, W., Xi, J., Gao, S., Zhou, X., Chen, Y., Song, K., Mao, X., Tu, R., Jiang., G., 2022. Effects of different Nitrogen/Phosphorus ratios on the growth and metabolism of microalgae *Scenedesmus obliquus* cultured in the mixed wastewater from primary settling tank and sludge thickener. *Process Safety and Environmental Protection* 170, 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.059>

CAPÍTULO 1

- Geider, R.J., MacIntyre, H.L., Kana, T.M., 1998. A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnol. Oceanogr.* 43, 679–694. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.4.0679>
- Ghaffar, I., Deepanraj, B., Sundar, L.S., Vo, D.-V.N., Saikumar, A., Hussain, A., 2023. A review on the sustainable procurement of microalgal biomass from wastewaters for the production of biofuels. *Chemosphere* 311 (Part 2), 137094. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137094>
- Giménez, J.B., 2014. Estudio del tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas en biorreactores de membranas. PhD Thesis, University of Valencia, Spain.
- Goh, P.S., Ahmad, N.A., Lim, J.W., Liang, Y.Y., Kang, H.S., Ismail, A.F., Arthanareeswaran, G., 2022. Microalgae-Enabled Wastewater Remediation and Nutrient Recovery through Membrane Photobioreactors: Recent Achievements and Future Perspective. *Membranes* 12, 1094. <https://doi.org/10.3390/membranes12111094>
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., Muylaert, K., 2015. Impact of Nutrient Stress on Antioxidant Production in Three Species of Microalgae. *Algal Research* 7, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.002>
- Goldman, J.C., Oswald, W.C., Jenkins, D., 1974. The Kinetics of Inorganic Carbon Limited Algal Growth. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 46(3), 554–574. <https://www.jstor.org/stable/i25038808>
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., 1965. Harvesting and processing sewage grown planktonic microalgae. *J. Water Pollut. Control Fed.* 37, pp. 471–498. <https://www.jstor.org/stable/25035278>
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment, *Algal Res.* 24, 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- González-Camejo, J., Aparicio, S., Pachés, M., Borrás, L., Seco, A., 2022. Comprehensive assessment of the microalgae-nitrifying bacteria competition in microalgae-based wastewater treatment systems: Relevant factors, evaluation methods and control strategies. *Algal Research* 61, art. no. 102563. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102563>
- González-Camejo, J., Ferrer, J., Seco, A., Barat, R., 2021. Outdoor Microalgae-based Urban Wastewater Treatment: Recent Advances, Applications, and Future Perspectives. *WIREs Water* 8, e1518. <https://doi.org/10.1002/wat2.1518>
- González-Camejo, J., Montero, P., Aparicio, S., Ruano, M.V., Borrás, L., Seco, A., Barat, R., 2020. Nitrite inhibition of microalgae induced by the competition between microalgae and nitrifying bacteria. *Water Research* 172. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115499>

- Goswami, R.K., Agrawal, K., Verma, P., 2022a. Microalgal-based remediation of wastewater: A step towards environment protection and management. *Environmental Quality Management* 32(1), 105–123. <https://doi.org/10.1002/tqem.21850>
- Goswami, R.K., Agrawal, K., Verma, P., 2022b. Multifaceted role of microalgae for municipal wastewater treatment: A futuristic outlook toward wastewater management. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 2100286. <https://doi.org/10.1002/CLEN.202100286>
- Grobbelaar, J. U., 2010. Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynthesis Research* 106, pp. 135–144. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9573-5>
- Grover, J.P., 1991. Dynamics of competition among microalgae in variable environments: experimental tests of alternative models. *Oikos* 62, 231–243. <https://doi.org/10.2307/3545269>
- Grundmann, P., Maaß, O., 2016. Wastewater Reuse to Cope With Water and Nutrient Scarcity in Agriculture-A Case Study for Braunschweig in Germany. *Competition for Water Resources: Experiences and Management Approaches in the US and Europe*, pp. 352–365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803237-4.00020-3>
- Gudin, C., Chaumont, D., 1991. Cell fragility - The key problem of microalgae mass production in closed photobioreactors. *Bioresource Technology* 38, 145–151. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90146-B](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90146-B)
- Guest, J.S., Van Loosdrecht, M.C.M., Skerlos, S.J., Love, N.G., 2013. Lumped pathway metabolic model of organic carbon accumulation and mobilization by the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3258–3267. <https://doi.org/10.1021/es304980y>
- Gujer, W., Larsen, T.A., 1995. The implementation of biokinetics and conservation principles in ASIM. *Water Science and Technology* 31(2), 257–266. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00198-V](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00198-V)
- 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. *J. Environ. Manag.* 203, 299–315. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.012>
- Gupta, S.K., Ansari, F.A., Shrivastav, A., Sahoo, N.K., Rawat, I., Bux, F., 2016. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels, *J. Clean. Prod.* 115, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.12.040>
- Güven, H., Ersahin, M.E., Özgün, H., 2022. Energy self-sufficiency in wastewater treatment plants: perspectives, challenges, and opportunities. *Clean Energy and Resource Recovery*, Elsevier, pp. 105–122, <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90178-9.00019-6>

CAPÍTULO 1

- Haario, H., Kalachev, L., Laine, M., 2009. Reduced models of algae growth. *Bull. Math. Biol.* 71, 1626–1648. <https://doi.org/10.1007/s11538-009-9417-7>
- Habyarimana, J.-L., Juan, M., Nyiransengiyumva, C., Qing, T.-W., Qi, C.Y., Twagirayezu, G., Ying, D., 2022. Critical review on operation mechanisms to recover phosphorus from wastewater via microbial procedures amalgamated with phosphate-rich in side-stream to enhance biological phosphorus removal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 45, Article 102484. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102484>
- Haldane, J.B.S., 1930. *Enzymes*. Longmans. Green and Co, United Kingdom.
- Hall, D.O., Rao, K.K., 1994. *Photosynthesis*, 5th Edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Hall, S.R., 2009. Stoichiometrically explicit food webs: feedbacks between resource supply, elemental constraints, and species diversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40, 503–528. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173518>
- Hao, X., Fang, X., Li, J., Jiang, H., 2018. Analysis of potential in carbon-neutral operation of WWTPs. *China Water & Wastewater* 34(10), 11–16.
- Hardy, D., Cubillo, F., Han, M., Li, H., 2015. *Alternative Water Resources: A Review of Concepts, Solutions and Experiences*. International Water Association, London. Available at: <http://www.iwa-network.org/publications/alternative-water-resources-a-review-of-concepts-solutions-and-experiences/>.
- Hariz, H.B., Takriff, M.S., Yasin, N.H.M., Ba-Abbad, M.M., Hikimi, N.I.N.M., 2019. Potential of the microalgae-based integrated wastewater treatment and CO₂ fixation system to treat palm oil mill effluent (POME) by indigenous microalgae; *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Water Process Engineering* 32, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100907>
- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14, 1037–1047. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>.
- Heidrich, E.S., Curtis, T.P., Dolfing, J., 2011. Determination of the internal chemical energy of wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 45(2), 827–832. <https://doi.org/10.1021/es103058w>
- Heiker, M., Kraume, M., Mertins, A., Wawer, T., Rosenberger, S., 2021. Biogas Plants in Renewable Energy Systems - A Systematic Review of Modeling Approaches of Biogas Production. *Appl. Sci.* 11, 3361. <https://doi.org/10.3390/app11083361>

- Hena, S., Fatimah, S., Tabassum, S., 2015. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resour. Ind.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2015.02.002>
- Henze, M., Leslie Grady Jr., C.P., Gujer, W., Marais, G.V.R., Matsuo, T., 1987. Activated Sludge Model No.1 IAWPRC Scientific and Technical Report No.1 IAWPRC, London.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M., 2000. Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402369>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., Solana, M., Bertucco, A., García-González, M.C., 2016. Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. *Chem. Eng. J.* 285, pp. 449–458. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2015.09.072>.
- Herold, C., Ishika, T., Nwoba, E.G., Tait, S., Ward, A., Moheimani, N.R., 2021. Biomass production of marine microalga *Tetraselmis suecica* using biogas and wastewater as nutrients. *Biomass and Bioenergy* 145, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105945>
- Hom-díaz, A., Jaén-gil, A., Bello-laserna, I., Rodríguez-mozaz, S., Vicent, T., Barceló, D., Blánquez, P., 2017. Performance of a microalgal photobioreactor treating toilet wastewater: Pharmaceutically active compound removal and biomass harvesting. *Science of the Total Environment* 592, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.224>
- Ho, S., Chen, C., Lee, D., Chang, J., 2011. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems – A review. *Biotechnology Advances*, 29(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>
- Hossain, N., Zaini, J., Mahlia, T.M.I., Azad, A.K., 2019. Elemental, morphological and thermal analysis of mixed microalgae species from drain water. *Renewable Energy* 131, 617–624. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2018.07.082>.
- Huang, C.-C., Hung, J.-J., Peng, S.-H., Chen, C.N.N., 2012. Cultivation of a thermotolerant microalga in an outdoor photobioreactor: influences of CO₂ and nitrogen sources on the accelerated growth. *Bioresource Technology* 112, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.078>
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., Yang, C., 2017. Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering* 3, 318–329. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L.R., Wijffels, R.H., 2003. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol Bioeng* 81, pp. 193–210. <https://doi.org/10.1002/bit.10468>
- Japar, A.S., Takriff, M.S., Yasin, N.H.M., 2017. Harvesting microalgal biomass and lipid extraction for potential biofuel production: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5, 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.016>

CAPÍTULO 1

- Jassby, A.D., Platt, T., 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 21, 540e547. <https://doi.org/10.4319/lo.1976.21.4.0540>
- Judd, S., van den Broeke, L.J.P., Shurair, M., Kuti, Y., Znad, H., 2015. Algal remediation of CO₂ and nutrient discharges: a review. *Water Res.* 87, 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.021>
- Kandasamy, S., Zhang, B., He, Z., Bhuvanendran, N., EL-Seesy, A.I., Wang, Q., 2022. Microalgae as a multipotential role in commercial applications: current scenario and future perspectives. *Fuel* 308, Article 122053. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122053>
- Kar, S., Singh, R., Gurian, P.L., Hendricks, A., Kohl, P., McKelvey, S., Spatari, S., 2023. Life cycle assessment and techno-economic analysis of nitrogen recovery by ammonia air-stripping from wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 857 (Part 3), Article 159499. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159499>
- Kehrein, P., Van Loosdrecht, M., Osseweijer, P., Garfí, M., Dewulf, J., Posada, J., 2020. A critical review of resource recovery from municipal wastewater treatment plants-market supply potentials, technologies and bottlenecks. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 6, 877–910. <https://doi.org/10.1039/c9ew00905a>
- Khor, W.H., Kang, H.S., Lim, J.W., Iwamoto, K., Tang, C.H.H., Goh, P.S., Quen, L.K., Bin Shaharuddin, N.M.R., Lai, N.Y.G., 2022. Microalgae Cultivation in Offshore Floating Photobioreactor: State-of-the-Art, Opportunities and Challenges. *Aquac. Eng.* 98, Article 102269. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2022.102269>
- Kim, B.H., Kang, Z., Ramanan, R., Choi, J.E., Cho, D.H., Oh, H.M., Kim, H.S., 2014. Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater. *J Microbiol Biotechnol.* 24(8), 1123–1132. <https://doi.org/10.4014/jmb.1312.12057>
- Klausmeier, C., Litchman, E., Daufresne, T., Levin, S.A., 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature* 429, 171–174. <https://doi.org/10.1038/nature02454>
- Kong, Q.X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R., 2010. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Appl Biochem Biotechnol.* 160, 9–18. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8670-4>
- Kong, W., Shen, B., Lyu, H., Kong, J., Ma, J., Wang, Z., Feng, S., 2021. Review on carbon dioxide fixation coupled with nutrients removal from wastewater by microalgae. *J. Clean. Prod.* 292, Article 125975. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133251>

- Kubelka, B.G., Roselet, F., Pinto, W.T., Abreu, P.C., 2018. The action of small bubbles in increasing light exposure and production of the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in massive culture systems. *Algal Res.* 35, pp. 69–76, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.030>
- Kunjapur, A.M., Eldridge, R.B., 2010. Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 3516–3526. <https://doi.org/10.1021/ie901459u>
- Kwon, H.K., Oh, S.J., Yang, H.-S., 2013. Growth and uptake kinetics of nitrate and phosphate by benthic microalgae for phytoremediation of eutrophic coastal sediments. *Bioresour. Technol.* 129, 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.078>
- Lackner, S., Gilbert, E.M., Vlaeminck, S.E., Joss, A., Horn, H., van Loosdrecht, M.C.M., 2014. Full-scale partial nitrification/anammox experiences - An application survey. *Water Res.* 55, pp. 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.032>
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater Treatment with Microalgae - A Literature Review. *Vatten* 62, 31–38.
- Le Corre, K.S., Valsami-Jones, E., Hobbs, P., Parsons, S.A., 2009. Phosphorus recovery from wastewater by struvite crystallization: a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39(6), 433–477, <https://doi.org/10.1080/10643380701640573>
- Ledda, C., Idà, A., Allemand, D., Mariani, P., Adani, F., 2015. Production of wild *Chlorella* sp. cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. *Algal Research* 12, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.010>
- Lee, E., Jalalizadeh, M., Zhang, Q., 2015. Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Res.* 12, 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
- Lee, E., Zhang, Q., 2016. Integrated co-limitation kinetic model for microalgae growth in anaerobically digested municipal sludge centrate. *Algal Res.* 18, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.019>
- Lee, H.Y., Erickson, L.E., Yang, S.S., 1987. Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 832–843. <https://doi.org/10.1002/bit.260290705>
- Li, X.K., Xu, J.L., Guo, Y., Zhou, W.Z., Yuan, Z.H., 2015. Effects of simulated flue gas on components of *Scenedesmus raciborskii* WZKMT. *Bioresour. Technol.* 190, pp. 339–344, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.093>
- Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R., 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102(8), 5138–5144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>

CAPÍTULO 1

- López-Serna, R., Posadas, E., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2019. Removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater in novel algal-bacterial photobioreactors. *Sci. Total Environ.* 662, 32–40, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.206>
- Lu, L., Ren, Z.J., 2016. Microbial electrolysis cells for waste biorefinery: a state of the art review. *Bioresour Technol.* 215, pp. 254–264. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.034>
- Lutchmiah, K., Verliefde, A.R.D., Roest, K., Rietveld, L.C., Cornelissen, E.R., 2014. Forward osmosis for application in wastewater treatment: a review. *Water Res.* 58, 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.045>
- Maestrini, S.Y., Rochet, M., Legendre, L., Demers, S., 1986. Nutrient limitation of the bottom-ice microalgal biomass (southeastern Hudson Bay, Canadian Arctic). *Limnol. Oceanogr.* 31, pp. 969–982. <https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.5.0969>
- Maia, J.L.D., Cardoso, J.S., Mastrantonio, D.J.D.S., Bierhals, C.K., Moreira, J.B., Costa, J.A.V., Morais, M.G.D., 2020. Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules* 165 (Part B), pp. 2739–2749. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.159>
- Mairet, F., Bernard, O., Masci, P., Lacour, T., Sciandra, A., 2011. Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff. galbana* under nitrogen limitation. *Bioresour. Technol.* 102, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.138>
- Maliva, R.G., Missimer, T.M., Winslow, F.P., Herrmann, R., 2011. Aquifer storage and recovery of treated sewage effluent in the Middle East. *Arab. J. Sci. Eng.* 36 (1), 63–74. <https://doi.org/10.1007/s13369-010-0011-y>
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., Maltseva, S., 2021. Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology* 10, 1060. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>
- Mantovani, M., Marazzi, F., Fornaroli, R., Bellucci, M., Ficara, E., Mezzanotte, V., 2020. Outdoor pilot-scale raceway as a microalgae-bacteria sidestream treatment in a WWTP. *Science of the Total Environment* 710, 135583. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135583>
- Marbelia, L., Bilad, M.R., Passaris, I., Discart, V., Vandamme, D., Beuckels, A., Muylaert, K., Vankelecom, I.F.J., 2014. Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresour. Technol.* 163, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.012>

- Marquez, F.J., Sasaki, K., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *J Ferment Bioeng* 76(5), 408–410. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(93\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0922-338X(93)90034-6)
- Marsullo, M., Mian, A., Ensinas, A.V., Manente, G., Lazzaretto, A., Marechal, F., 2015. Dynamic modeling of the microalgae cultivation phase for energy production in open raceway ponds and flat panel photobioreactors. *Front. Energy Res.* 3, Article 41. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2015.00041>
- Ma, X., Zhou, W., Fu, Z., Cheng, Y., Min, M., Liu, Y., Zhang, Y., Chen, P., Ruan, R., 2014. Effect of wastewater-borne bacteria on algal growth and nutrients removal in wastewater-based algae cultivation system. *Bioresour. Technol.* 167, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.087>
- Ma, Z., Cheah, W.Y., Ng I. S., Chang, J.S., Zhao, M., Show, P.L., 2022. Microalgae-based biotechnological sequestration of carbon dioxide for net zero emissions. *Trends Biotechnol.* 40, 1439–1453. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2022.09.002>
- McCarty, P.L., 2018. What is the best biological process for nitrogen removal: when and why? *Environ. Sci. Technol.* 52 (7), pp. 3835–3841. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05832>
- McCarty, P.L., Bae, J., Kim, J., 2011. Domestic Wastewater Treatment as a Net Energy Producer-Can This be Achieved? *Environ. Sci. Technol.* 45(17), pp. 7100–7106. <https://doi.org/10.1021/es2014264>
- Mehrabadi, A., Craggs, R., Farid, M.M., 2015. Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production *Bioresour. Technol.* 184, pp. 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.004>
- Mennaa, F.Z., Arbib, Z., Perales, J.A., 2015. Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom: biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. *Water Res.* 83, pp. 42–51, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.007>
- Metcalf y Eddy, Inc. (1995). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización.* 3ª Edició. McGraw-Hill, New York, USA.
- Moheimani, N.R., 2013. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity if *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 25, 387–398. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9873-6>
- Mohsenpour, S.F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloje, A., Gutierrez, T., 2021. Integrating micro-algae into wastewater treatment: a review. *Sci. Total Environ.* 752, Article 142168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142168>.
- Molina-Grima, E., Fernández Sevilla, J.M., Sánchez Pérez, J.A., García Camacho, F., 1996. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account

- incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 45, 59–69. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00144-1](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00144-1)
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures, *Annu. Rev. Microbiol.* 3(1), 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Mo, W., Zhang, Q., 2013. Energy–nutrients–water nexus: Integrated resource recovery in municipal wastewater treatment plants. *J. Environ. Manage.* 127, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.05.007>
- Moya, M., Sánchez-Guardamino, M., Vilavella, A., Barbera, E., 1997. Growth of *Haematococcus lacustris*: a contribution to kinetic modelling. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68, 303–309. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199703\)68:3<303::AID-JCTB639>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199703)68:3<303::AID-JCTB639>3.0.CO;2-1)
- Mukherjee, A., Zimmerman, A.R., Harris, W., 2011. Surface chemistry variations among a series of laboratory-produced biochars. *Geoderma* 163(3), 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.04.021>
- Muñoz, R., Guieysse, B., 2006. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.* 40(15), 2799–2815. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Mussatto S.I., Van Loosdrecht M., 2016. Cellulose: a key polymer for a greener, healthier, and bio-based future. *Biofuel Research Journal* 12, 482. <https://doi.org/10.18331/BRJ2016.3.4.2>
- Nagarajan, D., Chen, C.-Y., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2023. Photobioreactors for microalgae-based wastewater treatment. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, pp 121–152, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99911-3.00002-6>
- Nagarajan, D., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2019. Integration of anaerobic digestion and microalgal cultivation for digestate bioremediation and biogas upgrading. *Bioresour. Technol.* 290, Article 121804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121804>
- Nagi, G.K., Minhas, A.K., Gaur, S., Jain, P., Mandal, S., 2021. Integration of Algal Biofuels With Bioremediation Coupled Industrial Commodities Towards Cost-Effectiveness. *Front. Energy Res.* 9, 735141. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.735141>
- Nan, C., Dong, S., 2004. Comparative studies on phosphorus uptake and growth kinetics of the microalga *Tetraselmis subcordiformis* and the macroalga *Ulva pertusa*. *J. Ocean Univ. China* 3, 56–59. <https://doi.org/10.1007/s11802-004-0009-8>
- Nayak, M., Karemore, A., Sen, R., 2016. Sustainable valorization of flue gas CO₂ and wastewater for the production of microalgal biomass as a biofuel feedstock in closed and open reactor systems. *RSC Adv.* 6, pp. 91111–91120. <https://doi.org/10.1039/C6RA17899E>

- Negoro, M., Shioji, N., Miyamoto, K., Micira, Y., 1991. Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SO_x and NO_x. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28, 877, <https://doi.org/10.1007/BF02922657>
- Noriega-Hevia, G., 2021. Recuperación de nitrógeno mediante contactores de membrana: aplicación, modelación y control. PhD Thesis, Polytechnic University of Valencia, Spain.
- Noriega-Hevia, G., Serralta, J., Borrás, L., Seco, A., Ferrer, J., 2020. Nitrogen recovery using a membrane contactor: Modelling nitrogen and pH evolution. *J. Environ. Chem. Eng.* 8, 103880. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103880>
- Novak, J.T., Brune, D.E., 1985. Inorganic carbon limited growth kinetics of some freshwater algae. *Water Res.* 19, 215–225. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(85\)90203-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(85)90203-9)
- Ocampo, O., 2011. El cambio climático y su impacto en el agro. *Revista de Ingeniería* 33, 115–123. <https://doi.org/10.16924/revinge.33.11>
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A.M., 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research* 41(11), pp. 2271–2300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.030>
- Olgúin, E.J., 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30, pp. 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>
- Olsson, G., Nielsen, M., Yuan, Z., Lynggaard-Jensen, A., Steyer, J.-P., 2005. *Instrumentation, Control and Automation in Wastewater Systems*, IWA Publishing, London, UK. <https://doi.org/10.2166/9781780402680>
- Oruganti, R.K., Katam, K., Show, P.L., Gadhamshetty, V., Upadhyayula, V.K.K., Bhattacharyya, D.A., 2022. comprehensive review on the use of algal-bacterial systems for wastewater treatment with emphasis on nutrient and micropollutant removal. *Bioengineered* 13(4), pp. 10412–10453, <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056823>
- Oswald, W.J., 1988. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, pp. 305–328. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387448948115968>
- Pachés, M., Martínez-Guijarro, R., González-Camejo, R., Seco, A., Barat, R., 2020. Selecting the most suitable microalgae species to treat the effluent from an anaerobic membrane biorreactor. *Environmental Technology* 41(3), 267–276. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1496148>
- Park, B.K., Craggs, R.J., 2011. Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use. *Water Sci Technol.* 63(10), 2403–2410. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.200>

CAPÍTULO 1

- Park, B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.*, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells, 102, pp. 35–42, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Park, J., Jin, H., Lim, B. R., Park, K. Y., Lee, K., 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 8649–8657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>
- Park, K.H., Lee, C.G., 2001. Effectiveness of flashing light for increasing photosynthetic efficiency of microalgal cultures over a critical cell density. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 6, 189–193. <https://doi.org/10.1007/BF02932549>
- Peeters, J.C.H., Eilers, P., 1978. The relationship between light intensity and photosynthesis – A simple mathematical model. *Hydrobiol. Bull.* 12, 134–136. <https://doi.org/10.1007/BF02260714>
- Pereira, D.A.; Rodrigues, V.O.; Gómez, S.V.; Sales, E.A.; Jorquera, O., 2013. Parametric sensitivity analysis for temperature control in outdoor photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 144, 548–553. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.009>
- Posten, C., 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* 9(3), 165–177. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.011>
- Pratt, R., Daniels, T.C., Eiler, J.J., Gunnison, J.B., Kumler, W.D., Oneto, J.F., Strait, L.A., Spoehr, H.A., Hardin, G.J., Milner, H.W., Smith, J.H., Strain, H.H., 1944. Chlorellin an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science* 99(2574), 351–352. <https://doi.org/10.1126/science.99.2574.351>
- Praveenkumar, R., Kim, B., Choi, E., Lee, K., Park, J.Y., Lee, J.S., Lee, Y.C., Oh, Y.K., 2014. Improved biomass and lipid production in a mixotrophic culture of *Chlorella* sp. KR-1 with addition of coal-fired flue-gas. *Bioresour. Technol.* 171, pp. 500–505, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.112>
- Pretel, R., Robles, A., Ruano, M.V., Seco, A., Ferrer, J., 2014. The operating cost of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating sulphate-rich urban wastewater. *Separation and Purification Technology* 126, pp. 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.02.013>
- 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. *J. Environ. Manage.* 166, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.004>

- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Puyol, D., Batstone, D.J., Hülsen, T., Astals, S., Peces, M., Krömer, J.O., 2017. Resource Recovery from Wastewater by Biological Technologies: Opportunities, Challenges, and Prospects. *Front Microbiol.* 7, Article 2106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02106>
- Qadri, R.Z., Ali, M., Rajpal, A., Kazmi, A.A., Tawfik, A., Tyagi, V.K., 2021. Anaerobic wastewater treatment for energy recovery and water reclamation. *Clean Energy and Resource Recovery*, pp. 95–104. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90178-9.00030-5>
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P.A. and Ogden, K.L., 2017. Effects of pH on Cell Growth, Lipid Production and CO₂ Addition of Microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research* 28, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>
- Quinn, J., de Winter, L., Bradley, T., 2011. Microalgae bulk growth model with application to industrial scale systems. *Bioresource Technology* 102, 5083–5092. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.019>
- Rai, M.P., Gupta, S., 2017. Effect of Media Composition and Light Supply on Biomass, Lipid Content and Fame Profile for Quality Biofuel Production from *Scenedesmus abundans*. *Energy Conversion and Management* 141, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.05.018>
- Ras, M., Steyer, J.P., Bernard, O., 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 153–164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., Ross, T., 2005. Unifying temperature effects on the growth rate of bacteria and the stability of globular proteins. *J. Theor. Biol.* 233, 351–362. <https://doi.org/10.1016/J.JTBI.2004.10.016>
- Razzak, S.A., Ali, S.A.M., Hossain, M.M., deLasa, H., 2017. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renew. Sust. Energy Rev.* 76, 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>
- Reichert, P., Borchardt, D., Henze, M., Rauch, W., Shanahan, P., Somlyódy, L., Vanrolleghem, P., 2001. River Water Quality Model no. 1 (RWQM1): II. Biochemical process equations. *Water Sci. Technol.* 43, 11–30. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0241>
- Reynolds, C.S., 2006. *The ecology of phytoplankton (ecology, biodiversity and conservation)*. Cambridge: Cambridge University Press; United Kingdom.

- Richards, R.G., Mullins, B.J., 2013. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. *Ecological Modelling* 249, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.07.004>
- Richmond, A., 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *Journal of Applied Phycology* 12, 441–451. <https://doi.org/10.1023/A:1008123131307>
- Richmond, A., 2004. *Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, USA.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S.A., Lee, K., Rashid, N., 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 92, 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Robles, Á., Aguado, D., Barat, R., Borrás, L., Bouzas, A., Giménez, J.B., Martí, N., Ribes, J., Ruano, M.V., Serralta, J., Ferrer, J., Seco, A., 2020. New frontiers from removal to recycling of nitrogen and phosphorus from wastewater in the circular economy. *Bioresour. Technol.* 300, Article 122673, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122673>
- Robles, Á., Jiménez-Benítez, A., Giménez, J.B., Durán, F., Ribes, J., Serralta, J., Ferrer, J., Rogalla, F., Seco, A., 2022. A semi-industrial scale AnMBR for municipal wastewater treatment at ambient temperature: performance of the biological process. *Water Research* 215, Article 118249. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118249>
- Romero-Villegas, G.I., Fiamengo, M., Acien-Fernández, F.G., Molina-Grima, E., 2018. Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at the pilot-scale in raceway photobioreactors. *J. Environ. Manag.* 228, 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.020>
- Ross, M.E., Davis, K., McColl, R., Stanley, M.S., Day, J.G., Semião, A.J.C., 2018. Nitrogen uptake by the macro-algae *Cladophora coelothrix* and *Cladophora parriaudii*: influence on growth, nitrogen preference and biochemical composition. *Algal Res.* 30, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.12.005>
- Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 162, 447–463. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099>
- Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P.D., Arbib, Z., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., Perales, J.A., 2013. Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: Prediction from a batch experiment. *Bioresour. Technol.* 127, 456–463. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.103>

- Ruiz-Martínez, A., Martín García, N., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2012. Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour. Technol.* 126, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Pachés, M., Seco, A., Ferrer, J., 2014. Mixed microalgae culture for ammonium removal in the absence of phosphorus: Effect of phosphorus supplementation and process modeling. *Process Biochem.* 49, 2249–2257. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.002>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2015a. Effect of intracellular P content on phosphate removal in *Scenedesmus* sp. Experimental study and kinetic expression. *Bioresour. Technol.* 175, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.081>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., 2015b. Effect of temperature on ammonium removal in *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.*, 191, Article 346349, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.070>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., 2016. Modeling light and temperature influence on ammonium removal by *Scenedesmus* sp. under outdoor conditions *Water Sci Technol.* 74(8), pp. 1964–1970. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.383>
- Saerens, B., Geerts, S., Weemaes, M., 2021. Phosphorus recovery as struvite from digested sludge – experience from the full scale. *J. Environ. Manage.* 280, Article 111743, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111743>
- Salgado, E.M., Pires, J.C.M., 2023. Photobioreactors modeling and simulation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 89–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99911-3.00013-0>
- Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Ación-Fernández, F.G., Rueda, A., Perez-Parra, J., Molina, E., 2008. Influence of Culture Conditions on the Productivity and Lutein Content of the New Strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry* 43, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.004>
- Santos, F.M., Pires, J.C.M., 2018. Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char. *Bioresource Technology* 267, pp. 725–731. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.119>
- Sepúlveda, C., Ación-Fernández, F.G., Gómez, C., Jiménez-Ruiz, N., Riquelme, C., Molina-Grima, E., 2015. Utilization of centrate for the production of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Algal Res.* 9, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.004>
- Serralta, J., 2004. Desarrollo de un algoritmo para el cálculo del pH en los procesos biológicos de EDARs. Aplicación a la modelación de los procesos de fermentación de fango primario y de eliminación biológica de fósforo. PhD Thesis, Polytechnic University of Valencia, Spain.

CAPÍTULO 1

- Serralta, J., Ferrer, J., Borrás, L., Seco, A., 2004. An extension of ASM2d including pH calculation. *Water Res.* 38, 4029–4038. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.009>
- Shoener, B.D., Schramm, S.M., Béline, F., Bernard, O., Martínez, C., Plósz, B.G., Snowling, S., Steyer, J.P., Valverde-Pérez, B., Wágner, D., Guest, J.S., 2019. Microalgae and cyanobacteria modeling in water resource recovery facilities: a critical review. *Water Res.* 2, <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2018.100024>
- Silva, N.F.P., Gonçalves, A.L., Moreira, F.C., Silva, T.F.C.V., Martins, F.G., Alvim-Ferraz, M.C.M., Boaventura, R.A.R., Vilar, V.J.P., Pires, J.C.M., 2015. Towards Sustainable Microalgal Biomass Production by Phycoremediation of a Synthetic Wastewater: A Kinetic Study. *Algal Research* 11, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.014>
- Singh, D. V., Bhat, R. A., Upadhyay, A. K., Singh, R., Singh, D. P., 2021. Microalgae in aquatic environs: A sustainable approach for remediation of heavy metals and emerging contaminants. *Environmental Technology & Innovation* 21, 101340. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101340>
- Singh, N., Dhiman, S., Basu, S., Balakrishnan, M., Petrinic, I., Helix-Nielsen, C., 2019. Dewatering of sewage for nutrients and water recovery by Forward Osmosis (FO) using divalent draw solution. *J. Water Process Eng.* 31, 100853. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100853>
- Smith, E.L., 1936. Photosynthesis in relation to light and carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 22, 504–511. <https://doi.org/10.1073/pnas.22.8.504>
- Sniatala, B., Kurniawan, T.A., Sobotka, D., Makinia, J., Othman, M.H.D., 2023. Macro-nutrients recovery from liquid waste as a sustainable resource for production of recovered mineral fertilizer: Uncovering alternative options to sustain global food security cost-effectively. *Science of The Total Environment* 856 (Part 2), 159283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159283>
- Solimeno, A., Samsó, R., Uggetti, E., Sialve, B., Steyer, J.P., Gabarro, A., García, J., 2015. New mechanistic model to simulate microalgae growth. *Algal Res.* 12, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.008>
- Solmaz, A., Işık, M., 2020. Optimization of membrane photobioreactor; the effect of hydraulic retention time on biomass production and nutrient removal by mixed microalgae culture. *Biomass Bioenergy* 2020, 142, 105809. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105809>
- Spijkerman, E., De Castro, F., Gaedke, U., 2011. Independent colimitation for carbon dioxide and inorganic phosphorus. *PLoS One* 6(12), e28219. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028219>
- Srivastava, M., Srivastava, N. Singh, R., 2021. Bioenergy research: Commercial opportunities & challenges. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-981-16-1190-2.pdf>.

- Steele, J., 1962. Environmental control of photosynthesis in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 7(2), 137–150. <https://doi.org/10.4319/lo.1962.7.2.0137>
- Stephens, E., Ross, I., Mussgnug, J., Wagner, L., Borowitzka, M., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2010. Future prospects of microalgal biofuels production systems. *Trends in plant science*, 15(10), 554–564. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.003>
- Suali, E., Sarbatly, R., 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, pp. 4316–4342. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.047>
- Subhadra, B.G., Edwards, M., 2011. Coproduct market analysis and water footprint of simulated commercial algal biorefineries. *Appl Energy* 88(10), 3515–3523. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.051>
- Suh, I.S., Lee, C.G., 2003. Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8, 313. <https://doi.org/10.1007/BF02949274>
- Sung, Y.J., Yu, B.S., Yang, H.E., Kim, D.J., Lee, J.Y., Sim, S.J., 2022. Microalgae-derived hydrogen production towards low carbon emissions via large-scale outdoor systems, *Bioresource Technology* 364, 128134. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128134>
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2012. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. *Bioresour. Technol.* 118, 469-476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.093>
- Tamiya, H., Hase, E., Shibata, K., Mituya, A., Iwamura, T., Nihei, T., Sasa, T., 1953. Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature. *Algal Cult. Lab. Pilot Plant*, pp. 204–232.
- Thanigaivel, S., Priya, A.K., Dutta, K., Rajendran, S., Vasseghian, Y., 2022. Engineering strategies and opportunities of next generation biofuel from microalgae: a perspective review on the potential bioenergy feedstock. *Fuel* 312, pp. 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122827>
- Tomczak, W., Gryta, M., 2022. Energy-Efficient AnMBRs Technology for Treatment of Wastewaters: A Review. *Energies* 15, 4981. <https://doi.org/10.3390/en15144981>
- Tüzün, I., Bayramoğlu, G., Yalçın, E., Başaran, G., Çelik, G., Arica, M.Y., 2005. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Environ. Manag.* 77, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.01.028>
- Udaiyappan, A.F.M., Hasan, H.A., Takriff, M.S., Abdullah, S.R.S, 2017. A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering* 20, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.09.006>

CAPÍTULO 1

- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyana, H., 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 99, 4021–4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>.
- van Oorschot, J.L.P., 1955. *Conversion of Light Energy in Algal Culture*. Wageningen University, the Netherlands. <https://edepot.wur.nl/177268>
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., Eppink, M. H., 2013. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour. Technol.* 135, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135>.
- Venkata Mohan, S., Devi, M.P., 2014. Salinity Stress Induced Lipid Synthesis to Harness Biodiesel during Dual Mode Cultivation of Mixotrophic Microalgae. *Bioresource Technology* 165, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.103>
- Venkata Subhash, G., Rohit, M.V., Devi, M.P., Swamy, Y.V., Venkata Mohan, S., 2014. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. *Bioresour. Technol.* 169, 789–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.019>
- Verma, R., Srivastava, A., 2018. Carbon dioxide sequestration and its enhanced utilization by photoautotroph microalgae. *Environ. Dev.* 27, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2018.07.004>
- Vo, H.N.P., Ngo, H.H., Guo, W., Minh, T., Nguyen, H., Liu, Y., Liu, Y., Nguyen, D.D., Chang, S.W., 2019. A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment. *Sci. Total Environ.* 651(1), 1549–1568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.282>
- Vu, M.T., Nguyen, L.N., Zdarta, J., Mohammed, J.A., Pathak, N., Nghiem, L.D., 2022. Wastewater to R3–resource recovery, recycling, and reuse efficiency in urban wastewater treatment plants. *Clean Energy and Resource Recovery*, pp. 3–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90178-9.00014-7>
- Wágner, D.S., Valverde-Perez, B., Plosz, B.G., 2018. Light attenuation in photobioreactors and algal pigmentation under different growth conditions - Model identification and complexity assessment, *Algal Res.* 35, 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.019>
- Wágner, D.S., Valverde-Pérez, B., Sæbø, M., Bregua de la Sotilla, M., Van Wagenen, J., Smets, B.F., Plósz, B.G., 2016. Towards a consensus-based biokinetic model for green microalgae – The ASM-A. *Water Res.* 103, 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.026>
- Wang, B., Lan, C.Q., Horsman, M., 2012. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol. Adv.* 30 (4), pp. 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>
- Wang, C., Lan, C.Q., 2018. Effects of shear stress on microalgae - A review. *Biotechnol Adv.* 36(4), 986–1002. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.001>

- Wang, C., Lei, A., Zhou, K., Hu, Z., Hao, W., Yang, J., 2014a. Growth and nitrogen uptake characteristics reveal outbreak mechanism of the opportunistic macroalga *Gracilaria tenuistipitata*. PLoS One 9, Article e108980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108980>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R., 2010a. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. Appl. Biochem. Biotechnol. 162, 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Wang, M., Kuo-Dahab, W.C., Dolan, S., Park, C., 2014b. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. And *Micractinium* sp., in wastewater treatment. Bioresour. Technol. 154, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.047>
- Wang, T., Tian, X., Liu, T., Wang, Z., Guan, W., Guo, M., Chu, J., Zhuang, Y., 2016. Enhancement of lipid productivity with a novel two-stage heterotrophic fed-batch culture of *Chlorella protothecoides* and a trial of CO₂ recycling by coupling with autotrophic process. Biomass Bioenergy 95, pp. 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.10.010>
- Wang, X., Li, Z.J., Su, J.Q., Tian, Y., Ning, X.R., Hong, H.S., Zheng, T.L., 2010b. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere. Biological Control 2010, 52(2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.004>
- Wan Mahari, W.A., Wan Razali, W.A., Manan, H., Hersi, M.A., Ishak, S.D., Cheah, W., Chieh Chan, D.J., Sonne, C., Show, P.L., Lam, S.S., 2022. Recent advances on microalgae cultivation for simultaneous biomass production and removal of wastewater pollutants to achieve circular economy. Bioresour. Technol. 364, Article 122673. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128085>
- Wolf, G., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Kinetic modeling of phototrophic biofilms: the PHOBIA model. Biotechnology and bioengineering 97(5), 1064–1079. <https://doi.org/10.1002/bit.21306>
- Wu, L., Wei, W., Song, L., Woźniak-Karczewska, M., Chrzanowski, Ł., Ni, B.J., 2021. Upgrading biogas produced in anaerobic digestion: biological removal and bioconversion of CO₂ in biogas. Renew. Sustain. Energy Rev. 150, Article 111448, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111448>
- Wu, Y. H., Zhu, S. F., Yu, Y., Shi, X. J., Wu, G. X., Hu, H. Y., 2017. Mixed cultivation as an effective approach to enhance microalgal biomass and triacylglycerol production in domestic secondary effluent. Chemical Engineering Journal 328, 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.088>
- Xie, M., Shon, H.K., Gray, S.R., Elimelech, M., 2016. Membrane-based processes for wastewater nutrient recovery: Technology, challenges, and future direction. Water Res. 89, 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.045>

CAPÍTULO 1

- 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. *Bioresour. Technol.* 101, 5494–5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
- Yadav, G., Sen, R., 2017. Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: recent technological advances in climate research. *J. CO₂ Util.* 17, pp. 188–206, <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2016.12.006>
- Yamamoto, T., Suzuki, M., Kim, K., Asaoka, S., 2012. Growth and uptake kinetics of phosphate by benthic microalga *Nitzschia* sp. isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Phycol. Res.* 60, 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00653.x>
- Yang, J., van Lier, J.B., Li, J., Guo, J., Fang, F., 2022. Integrated anaerobic and algal bioreactors: A promising conceptual alternative approach for conventional sewage treatment. *Bioresour. Technol.* 343, Article 126115. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH2021.126115>
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M. and Chen, Y., 2011. Life-Cycle Analysis on Biodiesel Production from Microalgae: Water Footprint and Nutrients Balance. *Bioresource Technology* 102, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.017>
- Yan, T., Ye, Y., Ma, H., Zhang, Y., Guo, W., Du, B., Wei, Q., Wei, D., Ngo, H.H., 2018. A critical review on membrane hybrid system for nutrient recovery from wastewater. *Chem. Eng. J.* 348, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.166>
- Ye, Y., Ngo, H.H., Guo, W., Chang, S.W., Nguyen, D.D., Varjani, S., Ding, A., Bui, X.T., Nguyen, D.P., 2021. Bio-membrane based integrated systems for nitrogen recovery in wastewater treatment: Current applications and future perspectives. *Chemosphere* 2021, 265, 129076. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129076>
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W., 2013. Decentralized two-stage sewage treatment by chemical–biological flocculation combined with microalgae biofilm for nutrient immobilization in a roof installed parallel plate reactor. *Bioresour. Technol.* 130, pp. 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.128>
- Zambrano, J., García-Encina, P.A., Hernández, F., Botero-Coy, A., Jiménez, J.J., Irusta-Mata, R., 2021. Removal of a mixture of veterinary medicinal products by adsorption onto a *Scenedesmus almeriensis* microalgae-bacteria consortium. *J. Water Process. Eng.* 43, 102226. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102226>
- Zambrano, J., Krustok, I., Nehrenheim, E., Carlsson, B., 2016. A simple model for algae-bacteria interaction in photo-bioreactors. *Algal Res.* 19, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.022>

- Zhang, C., Wang, X., Ma, Z., Luan, Z., Wang, Y., Wang, Z., Wang, L., 2020. Removal of phenolic substances from wastewater by algae: A review. *Environmental Chemistry Letters* 18, 377–392. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00953-2>
- Zhang, X., Liu, Y., 2022. Resource recovery from municipal wastewater: A critical paradigm shift in the post era of activated sludge. *Bioresour. Technol.* 363, 127932. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127932>
- Zhao, B., Su, Y., 2014. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 31, pp. 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.054>
- Zhu, J., Rong, J., Zong, B., 2013. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chin. J. Catal.* 34, 80–100. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(11\)60497-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(11)60497-X)
- Zhu, L., 2015. Microalgal Culture Strategies for Biofuel Production: A Review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 9, 801–814. <https://doi.org/10.1002/bbb.1576>
- Zhu, S., Wang, Y., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., Yuan, Z. 2014. Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174, pp. 2435–2445, <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1183-9>

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

En las últimas décadas, la tecnología basada en los cultivos de microalgas ha suscitado un gran interés en la comunidad científica debido al potencial de recuperación de nutrientes de las aguas residuales que ofrece esta tecnología. Los cultivos de microalgas permiten aplicar el concepto de Economía Circular en una EDAR dado que permiten no sólo la eliminación de nutrientes (N y P) presentes en las aguas residuales, sino también la recuperación de estos nutrientes en la producción una biomasa algal de alto valor con diversas aplicaciones: generación de biogás, producción de biocombustibles y biofertilizantes, elaboración de fármacos y cosméticos, etc.

La mayoría de los trabajos desarrollados con cultivos de microalgas que pueden consultarse en la bibliografía se han llevado a cabo a escala laboratorio (*indoor*) y en condiciones ambientales controladas de luz, temperatura, pH, carga de nutrientes, etc., y normalmente siempre operando en modo *batch*. Este tipo de estudios, aunque no dejan de ser interesantes, reducen su aplicabilidad para cultivos de microalgas a gran escala donde las condiciones *outdoor* es la única alternativa económicamente viable.

El objetivo principal de esta tesis ha consistido en el estudio y modelación de cultivos de microalgas *outdoor* a escala piloto para el tratamiento del efluente de un sistema AnMBR con alto contenido en nutrientes. Para ello, durante la fase de estudio de los cultivos de microalgas se han llevado a cabo diversos experimentos en una planta piloto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) donde se han evaluado los principales factores que afectan a las microalgas, es decir, la temperatura, la luz solar, el tiempo de retención celular (TRC), el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el contenido de nutrientes del agua residual. A continuación, haciendo uso de los datos obtenidos experimentalmente en planta piloto, se ha desarrollado un modelo matemático de crecimiento de microalgas que permite simular de manera muy precisa el comportamiento de los cultivos de microalgas, y que incluye el efecto de los principales factores ambientales.

La tesis doctoral ha sido desarrollada en el contexto de un proyecto nacional de investigación titulado “*Modelación y control de la recuperación como biogás de la energía de la materia orgánica y nutrientes del agua residual, acoplando un AnMBR y un cultivo de microalgas*” (Código del proyecto: CTM2011-28595-C02-01/02), el cual

ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) del Gobierno de España.

La tesis doctoral se presenta por compendio de artículos. En total se presentan tres artículos que han sido publicados en revistas indexadas, conformando cada uno de ellos un capítulo completo (**CAPÍTULOS 4, 5 y 6**) donde se desarrollan los objetivos principales de la tesis. También se incluye un **CAPÍTULO 3** correspondiente a la definición de los “Materiales y Métodos” utilizados para la elaboración de la tesis, y el cual contiene una contribución presentada en un congreso donde se describe la planta piloto utilizada para llevar a cabo la experimentación con los cultivos de microalgas.

De acuerdo con el objetivo principal citado anteriormente, cada capítulo de la tesis doctoral se centra en los siguientes aspectos:

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo se centra en la descripción de la planta piloto MPBR que se ha utilizado para llevar a cabo la experimentación con cultivos de microalgas para la recuperación de nutrientes del efluente de un sistema AnMBR que trata agua residual real. El capítulo contiene una contribución presentada en el “11th IWA Conference on Instrumentation, Control and Automation” de Narbonne (Francia) que tuvo lugar en el año 2013. El título de la contribución es “*ICA applied to Membrane PhotoBioReactors (MPBRs) for wastewater nutrient recovery*”. Esta planta piloto ha sido diseñada para poder ser operada de dos maneras diferenciadas: (1) utilizando cuatro fotobiorreactores de placa plana de 0,55 m³ cada uno, que pueden trabajar manera conjunta o independiente; (2) añadiendo a los cuatro fotobiorreactores dos tanques de membranas de ultrafiltración de fibra hueca de tamaño industrial de 0,3 m³ cada uno, los cuales permiten desacoplar el TRC del TRH.

CAPÍTULO 4: WATER RESOURCE RECOVERY BY MEANS OF MICROALGAE CULTIVATION IN OUTDOOR PHOTOBIOREACTORS USING THE EFFLUENT FROM AN ANAEROBIC MEMBRANE BIOREACTOR FED WITH PRE-TREATED SEWAGE

Viruela, A., Murgui, M., Gómez-Gil, T., Durán, F., Robles, Á., Ruano, M.V., Ferrer, J., 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. Bioresour. Technol. 218, 447–454. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.116>

En este trabajo se operaron tres fotobiorreactores de placa plana de 0,55 m³ bajo distintas condiciones de operación y ambientales (*outdoor*) para estudiar el potencial de los cultivos de microalgas en la recuperación de nutrientes del efluente de un sistema AnMBR que trata agua residual urbana. La recuperación de nutrientes fue evaluada en términos de eliminación de nutrientes (N y P) y en productividad de biomasa. En este trabajo se analiza el efecto de la temperatura, la luz solar, el TRH y el contenido de nutrientes del agua residual en el rendimiento de los cultivos de microalgas.

CAPÍTULO 5: PERFORMANCE OF AN OUTDOOR MEMBRANE PHOTOBIOREACTOR FOR RESOURCE RECOVERY FROM ANAEROBICALLY TREATED SEWAGE

Viruela, A., Robles, A., Durán, F., Ruano, M.V., Barat, R., Ferrer, J., Seco, A., 2018. Performance of an outdoor membrane photobioreactor for resource recovery from anaerobically treated sewage. J. Clean. Prod. 178, 665-674. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.223>

Una vez evaluado el potencial de los cultivos de microalgas en el sistema de fotobiorreactores *outdoor* del **CAPÍTULO 4**, el siguiente paso fue evaluar el sistema desacoplando el TRC del TRH mediante la introducción de dos tanques de membranas de ultrafiltración de 0,3 m³ cada uno que permiten aumentar la carga de nutrientes en el sistema manteniendo el TRC > TRH. En este trabajo, que se presenta en este **CAPÍTULO 5**, se ha analizado la eliminación de nutrientes (N y P), productividad de biomasa, recuperación de energía, capacidad de biofijación de CO₂ y actividad fotosintética de los cultivos de microalgas en estos fotobiorreactores. En concreto se discuten los efectos del sistema de recirculación de microalgas utilizado (un bombeo mecánico vs un sistema

airlift), el TRC, la carga de nutrientes, la temperatura, la luz solar y el volumen en zona oscura sobre el rendimiento del cultivo de microalgas.

CAPÍTULO 6: KINETIC MODELING OF AUTOTROPHIC MICROALGAE MAINLINE PROCESSES FOR SEWAGE TREATMENT IN PHOSPHORUS-REPLETE AND -DEplete CULTURE CONDITIONS

Viruela, A., Aparicio, S., Robles, Á., Falomir, L.B., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., 2021. Kinetic modeling of autotrophic microalgae mainline processes for sewage treatment in phosphorus-replete and -deplete culture conditions. Sci. Total Environ. 797, 149165. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149165>

En este trabajo se presenta un modelo matemático para el crecimiento de microalgas que permite simular la recuperación de nutrientes de las aguas residuales en un sistema MPBR. Este modelo de microalgas tiene en cuenta los efectos producidos por la concentración de nutrientes disponibles, el almacenamiento intracelular de P en forma de polifosfatos, la luz, la temperatura y el pH sobre la velocidad de crecimiento de microalgas. Una aportación muy novedosa de este modelo de microalgas consiste en la consideración de dos procesos de crecimiento de las microalgas en función de la fuente de P utilizado: (1) crecimiento a partir del ortofosfato presente en el medio que tiene lugar en condiciones de abundancia de P; (2) crecimiento a partir del polifosfato acumulado internamente que tiene lugar en condiciones de escasez de P. Para la calibración y validación del modelo se han utilizado parte de los datos experimentales obtenidos en la planta piloto que se presentan en el **CAPÍTULO 5**.

Por último se presenta un **CAPÍTULO 7** de síntesis que incluye una discusión general de los principales resultados obtenidos en esta tesis doctoral, y se concluye el trabajo con un **CAPÍTULO 8** de conclusiones.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de esta tesis se ha realizado la puesta en marcha y operación de una planta piloto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) ubicada dentro de las instalaciones de la EDAR Cuenca del Carraixet (Valencia). La planta MPBR (ver Figura 3.1) tiene como finalidad el tratamiento del efluente generado en otra planta piloto situada en la misma EDAR, que consiste en un sistema AnMBR que trata el agua residual doméstica real del influente que llega a la EDAR. La descripción del sistema AnMBR puede consultarse en Giménez et al. (2011).



Figura 3.1. Vista general de la planta MPBR.

La planta MPBR consta de cuatro fotobiorreactores de placa plana (FBR) de $0,55 \text{ m}^3$ cada uno, que ofrecen un volumen total para el cultivo de microalgas de $2,2 \text{ m}^3$. Los FBR se encuentran distribuidos en dos líneas (dos FBR en la parte exterior de la planta y dos FBR en la parte interior). En la Figura 3.2 se muestran los dos FBR de la parte exterior, mientras que la Figura 3.3 muestra una imagen frontal de uno de esos FBR exteriores. Las paredes de los FBR están fabricadas de metacrilato transparente y poseen unas dimensiones de $1,25 \text{ m} \times 2 \text{ m} \times 0,25 \text{ m}$, estando las superficies de mayor tamaño orientadas al sur para maximizar el aprovechamiento de luz solar. Para el desarrollo de

parte de los experimentos utilizados en el trabajo que se presenta en el **CAPÍTULO 6**, se redujo el ancho de los FBR de los 0,25 m a 0,10 m para reducir la distancia del paso de luz a través del cultivo, siendo las dimensiones en este caso 1,25 m x 2 m x 0,10 m. Los cuatro FBR pueden trabajar de manera independiente o conjunta según el accionamiento de unas válvulas todo o nada situadas en la entrada y salida de cada FBR.



Figura 3.2. Imagen frontal de la planta MPBR.

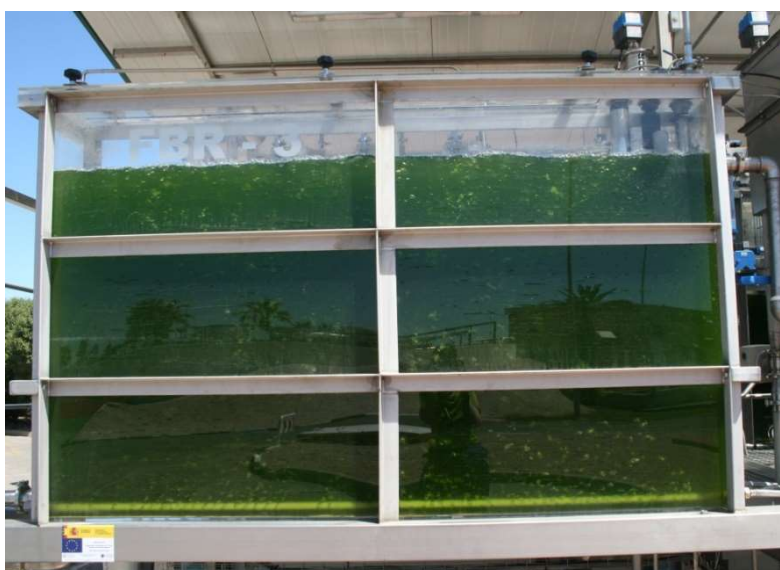


Figura 3.3. Imagen frontal de uno de los FBR de la planta MPBR.

Para permitir la filtración de las microalgas y su cosechado, la planta piloto consta de dos tanques de membranas que ofrecen un volumen de trabajo de $0,3 \text{ m}^3$ cada uno. Cada tanque dispone de un módulo de membranas de ultrafiltración de tamaño industrial (ver Figura 3.4A), en concreto del modelo PURON® PSH31 de la empresa Koch Separation Solutions que contiene 9 racimos de membranas de fibra hueca con una superficie de filtración total de 31 m^2 . Para el desarrollo de parte de experimentación del **CAPÍTULO 6**, se redujo considerablemente el volumen de los tanques de membranas utilizados hasta los $0,014 \text{ m}^3$ cada uno (ver Figura 3.4B), alojando cada tanque un racimo de membranas con una superficie de filtración de $3,44 \text{ m}^2$. Con esta reducción de volumen se pretendía reducir el volumen de cultivo en zona oscura (sin actividad fotosintética) tras haber analizado que un único racimo de membranas era suficiente para permitir una filtración adecuada de las microalgas para las concentraciones de sólidos alcanzadas en los FBR.

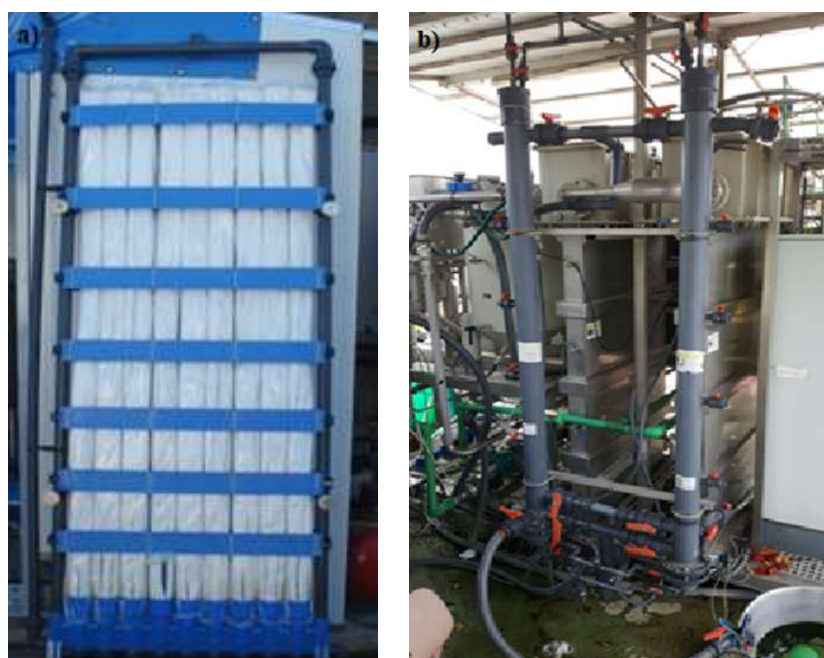


Figura 3.4. Módulos de membrana de ultrafiltración utilizados en esta tesis: (A) Módulo de membranas completo con 9 racimos de membranas; (B) Módulos de membrana simple con 1 único racimo de membranas.

El flujo de agua residual procedente de la planta AnMBR es introducido en la planta MPBR mediante bombeo. Para la recirculación de las microalgas desde los FBR hasta los tanques de membranas se han utilizado y comparado dos sistemas distintos: un sistema de bombeo mecánico y un sistema tipo *airlift*. Estos sistemas de recirculación se explican con mayor detalle en el Apartado de “Materiales y Métodos” del **CAPÍTULO 5**.

Para la monitorización de las distintas variables de estado de la planta piloto MPBR (irradiación solar, temperatura, oxígeno, pH, etc.) y para el control de las principales variables de operación (TRC, TRH, etc.), la planta incorpora un complejo sistema de instrumentación y control que permite automatizar su funcionamiento y desarrollar los experimentos necesarios para evaluar el rendimiento de los cultivos de microalgas y registrar las condiciones ambientales. Este sistema de instrumentación, control y automatización puede consultarse en el trabajo titulado “*ICA applied to Membrane PhotoBioReactors (MPBRs) for wastewater nutrient recovery*” que se incluye en el **CAPÍTULO 3**. Este trabajo fue presentado en el “11th IWA Conference on Instrumentation, Control and Automation” que tuvo lugar en Narbonne (Francia) en el año 2013.

Todas las condiciones de operación de la planta piloto MPBR, las analíticas de laboratorio y cálculos realizados para el seguimiento de los cultivos de microalgas durante la fase de experimentación de la tesis doctoral pueden consultarse en el Apartado de “Materiales y Métodos” de cada uno de los artículos que se presentan.

ICA APPLIED TO MEMBRANE PHOTOBIOREACTORS (MPBRs) FOR WASTEWATER NUTRIENT RECOVERY

Ruiz-Martínez, A., Viruela, A., Gómez-Gil, T., Robles, A., Durán, F., Ruano, M.V., Ribes, J., Aguado, D., Rosado, A., Seco, A., Ferrer, J., 2013. ICA applied to Membrane PhotoBioReactors (MPBRs) for wastewater nutrient recovery. 11th IWA Conference on Instrumentation, Control and Automation. Narbonne, France, IWA.

ABSTRACT

A Membrane PhotoBioReactor (MPBR) demonstration plant with four photobioreactors (PBRs) and two commercial hollow-fibre ultrafiltration systems was designed and operated for nutrient recovery from the effluent of an anaerobic wastewater treatment. A robust ICA system was designed and implemented to achieve a proper process performance. The following operating variables are used for biological process control: treatment flow-rate, microalgal biomass wasting flow-rate, pH in the photobioreactors (PBRs), and aeration intensity both in the PBRs and in the equalisation tank. The main variables controlled for the physical separation process were: permeate flow-rate, transmembrane pressure (TMP), microalgal biomass flow-rate recycled through the membrane tanks, and aeration intensity in the membrane tanks. Several single-input-single-output (SISO) feedback control loops based on conventional on-off and PID algorithms were implemented to control the above-mentioned operating variables. The proposed ICA for MPBRs enables the optimisation of this new technology with a high level of process robustness.

1. INTRODUCTION

Recent studies have demonstrated that microalgal nutrient removal processes offer the possibility of total nutrient recovery from wastewater (Ruiz-Martínez et al., 2012). In order to obtain high microalgal biomass concentrations, membrane filtration appears as a promising alternative since it allows decoupling the hydraulic retention time (HRT) and

the solids retention time (SRT). A Membrane PhotoBioReactor (MPBR) combines the biological nutrient removal process by microalgal biomass production with the physical separation process by membrane filtration to obtain a high effluent quality with low nutrients levels and solids free. Although MPBR technology has not yet been applied to full-scale wastewater treatment, the above-mentioned advantages have increased the scientific community interest on the feasibility of full-scale implementation. In order to investigate this possibility, a MPBR demonstration plant was designed and operated to treat the nutrient loaded effluent from a submerged anaerobic membrane bioreactor (Giménez et al., 2011) where urban wastewater is anaerobically treated. The aim of this paper is to describe the ICA system developed in this plant and to show how it will allow optimising the process performance.

2. MATERIALS

2.1. Demonstration plant description

The MPBR demonstration plant described in this paper consists of four 0.625 m³ PBRs (0.5 m³ working volume) connected to two membrane tanks (MT) with a total volume of 0.8 m³ each (0.2 m³ head-space volume). Each MT includes one industrial hollow-fibre ultrafiltration membrane unit (PURON[®] Koch Membrane Systems (PUR-PSH31), 0.05 µm pores). Each module has 9 HF bundles, 1.8 m long, giving a total membrane surface of 31 m². One 0.34 m³ equalization tank (ET), one 0.25 m³ clean-in-place (CIP) tank and a 0.05 m³ waste tank (WT) are also included.

Figure 3.5 shows a simplified lay-out of the MPBR demonstration plant including the lower-layer controllers. After the homogenization in the ET, the influent is fed to four PBRs, which are continuously aerated by three blowers to improve the performance of microalgal biomass and prevent the fouling of the PBR walls. The microalgal culture is recycled through the ET and the external MTs, where the effluent is obtained by vacuum filtration. The MTs are also continuously aerated through the bottom of each fibre bundle to minimise cake layer formation. A deaeration vessel (DV) installed between each MT and the corresponding vacuum pump recovers the air bubbles extracted with the membrane effluent. The obtained permeate is stored in the CIP tank and the microalgal

wastage is stored in the WT in order to allow the possibility of a later energy recovery (e.g. microalgae digestion). By using two MTs in parallel, the MPBR demonstration plant has been designed and automated with a high level of operating flexibility that enables the plant to work with either one or two MTs, allowing different transmembrane fluxes to be tested without affecting the HRT.

2.2. Membrane performance

The membrane operation was automated to enable the study of various relaxation and back-flush frequencies and durations. Membranes are normally operated according to a specific schedule involving a combination of different stages taken from a basic filtration-relaxation (F-R) cycle. In addition to the classical membrane operating stages (filtration, relaxation, and back-flush) two extra stages were also considered in the membrane operation: deaeration and ventilation. This membrane operation mode is described elsewhere for a similar system (Robles et al., 2012).

3. PROPOSED ICA FOR MPBR SYSTEMS

3.1. Demonstration plant instrumentation

In order to automate and control the plant operation and provide on-line information about the state of the process, numerous on-line sensors and automatic devices were installed in the demonstration plant. The group of on-line sensors consists of the following: 7 pH-temperature transmitters (pH-T) located in the ET, the PBRs and the MTs; 6 solids concentration transmitters (SIT) and 6 dissolved oxygen sensors located in the PBRs and the MTs; 5 liquid-flow transmitters (FIT), one for each of the pumps installed (excepting for the wasting pump) and one for the inflow to each MT; 4 gas-flow transmitters (GFIT) located in the air inflow to the ET, the MTs, and the PBRs; 5 level transmitters (LIT), one for each tank excepting the PBRs (ET, MT-1, MT-2, CIP and WT); 2 liquid pressure transmitters (PIT) to determine the TMP in each MT; 5 air pressure transmitters (PIT), one for the blower system and two for each MT (air inlet and head-space); 7 rotameters,

one for each line of the aeration system; and 2 instantaneous light intensity sensors located on the surface of two PBRs. The group of actuators consists of the following: 6 frequency converters (FC) to control the rotating speed of 3 pumps (the feed pump and the two permeate pumps) and 3 blowers; 4 regulatory valves (RV) to control the air inflow to the ET, the PBRs and the MTs; one on-off valve to control the CO₂ dosage to the aeration system; 6 on-off control valves aimed to control the wastage and the recycling of the microalgal culture to the ET; and 4 on-off control valves to control the different membrane operating stages.

3.2. Demonstration plant automation

A Programmable Logic Controller (Siemens S7-315-DP PLC) is programmed to control the plant operation. The instrumentation is connected to the PLC by digital 0-24VDC, analogue 4-20mA signals, and a Profibus network for specific LANGE[®] analyser communication, using the appropriate input-output modules. The PLC is connected to a PC using an MPI-Profibus PCI internal card (Siemens CP5611) optimised for long distance and high-speed communication. The PLC centralises all the signals from the different sensors and actuators installed in the plant. Data logging and plant control are carried out using a SCADA system installed in the PC. In addition, the SCADA is linked to an OPC server to share the SCADA variables with dedicated control applications installed in the same PC.

3.3. Demonstration plant automation

Based on the instrumentation installed, the pilot plant includes several control loops hierarchically organised in lower layer and upper layer controllers (see Figure 3.5). The group of lower layer controllers consists of the following:

Influent and permeate flow control. All the pumps are controlled through FCs that are manipulated by using traditional PID controllers. The feed pump (P-1) is governed to keep an influent flow set-point based on the corresponding FIT (controller 1). The permeate pumps (P-k1) have three PID control possibilities which manipulate their

frequency in order to: (1) maintain a transmembrane flow set-point based on their corresponding FIT (controllers 9a-k); (2) keep a TMP set-point based on the corresponding PIT (controllers 9b-k); or (3) maintain a level set-point in the ET using the corresponding LIT (controller 9c).

Air flow and pressure control. The air inflow to the tanks is controlled by independent RVs equipped with PID controllers (controllers 2, 3 and k4) which adjust their opening degree to maintain a given air flow set-point. In order to maintain a given operating pressure in the aeration system, each blower can be independently connected and disconnected, and their rotating speed varied using the corresponding PID controller (controller 6). The pressure set-point can be modified by independent supervisory controllers (controllers 7a, 7b and 7c-k) in order to work at the minimum air pressure required in the aeration system.

SRT Control. The SRT is regulated by independent valves (V-k5) connected to the MTs, which allow to perform controlled waste biomass discharges. The SRT controller (controller 10) allows defining the total daily wasting volume and the number of discharges per day.

pH Control. In order to maintain an adequate pH level in the PBRs, a valve allowing the CO₂ dosage into the aeration system is opened when the pH reaches a maximum preset value (controller 5).

Dissolved Oxygen Control. The dissolved oxygen sensors are connected to an ON/OFF controller (C-8) which allows the entry of external air when the dissolved oxygen in any of the PBRs reaches a minimum value (if necessary during the night). Safety Layer Control. To guarantee a safe operation, several safety layer control rules related to level in the tanks, valve positions and pressure measures have been settled. The group of upper layer controllers consist of the following:

Biological process control system. A supervisory controller will be established to optimise the biological process performance taking into account the information obtained from all the sensors (pH, dissolved oxygen, etc.).

Filtration process control system. To optimise the whole operating cost, an advanced control algorithm will be developed to minimise filtration energy consumption.

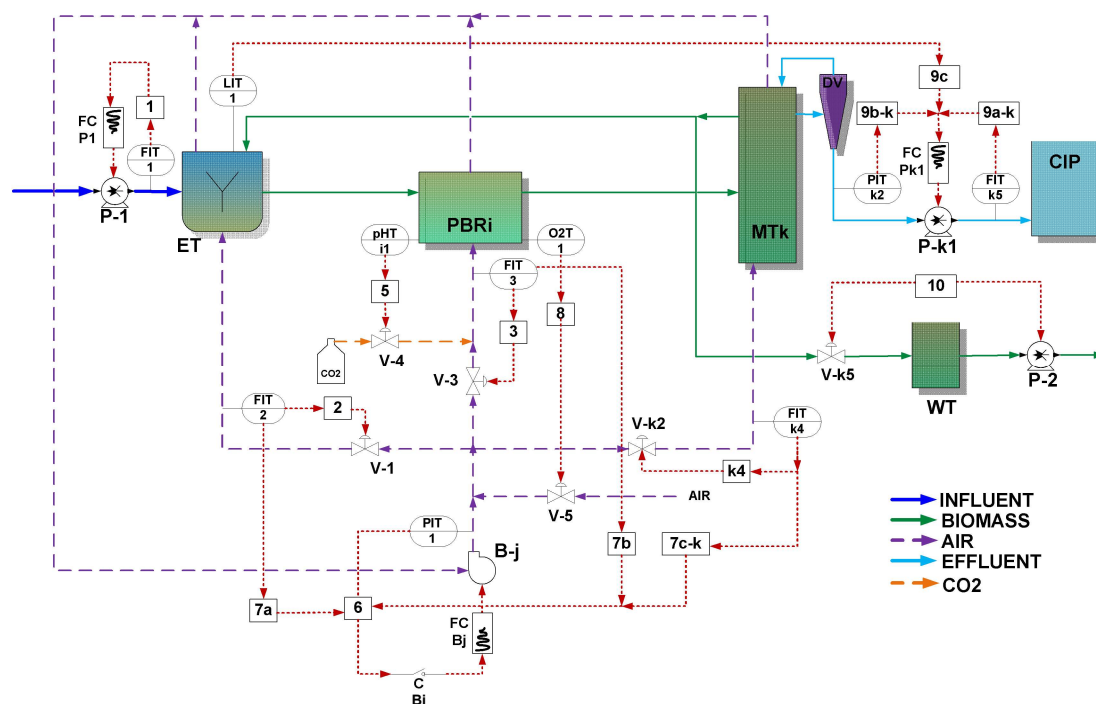


Figure 3.5. Simplified lay-out of the MPBR demonstration plant including the lower-layer controllers (i: photobioreactor index (1 to 4); j: blower index (1 to 3); k: membrane tank index (1 to 2)). Nomenclature: ET: equalization tank; PBR: photobioreactor; MT: membrane tank; DV: deaeration vessel; CIP: clean-in-place; WT: waste tank; P: pump; B: blower; V: valve; and FC: frequency converter.

4. CONCLUSIONS

A robust ICA system for MPBRs is presented in this paper. It has been implemented and tested in a MPBR demonstration plant. Several lower layer control loops have been implemented and are described. These control algorithms enable a suitable and stable process performance. The high level of flexibility provided by the developed ICA system enables various upper layer controllers to be implemented to optimise the performance of the whole MPBR system. The automation degree of the proposed ICA system reduces the involvement of both operators and laboratory personnel, lowers operating costs, and improves process stability under input disturbances.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, Project CTM2011-28595-C02-01/02) jointly with the European Regional Development Fund (ERDF) which are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Giménez, J.B., Robles, A., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M.V., Gatti, M.N., Ribes, J., Ferrer, J., Seco, A., 2011. Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresour. Technol.* 102, 8799–8806. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.014>
- Robles, A., Ruano, M.V., García-Usach, F., Ferrer, J., 2012. Sub-critical filtration conditions of commercial hollow-fibre membranes in a submerged anaerobic MBR (HF- SAnMBR) system: The effect of gas sparging intensity. *Bioresour. Technol.* 114, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.085>
- Ruiz-Martínez, A., Martín García, N., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2012. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour. Technol.* 126, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>

CAPÍTULO 4

**WATER RESOURCE RECOVERY BY MEANS OF
MICROALGAE CULTIVATION IN OUTDOOR
PHOTOBIOREACTORS USING THE EFFLUENT
FROM AN ANAEROBIC MEMBRANE
BIOREACTOR FED WITH PRE-TREATED SEWAGE**

CAPÍTULO 4:**WATER RESOURCE RECOVERY BY MEANS OF MICROALGAE CULTIVATION IN OUTDOOR PHOTOBIOREACTORS USING THE EFFLUENT FROM AN ANAEROBIC MEMBRANE BIOREACTOR FED WITH PRE-TREATED SEWAGE**

Viruela, A., Murgui, M., Gómez-Gil, T., Durán, F., Robles, Á, Ruano, M.V., Ferrer, J., 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. *Bioresour. Technol.* 218, 447–454. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.116>

ABSTRACT

With the aim of assessing the potential of microalgae cultivation for water resource recovery (WRR), the performance of three 0.55 m³ flat-plate photobioreactors (PBRs) was evaluated in terms of nutrient removal rate (NRR) and biomass production. The PBRs were operated outdoor (at ambient temperature and light intensity) using as growth media the nutrient-rich effluent from an AnMBR fed with pre-treated sewage. Solar irradiance was the most determining factor affecting NRR. Biomass productivity was significantly affected by temperatures below 20°C. The maximum biomass productivity (52.3 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹) and NRR (5.84 mg NH₄-N·L⁻¹·d⁻¹ and 0.85 mg PO₄-P·L⁻¹·d⁻¹) were achieved at solar irradiance of 395 μE·m⁻²·s⁻¹, temperature of 25.5°C, and HRT of 8 days. Under these conditions, it was possible to comply with effluent nutrient standards (European Directive 91/271/CEE) when the nutrient content in the influent was in the range of 40-50 mg N·L⁻¹ and 6-7 mg P·L⁻¹.

1. INTRODUCTION

In recent years, there has been an increasing interest in the development of new mainstream (and sidestream) treatment units allowing to move from the current WWTPs towards the so-called water resource recovery facilities (WRRFs). Consequently, maximising energy efficiency and resource recovery has become a key issue in the sewage treatment field (Beuckels et al., 2015).

Microalgae-based systems appear as a “green” alternative for sewage treatment (Judd et al., 2015; Zhou et al., 2014). Autotrophic microalgae are photosynthetic microorganisms that use inorganic carbon (CO_2 and HCO_3^-) for biomass production and obtain the energy needed for growth and metabolism from light. Moreover, the required macronutrients (N and P) are taken up in the form of inorganic compounds such as ammonium (NH_4^+) and phosphate (PO_4^{3-}). The generated algal biomass can be valorised in various ways for energy recovery (biofuel production) and nutrient recovery (fertiliser production) (Brenan and Owende, 2010).

Microalgae cultivation can be applied in different stages of the sewage treatment cycle depending on the wastewater nutrient content (Alcántara et al., 2015; Valverde-Pérez et al., 2015). For instance, Ruiz-Martínez et al. (2012) showed that the effluent from an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) fed with pre-treated sewage can be successfully applied for microalgae cultivation since it is commonly enriched in NH_4^+ and PO_4^{3-} . Therefore, when it is not possible to recycle the effluent from an AnMBR system for irrigation or fertigation purposes, microalgae cultivation represents an interesting alternative for nutrient recovery. In addition, AnMBR have been reported as a promising water resource recovery (WRR) process (see, for instance, Pretel et al., 2016; Smith et al., 2014) since it combines the main advantages of anaerobic-based technology (biogas production and reduced power consumption and sludge production) and filtration-based technology (small footprint, complete retention of biomass and generation of high-quality and solid-free effluent).

Hence, the combination of AnMBR and microalgae-based technologies can be considered an interesting approach for recovering nutrients and energy from sewage whilst reducing carbon footprint, providing therefore the desired step from WWTPs to WRRFs.

Open pond systems and closed-air photobioreactors (PBRs) are the leading contenders for large-scale microalgae cultivation. Although open ponds present relatively low costs, closed-air PBRs allows efficiently increasing microalgae cultivation yields mainly because these systems reduce culture contamination (e.g. pathogens, predators). Other benefits of closed-air PBRs are: (1) reduced footprint, (2) increased volumetric productivities, (3) enhanced gas (CO₂) transfer, and (4) protection from outdoor climate-related impacts such as rainfall and evaporation (Maity et al., 2014).

The application of closed-air PBRs for sewage treatment has been mostly reported at lab-scale using artificial light and/or temperature control (see, for instance, Krustok et al., 2016; Medina and Neis, 2007; Ruiz-Martínez et al., 2012). However, microalgae cultivation in pilot-scale PBRs operated at ambient solar irradiance and temperature has been much less examined (Arbib et al., 2013a; Gouveia et al., 2016), which is necessary for establishing the baselines for future cultivation improvements in this kind of systems (Schoepp et al., 2014).

The objective of this study was to evaluate the potential use of microalgae cultivation for nutrient recovery in WRRFs. To this aim, three pilot-scale PBRs (working volume of 0.55 m³) were operated using the nutrient-rich effluent from an AnMBR pilot-plant (Giménez et al., 2011) that treated sewage. Specifically, the AnMBR was fed with effluent from the pre-treatment (screening, degritter and grease removal) of the Carraixet WWTP (Valencia, Spain). The PBR plant was operated outdoor (i.e. at ambient solar irradiance and temperature); and the nutrient loading rate (NLR) varied depending on both Carraixet WWTP intake dynamics and AnMBR performance. Hence, the performance of the PBR system (microalgae growth and nutrient uptake) was evaluated under similar conditions to the ones expected at likely full-scale plants.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. PBR description

Microalgae cultivation was performed in three outdoor flat-plate PBRs made of transparent methacrylate. Each PBR had a total and working volume of 0.62 m³ and 0.55 m³, respectively. Their dimensions were 1.25-m height, 2-m width and 0.25-m depth. All three PBRs were south-facing to take full advantage of solar irradiance and were located in the Carraixet WWTP (39°30'04.0''N 0°20'00.1''W, Valencia, Spain). The PBRs were operated independently at different time periods from September to December. Figure 4.1 shows the flow diagram of the PBR plant used in this study. The plant was fed with the nutrient-rich effluent from an AnMBR pilot plant (see Giménez et al., 2011) that treated sewage. Specifically, the AnMBR was fed with effluent from the pre-treatment (screening, degritter and grease removal) of the Carraixet WWTP (Valencia, Spain). The influent was pumped to a 0.1 m³ distribution chamber (DC) from which it was fed equally by gravity into three PBRs (PBR1, PBR2 and PBR3).

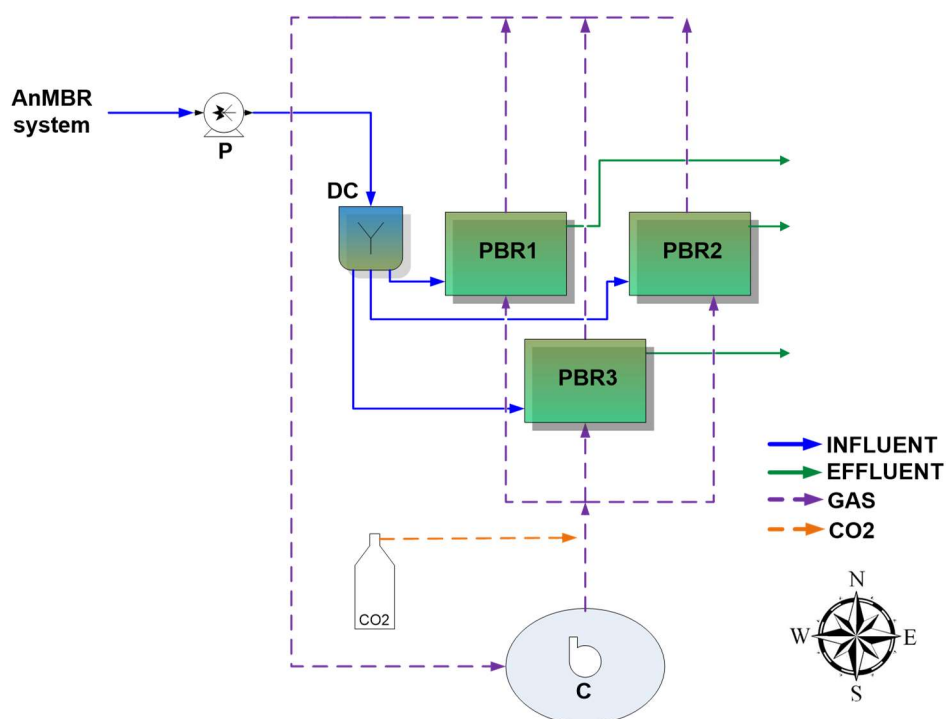


Figure 4.1. Flow diagram of the PBR system. Nomenclature: DC: distribution chamber; PBR: photobioreactor; P: pump; C: compressor.

The PBRs were continuously stirred by gas sparging, which promoted proper mixing conditions, avoided wall fouling and ensured adequate CO₂ transference within the broth column. To this aim, one compressor (C) recycled gas continuously from the headspace of the PBRs to the system, which allowed to reduce CO₂ losses as well. The flow-rate of gas entering each PBR was set to 0.061 vvm (2 m³·h⁻¹). To maintain suitable microalgal growth rates and avoid undesirable chemical processes (e.g. phosphate precipitation and free ammonia stripping), pH was controlled at 7.5 by introducing pure CO₂ (99.9%) from a pressurised bottle into the system through the gas recycling pipe. The amount of CO₂ fed to each PBR during the experimental period ranged from 2.45 to 5.73 mg CO₂·L⁻¹·d⁻¹.

Each PBR was equipped with a pH-temperature (pHD sc Hach) transmitter and a dissolved oxygen (DO) transmitter (LDO sc Hach). Moreover, an on-line irradiation sensor (Apogee Quantum) was installed on the surface of the PBRs for measuring the photosynthetically active radiation (PAR).

2.2. Microalgae inoculation

Microalgae were originally collected from the secondary settler of the Carraixet WWTP, thus the microorganisms were already adapted to the environmental conditions and sewage matrix. These indigenous microalgae were selected for process inoculation since previous studies shown that a natural bloom of these genus (*Scenedesmus* sp. and/or *Chlorella* sp.) was observed in the reactor when seeking the natural colonisation of the system. Moreover, previous studies conducted with other isolated species resulted in the development of a culture with a vast predomination of *Scenedesmus* sp. and/or *Chlorella* sp. after several days of operation (data not shown).

Then, microalgae biomass was pre-cultivated in batch mode at bench-scale using a cylindrical, transparent methacrylate reactor (internal diameter of 20 cm) with a total volume of 10 L. Four arrays of 3 vertical fluorescent lamps (Sylvania GroLux, 18 W), which were distanced each other by 10 cm, illuminated the reactor continuously from a distance of 10 cm. Light intensity was set to 200 μE·m⁻²·s⁻¹, measured at the surface of the reactor. This reactor was placed inside a climatic chamber with air temperature control

set to 22°C. To this aim, effluent from the aforementioned AnMBR was used as growth medium. The biomass in the laboratory reactor formed a stable culture of microalgae with a vast predominance of *Scenedesmus* sp. (>99%). PBR1 was inoculated using microalgae pre-cultivated at laboratory conditions. PBR2 and PBR3 were inoculated using wasted microalgae biomass obtained during the operation of PBR1 and PBR2, respectively. The PBR start-up procedure consisted in the following: i) inoculation of the PBR with the microalgae culture from laboratory or a previously operated PBR (10% of total working volume with volatile suspended solids (VSS) concentration between 300-500 mg·L⁻¹); ii) conditioning stage in batch mode until reaching pseudo-steady state conditions (i.e. reaching stable VSS concentration); and iii) start-up of an automatic semi-continuous feeding mode during daylight hours.

2.3.PBR operation

As reported before, the PBRs were fed using the nutrient-rich effluent from an AnMBR fed with pre-treated sewage. Therefore, the nutrient load entering the PBRs varied depending on both WWTP intake dynamics and AnMBR performance. The main characteristics of the influent to the PBR plant during the whole experimental period were ammonium (NH_4^+) of 55.2 ± 15.6 mg N·L⁻¹, phosphate (PO_4^{3-}) of 6.8 ± 1.7 mg P·L⁻¹, N:P mass ratio of 8.1 ± 0.7 g N·g⁻¹P, total COD of 35 ± 6 , alkalinity of 448 ± 96 mg CaCO₃·L⁻¹ and VFA of 1.75 ± 0.5 mg HAc·L⁻¹. Nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) in the influent were negligible.

The whole experimental period (from September to December) was divided into different operating periods (i, ii and iii) according to the operated PBR. Specifically, period i, ii and iii comprised the operation of PBR1, PBR2 and PBR3, respectively. The PBRs were operated within September-December, October-November and October-December, respectively. In addition, operating period i and iii were sub-divided into two sub-periods (sub-periods i1 and i2 and sub-periods iii1 and iii2) according to the operating HRT and environmental conditions, respectively. Table 4.1 shows the average operating and environmental conditions for the pseudo-steady state reached at the end of each operating (sub-)period. Temperature and solar irradiation varied depending on ambient conditions.

Two HRTs were evaluated in this study: 14 and 8 days. HRT of 14 days was only applied during sub-period i2.

Table 4.1. Average operating and environmental conditions within the pseudo-steady state of each operating (sub-)period.

Period	Duration (d)	HRT (days)	Allylthiourea (mg·L ⁻¹)	Ammonium loading rate (g NH ₄ -N·d ⁻¹)	Phosphate loading rate (g PO ₄ -P·d ⁻¹)	Influent N:P ratio (g N·g ⁻¹ P)	Solar irradiance (μE·m ⁻² ·s ⁻¹)	Temperature (°C)
P. i1	30	8	5	3.07 ± 0.07	0.36 ± 0.03	8.6 ± 0.9	148 ± 36	24.6 ± 0.6
P. i2	64	14	10	3.20 ± 0.73	0.36 ± 0.08	8.7 ± 0.4	124 ± 117	15.4 ± 0.8
P. ii	27	8	10	2.86 ± 0.09	0.37 ± 0.03	7.5 ± 0.6	317 ± 107	22.9 ± 2.1
P. iii1	24	8	10	2.61 ± 0.21	0.34 ± 0.02	7.7 ± 0.2	402 ± 84	20.7 ± 0.5
P. iii2	41			5.00 ± 0.46	0.58 ± 0.06	8.7 ± 0.5	290 ± 162	17.6 ± 2.2

Allylthiourea was used in order to inhibit nitrification in the PBRs (Krustok et al., 2016). Thus, the main process responsible for nitrogen depletion was nitrogen uptake by microalgae. Allylthiourea was added at the concentration of 5 or 10 mg·L⁻¹.

In this study, biomass productivity (mg VSS·L⁻¹·d⁻¹) and nitrogen-NRR (mg N·L⁻¹·d⁻¹) and phosphorus-NRR (mg P·L⁻¹·d⁻¹) were calculated as follows:

$$\text{Biomass productivity} = \frac{X_{VSS}}{\text{HRT}} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

where X_{VSS} (mg VSS·L⁻¹) is the volatile suspended solids concentration in the PBR.

$$\text{nitrogen - NRR} = \frac{N_i - N_e}{t \cdot V_{PBR}} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

where N_i is the mass of nitrogen entering the system, N_e is the mass of nitrogen leaving the system in the effluent, t is the interval of time considered, and V_{PBR} is the volume of the medium in the PBR.

$$\text{phosphorus - NRR} = \frac{P_i - P_e}{t \cdot V_{PBR}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

where P_i is the average mass of phosphorus entering the system and P_e is the average mass of phosphorus leaving the system in the effluent.

2.4. Sampling and Analytical Methods

In order to evaluate the process performance, grab samples were collected from influent and effluent streams three times per week. It is important to note that the PBRs were operated semi-continuously at large HRTs (14 and 8 days). Therefore, the system equalised possible sudden variations in the influent load. Moreover, the influent to the PBR plant was the effluent from an AnMBR system operated at HRT of around 1 day and SRT of 70 days. Thus, grab samples allowed capturing the dynamics observed in influent and effluent streams of the PBRs. The soluble fraction (filtrate) was obtained by vacuum filtration with 0.45 mm pore size filters (Millipore). Ammonium (NH_4^+), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-), and phosphate (PO_4^{3-}) were determined in the filtrate according to Standard Methods (APHA, 2005) (methods 4500-NH3-G, 4500-NO2-B, 4500-NO3-H, and 4500-P-F, respectively) in a Smartchem 200 automatic analyser (Westco Scientific Instruments, Westco). Effluent VSS was also analysed according to Standard Methods (APHA, 2005) (method 2540 E). All measurements were performed in duplicate. The uncertainty associated with each presented value includes: 1) the standard deviation of duplicates analysed throughout the experimental period, and 2) the coefficient of variation associated with the analytical method.

Eukaryotic cell number ($cells \cdot L^{-1}$) was determined by epifluorescence microscopic methods (Pachés et al., 2012) using a Leica DM2500 microscope which incorporates a 100x oil-immersion objective. In this measurement, a minimum of 300 cells were counted and at least 100 cells of the most abundant species were counted with an error below 20% (Lund et al., 1958).

2.5. Partial least squares regression (PLSR)

Partial least squares regression (PLSR) is a type of multivariate analysis (two-block predictive PLS) for relating two data matrices, X and Y, by a linear multivariate model

(Wold et al., 2001). PLSR allows to model one or several responses (Y) from a set of predictors (X) while reducing the dimensionality of the explanatory variables. Moreover, this method identifies the predictors that better explain the information content between the X and Y data sets.

mixOmics library (<http://www.mixOmics.org>) through the R statistical package version 3.2.3 (<http://www.R-project.org>) was used in this study to implement the PLSR algorithm.

PLSR algorithm was conducted to evaluate the effect of different operating and environmental factors (i.e. predictors, X) on several process performance indicators (i.e. responses, Y). Specifically, the set of predictors evaluated consisted of the following: nitrogen to phosphorus ratio in the influent, nutrient loading rate referred to nitrogen, nutrient loading rate referred to phosphorus, temperature and light intensity. The responses evaluated consisted of: biomass productivity, nutrient removal rate referred to nitrogen and nutrient removal rate referred to phosphorus.

3. RESULTS AND DISCUSSION

By way of example, Figure 4.2 illustrates the time evolution profiles of PAR, pH, DO and temperature within two days of operation of period ii. These time evolution profiles followed a similar pattern in the rest of operating periods evaluated. As this figure shows, DO behaved similarly to PAR during daylight hours, recording therefore maximum DO values around midday. Despite oxygen consumption due to microalgae respiration, an upward trend was observed in DO during night-time hours. This upward trend was related to temperature variations affecting oxygen solubility in water. Indeed, DO varied according to culture temperature during night-time hours, meeting the saturation concentration of DO in water for each operating temperature.

CO₂ was automatically fed to the system in order to keep the pH at values around 7.5, even during daylight hours with high solar irradiance. It has been extensively reported that pH values above 9 negatively affect microalgae culture since it allows phosphate precipitation and free ammonia volatilisation (Arbib et al., 2013b).

During the whole experimental period (periods i, ii and iii), the PBRs resulted in a stable culture of microalgae with a vast predominance of *Scenedesmus* sp. (> 99%) and one-time appearances of *Chlorella* sp. Those microalgae species (*Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp.) are the species most frequently observed in microalgae-based wastewater treatment systems (Morales-Amaral et al., 2015). By way of example, Figure 4.A.1 in Appendix A shows a microscopic image of the microalgae culture from PBR1.

The predominance of a given species of microalgae among others seems to be related not only to environmental conditions such as temperature and solar irradiance intensity but also to the availability of N and P in the medium since microalgae are able to adjust their intracellular macronutrient content (Beuckels et al., 2015). Rhee (1978) found that the optimal cellular N:P mass ratio of *Scenedesmus* sp. was $13.6 \text{ g N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ P}$. Silva et al. (2015) reported an optimal N:P mass ratio of 3.6 for *Chlorella* sp. In our study, the observed influent N:P mass ratio was 8.1 ± 0.7 , which favoured the predominance of *Scenedesmus* sp. versus *Chlorella* sp. In addition, the influent N:P mass ratio was in the optimum range for nutrient removal reported by Xin et al. (2010) for *Scenedesmus* sp. ($5\text{-}20 \text{ g N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ P}$). In addition, there are other factors, such as environmental conditions (temperature and solar irradiance), pH, nutrient levels, shear stress due to aeration intensity, among others, that also affect the inter-specie competition and therefore the prevailing species.

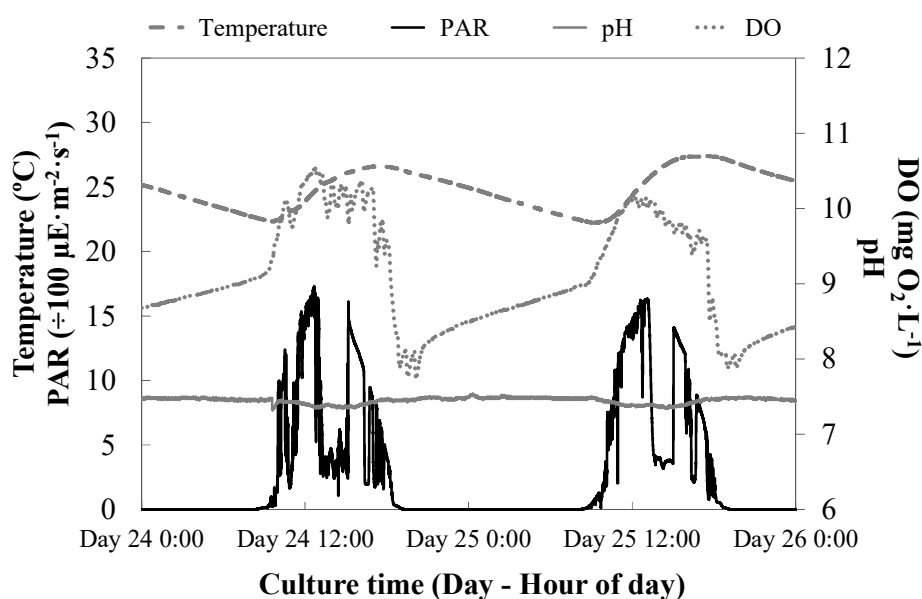


Figure 4.2. Time evolution profiles within two days of operation of solar irradiance (PAR), temperature, pH and DO.

As regards organic matter removal, the influent to the PBRs was characterised by low COD levels ($35 \pm 6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Most of this COD was non-biodegradable as this stream came from an AnMBR plant that degraded almost all biodegradable organic matter. Indeed, soluble COD concentrations in influent and effluent streams from the PBRs were nearby the same, which corroborated that there was not meaningful heterotrophic activity (either bacteria or microalgae) throughout the experimental period.

3.1.Period i. PBR performance at different levels of temperature and HRT

As Figure 4.3 shows, PBR1 was operated for 94 days at different levels of temperature (around 25 and 15°C for the pseudo-steady state reached at the end of sub-periods i1 and i2, respectively – see Table 4.1) and HRT (8 during sub-period i1 and 14 days during sub-period i2). As previously commented, period i was divided into two sub-periods according to the applied HRT. Although both solar irradiance and temperature varied freely depending on ambient conditions due to the outdoor operation, PAR resulted in similar average levels for the pseudo-steady state reached at the end of sub-periods i1 and i2 (see Table 4.1). Therefore, its effect on average process performance was not strictly considered during operating period i.

On the other hand, the ammonium and phosphate contents in the influent remained fairly constant until day 60 (see Figure 4.3a). After day 60 of operation, these contents underwent an important increase according to WWTP intake dynamics and AnMBR operation, reaching average pseudo-steady state values at the end of the operating period of $84.6 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ and $9.7 \text{ mg PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$. Nevertheless, NLR remained in similar values at the end of sub-periods i1 and i2 (see Table 4.2) because of operating at different HRT levels.

As Figure 4.3a shows, the effluent ammonium and phosphate concentrations increased during sub-period i1 (operating at HRT of 8 days) until reaching the pseudo-steady state around day 24. Although temperature remained close to the optimum value for *Scenedesmus* sp. (optimal growth rates were reported by Xin et al. (2011) at 25°C), the low values recorded in solar irradiance (average pseudo-steady state value of $148 \pm 36 \text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) combined with the applied HRT favoured biomass washout. Specifically,

biomass concentration decreases from approx. $300 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5\cdot 10^9 \text{ cells}\cdot\text{L}^{-1}$ to values of around $200 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3\cdot 10^9 \text{ cells}\cdot\text{L}^{-1}$ at the end of sub-period i1. Specifically, the pseudo-steady state biomass productivity and nutrient removal rate (NRR) in sub-period i1 resulted in $23.4 \pm 0.6 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $2.08 \pm 1.17 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $0.17 \pm 0.17 \text{ mg PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively; whilst the pseudo-steady state ammonium and phosphate removal efficiency resulted in $41.6 \pm 4.0\%$ and $36.1 \pm 5.9\%$, respectively.

HRT was increased from 8 to 14 days at the very beginning of sub-period i2. From day 30 to 60, the increment in HRT resulted in a consequent decrease in NLR since the influent ammonium and phosphate concentrations remained nearby constant (see Figure 4.3a). In addition to the increment in HRT, an increase in solar irradiance was also registered between days 30 and 60. Due to the increase registered in both HRT and PAR, nitrogen-NRR and biomass productivity experimented a significant increase. Specifically, nitrogen-NRR increased from approx. 1.25 to $2.35 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and biomass concentration increased from approx. 176 to $361 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. This was mainly related to reduced microalgae washout and increased microalgae growth rate due to increased HRT and PAR, respectively.

However, the increment in HRT was compensated at the end of sub-period i2 by the increase recorded in the influent ammonium and phosphate concentrations from day 60 until the end of the operating period (see Figure 4.3a). Indeed, NLR and N:P ratios yielded values comparable to the ones recorded during the pseudo-steady state of sub-period i1 (see Table 4.1). Moreover, after day 52, the daily average temperature experimented an important decrease, remaining in values around 15°C until the end of sub-period i2. These values were far away from the optimal temperature of 25°C reported by Xin et al. (2011). On the other hand, the solar irradiance reached values at the end of sub-period i2 similar to the ones from the pseudo-steady state from sub-period i1 (see Table 4.1). Under those environmental and operating conditions, PBR1 achieved similar biomass concentrations at the end of sub-period i2 (around $200 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3\cdot 10^9 \text{ cells}\cdot\text{L}^{-1}$) than the ones obtained at the end of sub-period i1. Nevertheless, biomass productivity ($13.8 \pm 1.1 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and nitrogen-NRR ($0.81 \pm 0.52 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) were lower. Hence, the results showed that nearly doubling HRT does not guarantee increased biomass productivity and NRR in outdoor microalgae cultivation when operating at low

temperature (around 15°C). In this respect, Larsdotter (2006) stated that HRT must not exceed the required time to maintain optimum growth rates of microalgae. Indeed, Kim et al. (2014) concluded that increasing HRT excessively may result in low NRR and biomass productivity. Thus, it is necessary to optimise the operating HRT depending on environmental conditions.

Allylthiourea concentration in PBR1 was set to 5 mg·L⁻¹ during sub-period i1, which seemed to be enough to control nitrifying bacteria since nitrite and nitrate concentrations remained close to 0 mg N·L⁻¹. However, an important nitrifying activity was registered between days 45 and 50 (see Figure 4.3a), which was mainly attributed to the increase in HRT. Therefore, in order to inhibit ammonium oxidation bacteria and to study the potential microalgae nutrient uptake, allylthiourea concentration was increased from 5 to 10 mg·L⁻¹ for the rest of the experimental period (nitrite and nitrate concentrations quickly decreased according to the dilution rate).

The microalgae ammonium-NRR observed throughout operating period i was lower than other values reported in literature for *Scenedesmus* sp. For instance, Park et al. (2010) reported NRR of 5-6 mg NH₄-N·L⁻¹·d⁻¹ when treating the nutrient-rich effluent from an anaerobic digester fed with piggery wastewater and applying cycles of artificial light (PAR of 200 μE·m⁻²·s⁻¹ during 12 hours per day). On the other hand, Ruiz-Martínez et al. (2012) reported NRR of 19.5 mg NH₄-N·L⁻¹·d⁻¹ and 3.7 mg PO₄-P·L⁻¹·d⁻¹ treating effluent from the AnMBR used in this study and working at lab-scale with continuous artificial illumination (PAR of 114 and 198 μE·m⁻²·s⁻¹ during 24 hours per day). These results suggest that higher NRR could be obtained under more favourable outdoor conditions.

As Figure 4.3a shows, within operating period i, the higher the influent nutrient concentration the higher the effluent nutrient concentration. This behaviour is in agreement with Arbib et al. (2013a), who reported that effluent nutrient concentration trends follow influent nutrient concentration trends in non-nutrient limited and outdoor microalgae cultivation (limited by ambient temperature and light conditions), for given operating conditions.

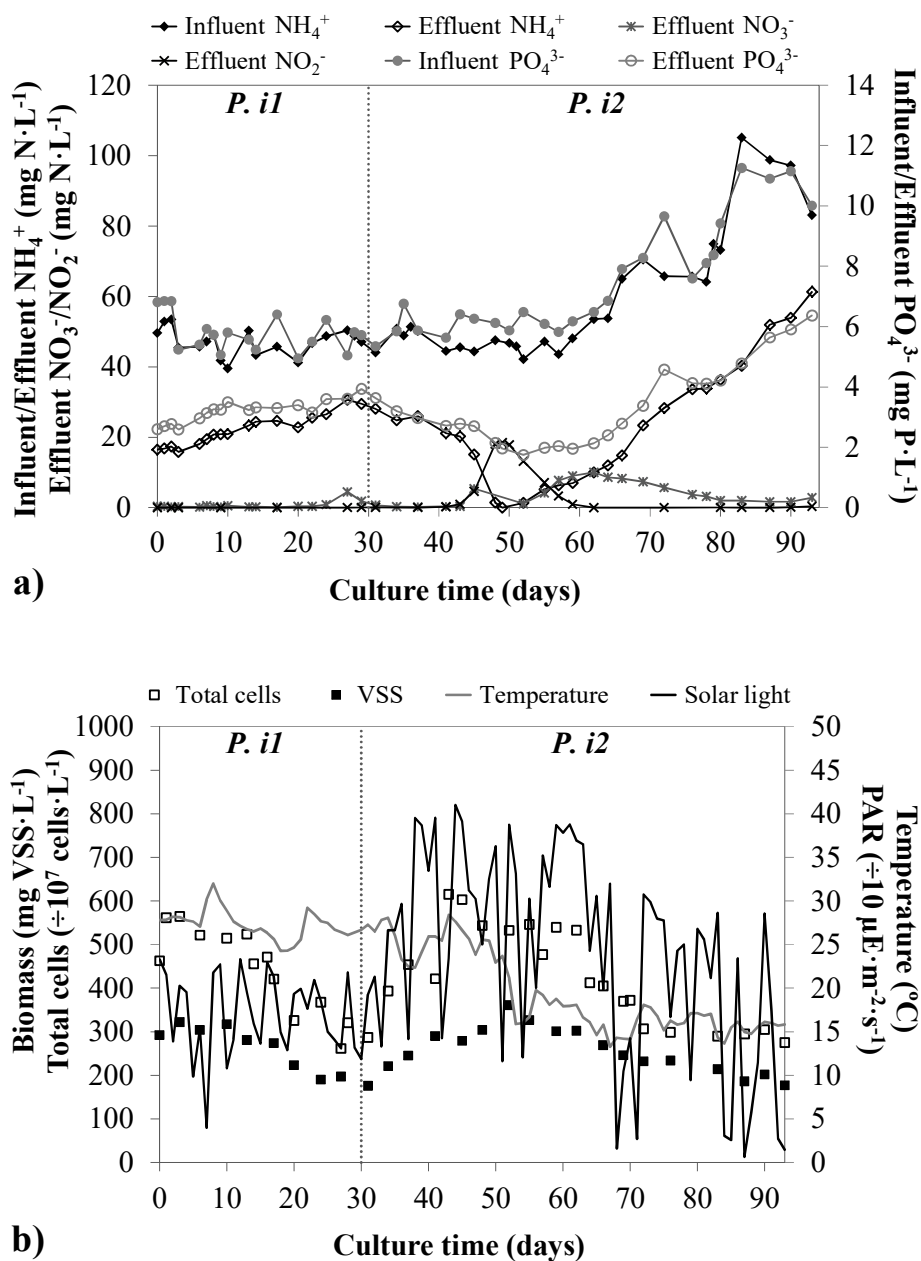


Figure 4.3. Operating period i. Time evolution of: (a) influent and effluent nutrient concentration (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- and PO_4^{3-}); and (b) biomass concentration, total cells, solar irradiance (PAR) and temperature. The vertical line indicates the shift from sub-period i1 to sub-period i2.

3.2. Period ii. PBR performance at nearby stable levels of solar irradiance and temperature

As Figure 4.4 shows, PBR2 was operated for 27 days at HRT of 8 days and fairly constant NLR ($47.0 \pm 2.6 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5.8 \pm 0.8 \text{ mg PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$). During this operating period, solar irradiance and temperature varied freely depending on ambient conditions as well. Nonetheless, PAR and temperature remained nearby stable around a given level (see Table 4.1).

Biomass productivity and NRR remained fairly constant during the whole operating period, resulting in values of $30.5 \pm 1.8 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $3.94 \pm 0.44 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (ammonium removal efficiency of $54.4 \pm 4.0\%$) and $0.41 \pm 0.07 \text{ mg PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (phosphorus removal efficiency of $55.9 \pm 0.9\%$), respectively, within the pseudo-steady state period. Although average operating temperature and NLR during period ii were similar to the ones from sub-period i1 (also operated at HRT of 8 days), period ii resulted in higher NRR and biomass productivity. Microalgae concentration yielded values of around $250 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5\cdot 10^9 \text{ cells}\cdot\text{L}^{-1}$ at the end of operating period ii (these values were also higher than the ones resulting from sub-period i1). The higher NRR and biomass productivity obtained in period ii was attributed to the higher solar irradiance achieved at the pseudo-steady state and also to the fact that no cloudy days were registered during period ii (cloudy days were defined as days with average PAR below $125 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

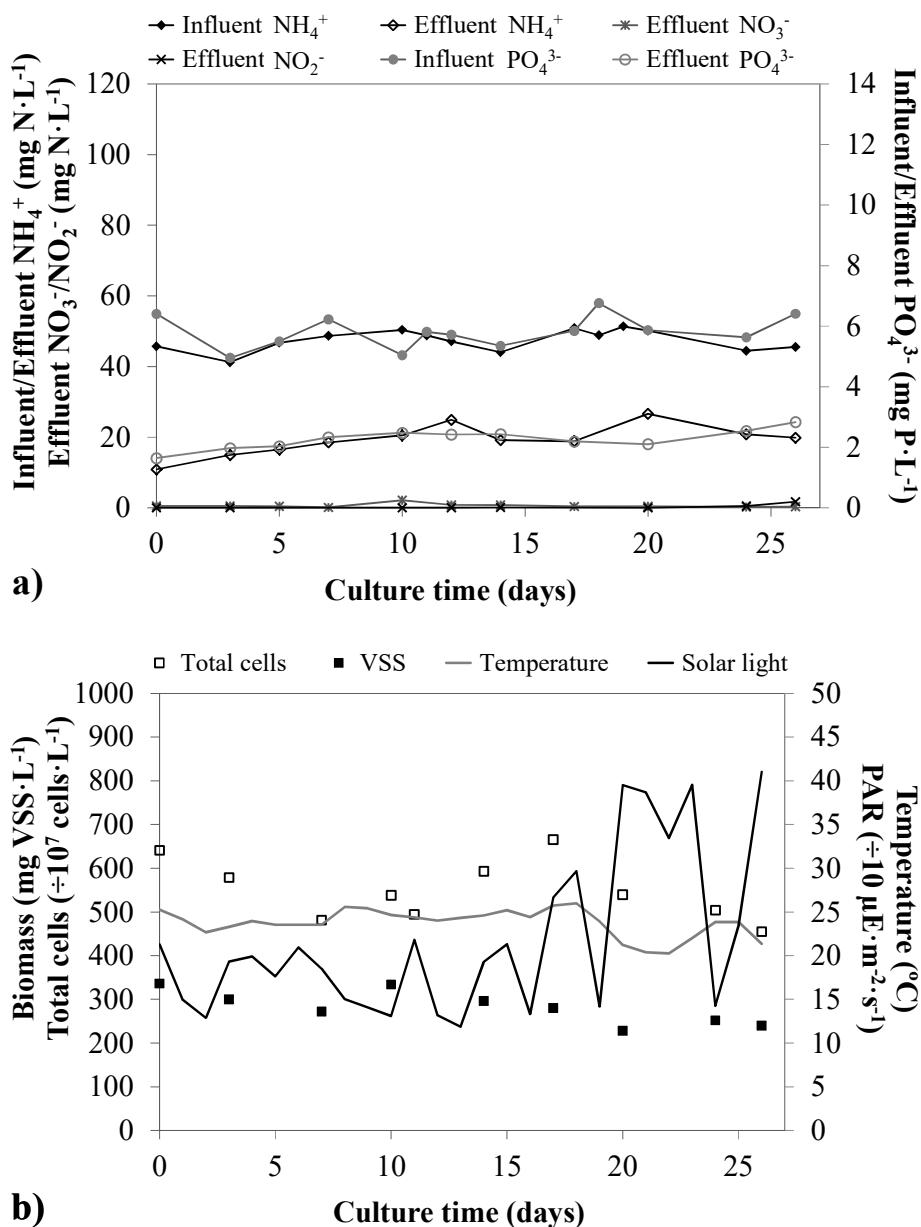


Figure 4.4. Operating period ii. Time evolution of: (a) influent and effluent nutrient concentration (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- and PO_4^{3-}); and (b) biomass concentration, total cells, solar irradiance (PAR) and temperature.

3.3.Period iii. PBR performance at different levels of NLR and solar irradiance

As Figure 4.5 shows, PBR3 was operated for 64 days at different levels of solar irradiance (around 402 and 290 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) and NLR (2.61 $g\ NH_4-N \cdot d^{-1}$ and 0.34 $g\ PO_4-N \cdot d^{-1}$, and 5.00 $g\ NH_4-N \cdot d^{-1}$ and 0.58 $g\ PO_4-N \cdot d^{-1}$) at the pseudo-steady state reached at the end of

sub-periods iii1 and iii2, respectively (see Table 4.1). Although temperature varied freely depending on ambient conditions, it resulted in similar levels for both pseudo-steady states (see Table 4.1). Thus, its effect on average process performance was not strictly considered during operating period iii. However, a significant decrease in temperature was observed throughout sub-period iii1, registering daily average values around 30°C at the beginning and 20°C at the end of this sub-period.

Equal to PBR1 (operating period i), the ammonium and phosphate contents in the influent to PBR3 remained fairly constant during sub-period iii1 (47.2 ± 2.9 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ and 6.1 ± 0.7 mg $\text{PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$, see Figure 4.5a). Nevertheless, these contents suffered an important increase according to WWTP intake dynamics and AnMBR operation during sub-period iii2, reaching average pseudo-steady state values at the end of the operating period of 84.6 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ and 9.7 mg $\text{PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$. Contrary to operating period i, NLR increased significantly from sub-period iii1 to sub-period iii2 (see Table 4.1) due to operating at constant HRT levels.

Sub-period iii1 resulted in pseudo-steady state NRR values of 4.75 ± 0.03 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (removal efficiency of $75.2 \pm 2.2\%$) and 0.51 ± 0.08 mg $\text{PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (removal efficiency of $77.9 \pm 1.4\%$). Moreover, this sub-period resulted in the maximum gross NRR of the study: 5.84 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and 0.85 mg $\text{PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, which corresponded to removal efficiencies of 84.1% and 95.1% for N and P, respectively. However, a significant decrease in NRR was observed in sub-period iii2, with minimum average values of 1.99 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and 0.30 mg $\text{PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ at the end of the sub-period (ammonium and phosphorus removal efficiencies of 69.4% and 66.2%, respectively). The pseudo-steady state NRR values of sub-period iii2 were 3.35 ± 0.57 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (removal efficiency of $36.3 \pm 6.5\%$) and 0.61 ± 0.13 mg $\text{PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (removal efficiency of $45.5 \pm 5.3\%$).

Similar to the performance of PBR1, Figure 4.5 illustrates how the higher the influent nutrient concentration is the higher the effluent nutrient concentration is in non-nutrient limited conditions for microalgae cultivation operated at given conditions (see sub-periods i2 and iii2). On the other hand, in the case of sub-period iii1 (PBR3 performance), N and P were removed by *Scenedesmus* sp. below the current EU emission standards (10 mg $\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ and 2 mg $\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$, 91/271/CEE and 98/15/EC Urban Wastewater Treatment

Directive, European Commission Directive, 1998) when the influent nutrient content was around $40\text{-}50\text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6\text{-}7\text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$. These results are in agreement with Beuckels et al. (2015), who operated at bench-scale and optimal temperature and light.

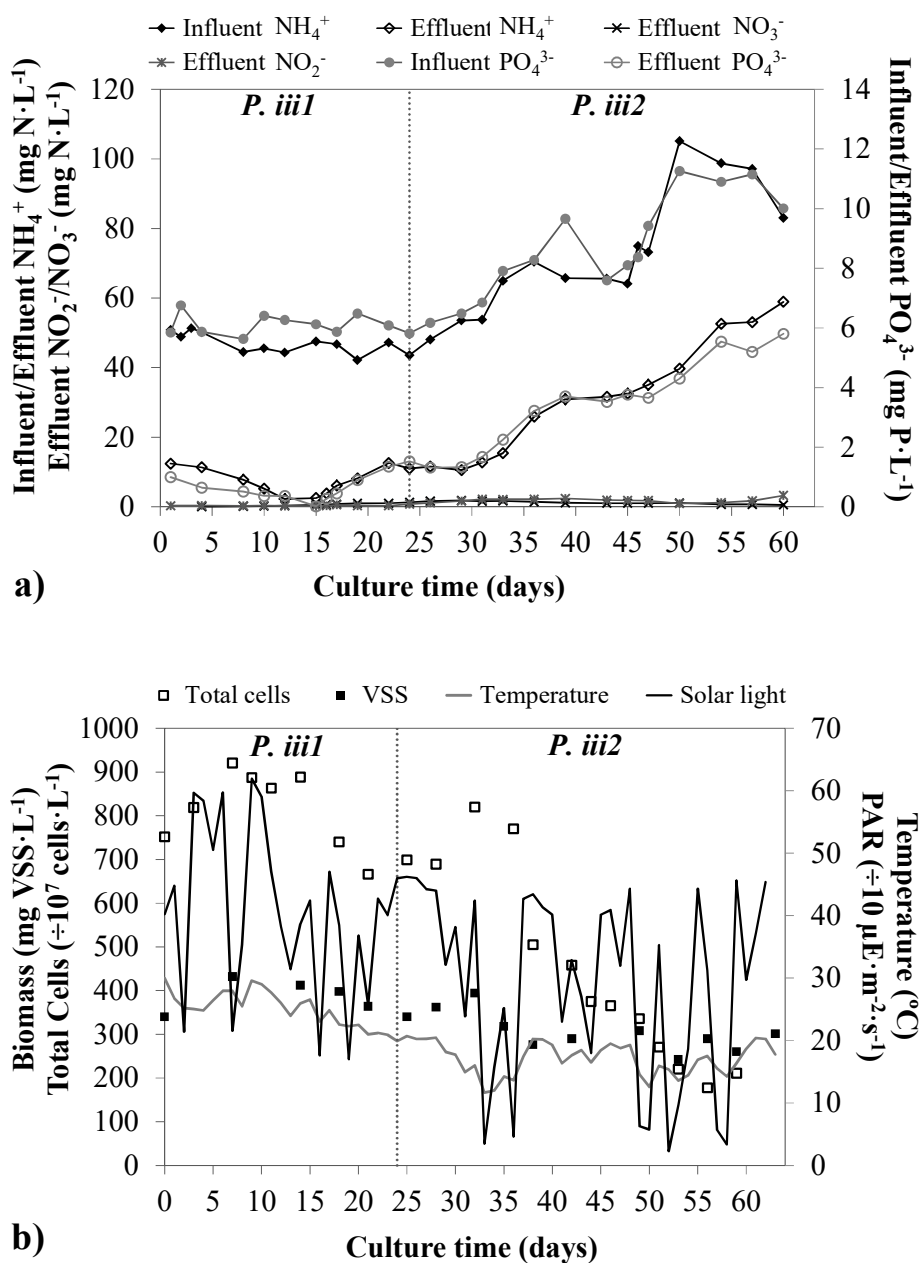


Figure 4.5. Operating period iii. Time evolution of: (a) influent and effluent nutrient concentration (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- and PO_4^{3-}); and (b) biomass concentration, total cells, solar irradiance (PAR) and temperature. The vertical line indicates the shift from sub-period iii1 to sub-period iii2.

Concerning the pseudo-steady state biomass productivity, maximum values of around $41.0 \pm 2.0 \text{ mg VSS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ were achieved during sub-period iii1. However, these values decreased as the temperature and solar irradiance declined throughout operating period iii (see Figure 4.5b). Indeed, the pseudo-steady state biomass productivity decreased until $33.9 \pm 3.1 \text{ mg VSS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in sub-period iii2. The pseudo-steady state VSS and cellular density values decreased from 432 to 242 $\text{mg VSS} \cdot \text{L}^{-1}$ and from $9.2 \cdot 10^9$ to $1.78 \cdot 10^9 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$. The significant decrease observed in total cells compared to VSS concentration was attributed to an increase in the ratio of dead organic matter to microalgae, which was promoted by reduced daily average temperature and solar irradiance.

3.4. Microalgae productivity and NRR in outdoor PBRs

Table 4.2 summarises the average values of the main process performance indicators related to nutrient uptake and microalgae growth calculated within the pseudo-steady state of each operating (sub-)period. As previously commented, these pseudo-steady results were obtained when nearby stable VSS were achieved after having operated for a minimum time period of three cycles of HRT.

Table 4.2. NRR, nutrient removal efficiency and biomass productivity within the pseudo-steady state of each operating (sub-)period.

Period	Ammonium removal rate ($\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	Ammonium removal efficiency (%)	Phosphate removal rate ($\text{mg P} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	Phosphate removal efficiency (%)	Biomass productivity ($\text{mg VSS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
P. i1	2.08 ± 1.17	41.6 ± 4.0	0.17 ± 0.17	36.1 ± 5.9	23.4 ± 0.6
P. i2	0.81 ± 0.52	50.9 ± 12.8	0.2 ± 0.01	50.9 ± 7.8	13.8 ± 1.1
P. ii	3.94 ± 0.35	54.4 ± 4.0	0.41 ± 0.07	55.9 ± 0.9	30.5 ± 1.8
P. iii1	4.75 ± 0.03	75.2 ± 2.2	0.51 ± 0.08	77.9 ± 1.4	41.0 ± 2.0
P. iii2	3.35 ± 0.57	36.3 ± 6.5	0.61 ± 0.13	45.5 ± 5.3	33.9 ± 3.1

As commented before, sub-period iii1 resulted in the maximum NRR and biomass productivity revealed in this study ($52.3 \text{ mg VSS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and $5.84 \text{ mg NH}_4\text{-N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $0.85 \text{ mg PO}_4\text{-P} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively). This sub-period was operated at 8 days of HRT and favourable environmental conditions: influent nutrient content was around 40-50

mg N·L⁻¹ and 6-7 mg P·L⁻¹, solar irradiance of around 402 μE·m⁻²·s⁻¹, and temperature of about 21°C. Moreover, the environmental and operating conditions within sub-period iii1 allowed to meet effluent nutrient standards (7.2 ± 3.9 mg NH₄-N·L⁻¹ and 0.6 ± 0.4 mg PO₄-P·L⁻¹) legislated by the European Directive 91/271/CEE.

It is worth noting the direct effect that temperature and light intensity has on microalgae cultivation. Indeed, steady state conditions are rarely achieved due to the significant dynamics on ambient light intensity and temperature when operating outdoor. By way of example, Figure 4.6 illustrates the evolution during operating period iii of: (a) NRR and solar irradiance and temperature, and (b) biomass productivity and solar irradiance and temperature. This figure shows how NRR and biomass productivity followed a similar pattern to both solar irradiance and temperature. Solar irradiance was identified as a key factor affecting NRR in the short-term, whilst temperature was found to have a direct impact on biomass productivity. These observations were corroborated by means of PLSR algorithm (see Figure 4.A.2 in Appendix A). Biomass productivity was directly affected by temperature, while N-NRR was directly correlated with light intensity. On the other hand, N-NRR was inversely correlated with N-NLR. Nevertheless, in this case, N-NLR increased within sub-period iii2 whilst light intensity and temperature decreased, overlapping therefore the individual effect of both NLR and environmental conditions on NRR. As regards P-NRR, it was observed that one key factor affecting P-NRR was the nitrogen to phosphorus ratio in the influent. Specifically, P-NRR was inversely affected by this ratio, indicating that the higher the phosphorus content in the influent is, the higher the P-NRR achieved (within the operating conditions evaluated in this study). Nonetheless, further data from long-term operation should be necessary to obtain more accurate statistical correlations.

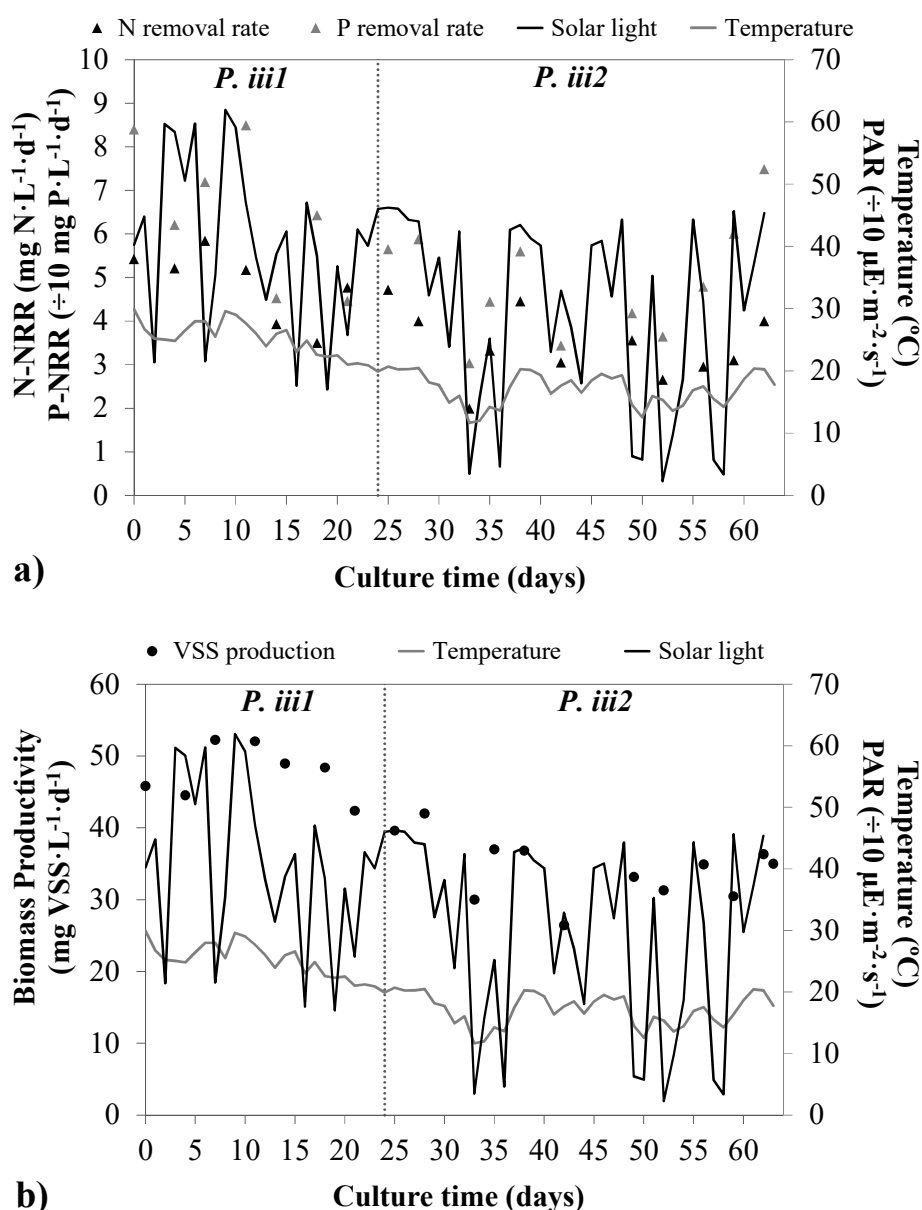


Figure 4.6. Operating period iii. Time evolution of: (a) nitrogen- and phosphorus-NRR (N-NRR and P-NRR, respectively), solar irradiance (PAR) and temperature; and (b) biomass concentration, solar irradiance (PAR) and temperature. The vertical line indicates the shift from sub-period iii1 to sub-period iii2.

Further research is needed in order to accurately determine the optimum combination of environmental and operating conditions resulting in enhanced NRR and biomass productivity. In this study, biomass productivity was around the lower bound for *Scenedesmus* sp. ($30\text{-}260 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) (Mata et al., 2010). Thus, the results obtained in this

study are lower than the ones obtained, for instance, at bench-scale. Nevertheless, it is important to note that other authors (e.g. Van Den Hende et al., 2014) also reported an important decrease in NRR when scaling-up microalgae cultivation processes from lab-to pilot-scale. This decreased process yield could be related to one of the most detrimental limitations of continuously-operated PBRs, which is the biomass washout problem (Bilad et al., 2014). Biomass productivity could be improved decoupling biomass retention time (BRT) and HRT in a membrane photobioreactor (MPBR). Membrane filtration would provide complete retention of biomass, preventing biomass washout thus allowing to increase both biomass concentration and productivity (Marbelia et al., 2014).

4. CONCLUSIONS

Outdoor experiments in pilot-scale, closed-air PBRs reflected the significant impact of environmental conditions (i.e. temperature and solar irradiance) on microalgae cultivation for WRR. Temperatures below 20°C significantly affected biomass productivity. Solar irradiance was a key factor affecting NRR in the short-term. Nutrient concentration met effluent standards (European Directive 91/271/CEE) when operating at favourable environmental conditions. Overall, NRR and biomass productivity should be further improved. Optimum combinations of operating and environmental conditions need to be obtained. Since the washout of biomass is a key limiting factor, the combination of microalgae cultivation and membrane filtration would enhance the process performance.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research work was possible thanks to project CTM2011-28595-C02-01/02 funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness jointly with the European Regional Development Fund and Generalitat Valenciana (GVA-ACOMP2013/203). This research was also supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation via a pre-doctoral FPU fellowship to the second author (AP2010-3708).

REFERENCES

- Alcántara, C., Domínguez, J.M., García, D., Blanco, S., Pérez, R., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2015. Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic–aerobic algal–bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass balances. *Bioresour. Technol.* 191, 173-186. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.125>
- APHA, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., American Public Health Association, Washington, DC.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., Perales, J.A., 2013a. Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. *Ecol. Eng.* 52, 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.089>
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., Perales, J.A., 2013b. Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photo-bioreactors treating urban wastewater in long-term operation. *Ecol. Eng.* 57, 226-235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.040>
- Beuckels, A., Smolders, E., Muylaert, K., 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bilad, M.R., Discart, V., Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., Vankelecom, F.J., 2014. Coupled cultivation and pre-harvesting of microalgae in a membrane photobioreactor (MPBR). *Bioresour. Technol.* 155, 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.026>
- Brenan, M., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Giménez, J.B., Robles, A., Carretero, L., Duran, F., Ruano, M.V., Gatti, M.N., Ribes, J., Ferrer, J., Seco, A., 2011. Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fiber membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresour. Technol.* 102, 8799-8806. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.014>
- Gouveia, L., Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Ribeiro, B., Botrel, E.P., Castro Neto, P., Ferreira, A.F., Silva, C.M., 2016. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs Scale-up considerations. *Algal Res.* 16, 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.010>
- Judd, S., van den Broecke, L.J.P., Shurair, M., Kuti, Y., Znad, H., 2015. Algal remediation of CO₂ and nutrient discharges: A review. *Water Res.* 87, 356-366. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.021>

- Kim, B-H, Kang, Z., Ramanan, R., Choi, J-E., Cho, D-H., Oh, H-M., Kim, H-S., 2014. Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater. *J. Microbiol. Biotechn.* 24, 1123-1132. <https://doi.org/10.4014/jmb.1312.12057>
- Krustok, I., Odlare, M., Truu, J., Nehrenheim, E., 2016. Inhibition of nitrification in municipal wastewater-treating photobioreactors: Effect on algal growth and nutrient uptake. *Bioresour. Technol.* 202, 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.020>
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten* 62, 31-38.
- Lund, J.W.G., Kipling, C., Le Cren, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting, *Hydrobiologia* 11, 143-170. <https://doi.org/10.1007/BF00007865>
- Marbelia, L., Bilad, M.R., Passaris, I., Discart, V., Vandamme, D., Beuckels, A., Muylaert, K., Vankelecom, Ivo F.J., 2014. Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresour. Technol.* 163, 228-235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.012>
- Mata, T., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Maity J.P., Bundschuh J., Chen C-Y., Bhattacharya, P., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. *Energy* 78, 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.003>
- Medina, M., Neis, U., 2007. Symbiotic algal bacterial wastewater treatment: Effect of food to microorganism ratio and hydraulic retention time on the process performance. *Water Sci. Technol.* 55,165-171. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.351>
- Morales-Amaral, M.M., Gómez, C., Ación-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2015. Production of microalgae using centrate from anaerobic digestion as the nutrient source. *Algal Res.* 9, 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.018>
- Pachés, M., Romero, I., Hermosilla, Z., Martinez-Guijarro, R., 2012. PHYMED: An ecological classification system for the Water Framework Directive based on phytoplankton community composition. *Ecol. Indic.* 19, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.07.003>
- Park, J., Jin, H., Lim, B.-R., Park, K.-Y., Lee, K., 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 8649-8657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>

- 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. *J. Environ. Manage.* 166, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.004>
- Rhee, G.Y., 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.* 23, 10-25. <https://doi.org/10.4319/LO.1978.23.1.0010>
- Ruiz-Martínez, A., Martín García, N., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2012. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour. Technol.* 126, 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>
- Schoepp, N.G., Stewart, R.L., Sun, V., Quigley, A.J., Mendola, D., Mayfield, S.P., Burkart, M.D., 2014. System and method for research-scale outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 166, 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.046>
- Silva, N.F.P., Gonçalves, A.L., Moreira, F.C., Silva, T.F.C.V., Martins, F.G., Alvim-Ferraz, M.C.M., Boaventura, R.A.R., Vilar, V.J.P., Pires, J.C.M., 2015. Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. *Algal Res.* 11, 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.014>
- Smith, A.L., Stadler, L.B., Cao, L., Love, N.G., Raskin, L., Skerlos, S.J., 2014. Navigating wastewater energy recovery strategies: A life cycle comparison of anaerobic membrane bioreactor and conventional treatment systems with anaerobic digestion. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5972-5981. <https://doi.org/10.1021/es5006169>
- Valverde-Pérez, B., Ramin, E., Smets, B.F., Plósz, B.G., 2015. EBP2R – An innovative enhanced biological nutrient recovery activated sludge system to produce growth medium for green microalgae cultivation. *Water Res.* 68, 821-830. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.027>
- Van Den Hende, S., Beelen, V., Bore, G., Boon, N., Vervaeren, H., 2014. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresour. Technol.* 159, 342-354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.113>
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58, 109-130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- Xin, L., Hong-Ying, H. Ke, G., Ying-xue, Z., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 5494-5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>

CAPÍTULO 4

Xin, L., Hong-Ying, H., Yu-ping, Z., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol.* 102, 3098-3102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>

Zhou, W., Chen, P., Min, M., Ma, X., Wang, J., Griffith, R., Hussain, F., Peng, P., Xie, Q., Li, Y., Shi, J., Meng, J., Ruan, R., 2014. Environment-enhancing algal biofuel production using wastewaters. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 36, 256-269. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.073>

APPENDIX A. Supplementary Material

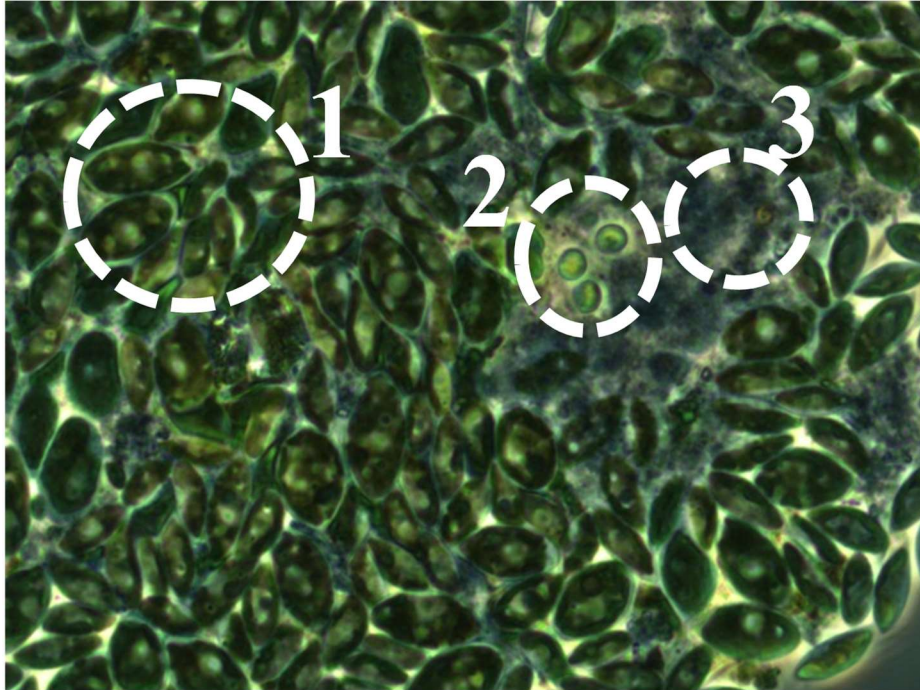


Figure 4.A.1. Example of microscopic image of the microalgae culture from PBR1. Circles illustrate the presence of: (1) *Scenedesmus* sp., (2) *Chlorella* sp., and (3) dead organic matter.

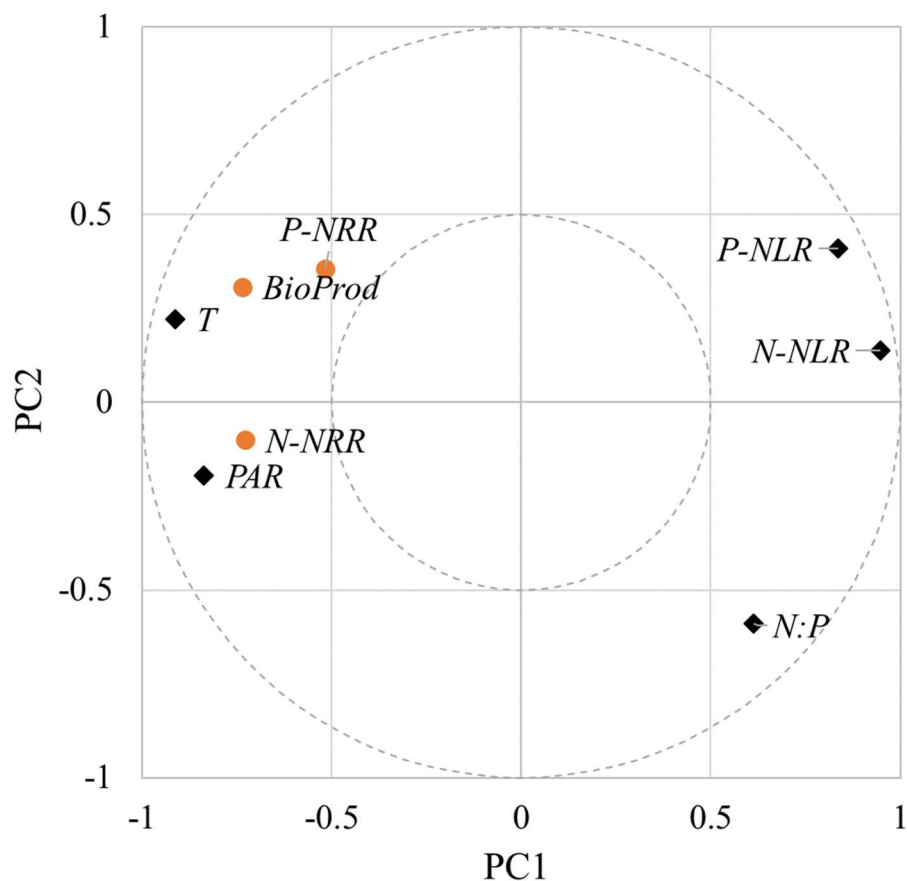


Figure 4.A.2. PLSR results. Correlation circles plot from the integration of the selected predictors (N:P, N-NLR, P-NLR, T and PAR) and responses (BioProd, N-NRR and P-NRR). Nomenclature: PC: Principal Component; N:P: nitrogen to phosphorus ratio in the influent; N-NLR: nutrient loading rate referred to nitrogen; P-NLR: nutrient loading rate referred to phosphorus; T: temperature; PAR: light intensity; BioProd: biomass productivity; N-NRR: nutrient removal rate referred to nitrogen; and P-NRR: nutrient removal rate referred to phosphorus.

CAPÍTULO 5

**PERFORMANCE OF AN OUTDOOR MEMBRANE
PHOTOBIOREACTOR FOR RESOURCE RECOVERY
FROM ANAEROBICALLY TREATED SEWAGE**

CAPÍTULO 5:

PERFORMANCE OF AN OUTDOOR MEMBRANE PHOTOBIOREACTOR FOR RESOURCE RECOVERY FROM ANAEROBICALLY TREATED SEWAGE

Viruela, A., Robles, A., Durán, F., Ruano, M.V., Barat, R., Ferrer, J., Seco, A., 2018. Performance of an outdoor membrane photobioreactor for resource recovery from anaerobically treated sewage. J. Clean. Prod. 178, 665-674. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.223>

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the performance of a pilot scale membrane photobioreactor (MPBR) for treating the effluent of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) system. In particular, new experimental data on microalgae productivity, nutrient recovery, CO₂ biofixation and energy recovery potential was obtained under different operating conditions, which would facilitate moving towards cost-effective microalgae cultivation on wastewater. To this aim, a 2.2-m³ MPBR equipped with two commercial-scale hollow-fibre ultrafiltration membrane modules was operated treating the nutrient-loaded effluent from an AnMBR for sewage treatment. The influence of several design, environmental and operating parameters on MPBR performance was studied. Among the conditions evaluated, variations in solar irradiance significantly affected the nutrient recovery rate (NRR). Operating at temperatures above 25°C and high biomass concentrations, which increased light shading effect, negatively affected biomass production and NRR. Maximum biomass productivity of 66 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹ (areal productivity of 15.78 g VSS·m⁻²·d⁻¹) and NRR of 7.68 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 1.17 mg P·L⁻¹·d⁻¹ were achieved when operating at 4.5 days of biomass retention time. These results would outcome maximum theoretical energy recoveries and CO₂ biofixations of about 0.43 kWh and 0.51 kg CO₂ per m³ of treated water, respectively. Moreover, the excellent quality permeate that was produced (i.e. negligible levels of pathogens and suspended solids) represents a reclaimed water source.

1. INTRODUCTION

The application of new technologies for resource recovery from wastewater is normally conditioned by the necessity of including the water sector in the new development model focused on Circular Economy (Ghisellini et al., 2016). Wastewater treatment is an energy-intensive activity and it is highlighted in the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) guidelines (IPCC, 2006). Numerous studies (see e.g. Flores-Alsina et al., 2011; Parravicini et al., 2016) can be found in the literature related to the estimation and minimisation of greenhouse gas (GHG) emissions in wastewater treatment plants (WWTPs), mainly focussed on the optimisation of plant design and/or operation (e.g. sludge retention time, dissolved oxygen level, or dosage of chemicals). Thus, the necessity of reducing the carbon footprint and other environmental impacts related to wastewater treatment is a key driving factor for shifting from the current WWTPs to water resource recovery facilities (WRRFs), which turns wastewater into a source of energy, nutrients and reclaimed water.

The recycle of the nutrients from wastewater to farmland, particularly phosphorus, is of great interest in Circular Economy since this component is an essential element irreplaceable in the production of crops and food (Ashley et al., 2011). In addition, nitrogen recovery from wastewater for agricultural purposes can help to reduce worldwide production costs due to the energy demand of fertiliser production (Do Nascimento et al., 2015).

Nutrient recovery from wastewater by means of microalgae-based processes is attracting interest from the scientific community (see e.g. Gao et al., 2015; Tsolcha et al., 2017). This interest is focused not only on moving towards WRRFs, but also on the possibility of offsetting the cost of fertilisers and the water needed to cultivate microalgae biomass. In addition, the carbon footprint is reduced by carbon dioxide biofixation (Mata et al., 2010), while harvesting solar energy in the form of algal biomass. This biomass is considered a high-value product since it can be converted, for instance, into fertilisers or into biogas through anaerobic digestion (see e.g. Jankowska et al., 2017).

However, one key technical limitation of microalgae cultivation during continuous operation is biomass washout. This washout can be easily overcome by the combination

of microalgae cultivation and membrane filtration technology in the so-called membrane photobioreactor (MPBR), which enables decoupling both biomass retention time (BRT) and hydraulic retention time (HRT). Membrane technology allows the production of reclaimed water (i.e. negligible levels of pathogens and suspended solids can be reached when using, for instance, ultrafiltration membranes) from wastewater, which can be used for different purposes (e.g. irrigation, aquifer recharge, urban uses or industrial uses). However, further research is required in this field to ensure the feasibility of this technology (Bilad et al., 2014; Gao et al., 2014). MPBRs have some key issues that must be overcome such as high investment and maintenance costs and membrane fouling, among others. Additionally, outdoor performance of microalgae cultivation is significantly sensitive to the environmental and operating conditions. The available literature on microalgae cultivation in outdoor pilot-scale systems is limited (neither PBR nor MPBR). Systems of this type are necessary to evaluate the biomass productivity and nutrient recovery capacity of microalgae, elucidating issues of operation and establishing baselines for future cultivation improvement.

Microalgae cultivation can grow on different wastewater-based mediums. For instance, Ruiz-Martínez et al. (2012) and Viruela et al. (2016) showed that the effluent from an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) fed with pre-treated sewage can be a suitable growth medium for microalgae cultivation in PBRs at lab scale and pilot scale, respectively. The combination of AnMBR and MPBR for sewage treatment results in a potentially sustainable treatment strategy. Microalgae cultivation allows nutrient uptake from wastewater while solar energy is harvested in the form of algal biomass, reducing the carbon footprint of wastewater treatment due to carbon dioxide biofixation. The generated algal biomass is a resource for fertiliser or biogas production, while the use of ultrafiltration membranes generates reclaimed water.

The objective of this work was to evaluate the performance of an outdoor pilot-scale MPBR for treating the effluent of an AnMBR system. In particular, new experimental data on microalgae productivity, nutrient recovery, CO₂ biofixation and energy recovery potential was obtained under different operating conditions, which would facilitate moving towards cost-effective microalgae cultivation on wastewater. The pilot plant used in this study consists of an outdoor pilot-scale MPBR (working volume of 2.2 m³) equipped with industrial-scale membrane modules, which was fed with the effluent from

an AnMBR plant (Giménez et al., 2011). The AnMBR system was fed with the effluent from the pre-treatment of the Carraixet WWTP (Valencia, Spain). In this work, MPBR performance was evaluated by studying the effects of different factors related to environmental and operating conditions (temperature, solar irradiance, BRT, nutrient loading rate and algal culture recirculation mode) and layout configuration (i.e. non-photoc volume fraction, ratio of membrane tank to PBR volume, taking into account that the membrane tank corresponds to non-photoactivated volume and the PBR corresponds to photoactivated volume).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1.MPBR description

The MPBR pilot plant used in this study (Figure 5.1a) consists of two treatment lines (A and B) which can be operated independently or as a single treatment unit. Each line has two 0.62 m³ (1.25-m x 2-m x 0.25-m) flat-plate PBRs made of transparent methacrylate (0.55 m³ working volume). All four PBRs are south-facing to take full advantage of solar irradiance. Each line is connected to one polypropylene membrane tank (MT) with a total volume of 0.5 m³ (0.3 m³ working volume). Each MT includes one PUR-PSH31 industrial hollow-fibre ultrafiltration membrane unit (PURON[®] Koch Membrane Systems, 0.03 µm pore size, 31 m² total filtering area). Two 0.1 m³ distribution chambers (DC), two 0.25 m³ clean-in-place (CIP) tanks (one for each line) and one 0.05 m³ waste tank (WT) are also included as main elements of the plant. As Figure 5.1a shows, the MPBR plant is provided with a roof made of transparent methacrylate. The aim of this roof was to protect the equipment from raining events. The light irradiance attenuation factor caused by the roof was low since the photobioreactors were located under the roof limits (see Figure 5.1a).

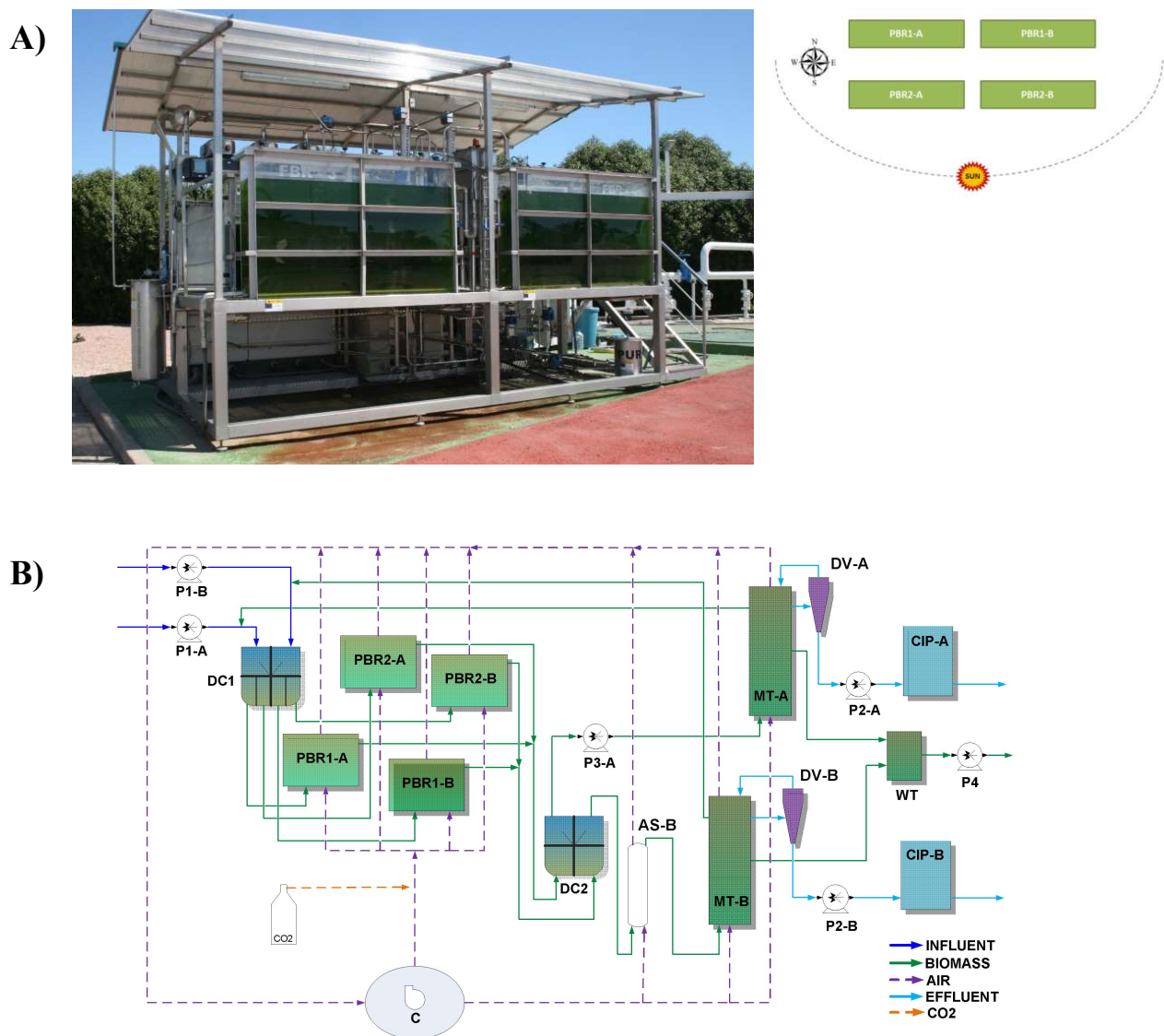


Figure 5.1. (a) General view of the MPBR and relative positions of the PBRs. (b) Flow diagram of the MPBR. Nomenclature: DC: distribution chamber; PBR: photobioreactor; MT: membrane tank; DV: degasification vessel; CIP: clean-in-place; WT: waste tank; P: pump; C: compressor; AS: airlift system.

The MPBR plant was fed with the nutrient-rich effluent from an AnMBR plant that treats sewage. The main characteristics of the influent sewage to the AnMBR plant are chemical oxygen demand (COD) of $445 \text{ mg COD}\cdot\text{L}^{-1}$, total suspended solids (TSS) of $186 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ammonium (NH_4^+) of $27 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$, phosphate (PO_4^{3-}) of $2.7 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$, sulphate of $99 \text{ mg S}\cdot\text{L}^{-1}$, alkalinity of $293 \text{ mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ and volatile fatty acids (VFA)

of 11 mg COD·L⁻¹. Further details related to the characteristics and operation of the AnMBR can be found elsewhere (Giménez et al., 2011; Robles et al., 2015).

The influent is fed into the MPBR by centrifugal pumps (P1-A and P1-B) and it is first mixed with the microalgal culture in a distribution chamber (DC1) from which it is fed equally by gravity into four photobioreactors (PBR1-A and PBR2-A in Line A; PBR1-B and PBR2-B in Line B). The microalgal culture then falls into a second distribution chamber (DC2), from where it is pumped into two membrane tanks (MT-A and MT-B). Recirculation of the microalgae is carried out by a progressing cavity pump in Line A (P3-A) and an airlift system in Line B (AS-B). The airlift system consists of two vertical transparent PVC pipes (DN 75 mm) and was designed for an airflow of 0.7 m³·h⁻¹, providing a culture flow of 3.4·10⁻² m·s⁻¹ (250 L·h⁻¹). Permeate is obtained from the membrane tanks by two rotary lobe vacuum pumps (P2-A, P2-B). A degasification vessel (DV-A and DV-B) is installed between the membrane tanks and the vacuum pump to recover the air bubbles in the effluent. The degasification vessel consists of a widened conical pipe-section that allows air accumulating at the top of this element. The obtained permeate is stored in the clean-in-place tank (CIP-A and CIP-B in Line A and Line B, respectively). The BRT is controlled by extracting a fraction of the microalgal culture from the membrane tank into a waste tank (WT) with a centrifugal pump (P4).

The photobioreactors and the membrane tanks are continuously stirred by air sparging, which provides a homogenised microalgal culture and prevents wall fouling. pH is kept at 7.5 by introducing CO₂ (99.9%) into the system through the air recycling pipe in order to maintain a suitable environment for microalgae growth and avoid undesirable phenomena such as free ammonia stripping and phosphate precipitation. This is carried out by means of an on/off control valve that opens during 5 seconds when pH exceeds the established set-point. Although pure CO₂ was used in this research study, CO₂ would be added to the system from other sources when operating at full-scale, such as using the flue gases from other processes (e.g. biogas produced by the anaerobic digestion of organic carbon). Hence, the CO₂ feed to the system for pH control has to be considered as an input for carbon dioxide footprint calculations. One compressor (C) recycles air continuously from the headspace of the photobioreactors and membrane tanks to optimise CO₂ consumption.

In this work, membrane filtration permitted decoupling BRT and HRT. Nonetheless, very low net transmembrane fluxes were applied due to the high membrane filtration area compared to the applied treatment flow rate. Therefore, the obtained results from the performance of the membrane unit were not conclusive in terms of membrane fouling.

The PBRs were continuously stirred by gas sparging, which promoted proper mixing conditions, avoided wall fouling and ensured adequate CO₂ transference within the broth column. To this aim, one compressor (C) recycled gas continuously from the headspace of the PBRs to the system, which allowed to reduce CO₂ losses as well. The flow-rate of gas entering each PBR was set to 0.061 vvm (2 m³·h⁻¹). To maintain suitable microalgal growth rates and avoid undesirable chemical processes (e.g. phosphate precipitation and free ammonia stripping), pH was controlled at 7.5 by introducing pure CO₂ (99.9%) from a pressurised bottle into the system through the gas recycling pipe. The amount of CO₂ fed to each PBR during the experimental period ranged from 2.45 to 5.73 mg CO₂·L⁻¹·d⁻¹.

Each PBR was equipped with a pH-temperature (pHD sc Hach) transmitter and a dissolved oxygen (DO) transmitter (LDO sc Hach). Moreover, an on-line irradiation sensor (Apogee Quantum) was installed on the surface of the PBRs for measuring the photosynthetically active radiation (PAR).

2.2.MPBR instrumentation, automation, and control

Several on-line sensors and automatic equipment were installed to automate and control pilot plant operations and to obtain on-line information on the state of the process.

The on-line sensors included in the MPBR plant are the following: four pH-temperature transmitters (one in each photobioreactor); two irradiation sensors (on the surface of the flat-panels) for measuring photosynthetically active radiation (PAR); four dissolved oxygen sensors (one in each photobioreactor) to monitor photosynthetic activity during daylight hours; five liquid flow-rate transmitters (for pumps P1-A, P1-B, P2-A, P2-B and P3-A); seven level transmitters (one for MT-A, MT-B, CIP-A, CIP-B and WT and two in DC2); two liquid pressure transmitters for monitoring the transmembrane pressure (one

in each membrane tank); one gas pressure transmitter in the compressor outlet; and five gas flow-rate transmitters (one in the air inlet of each membrane tank, one in the air inlet of each photobioreactor, one in the airlift system and one in the CO₂ inlet). All temperature measurements through the manuscript refer to liquid medium temperature. On the other hand, all PAR measurements refer to daily average PAR (not instantaneous PAR), thus taking into account both daylight and night-time hours. Moreover, the irradiation sensors were vertically-oriented on the surface of the flat-panels thus recording lower irradiation intensities than when oriented horizontally.

The MPBR pilot plant includes the following actuators: six frequency converters to control the rotational speed of the compressor (C) and pumps (P1-A, P1-B, P2-A, P2-B and P3-A); four regulating valves to control the air-flow inlet through the photobioreactors, air-lift system, and membrane tanks; and nine on-off valves to control biomass wastage, CO₂ dosage and the membrane operation stage (filtration, back-flush, ventilation, standby, relaxation and degasification).

The plant also includes hierarchically organised control loops in the lower layer. The lower layer controllers are classical PID and on-off controllers designed to control the key operating variables: flow-rates (influent, microalgae recirculation, wastage, permeate, and gas), transmembrane pressure in both membrane tanks and level of microalgal culture in DC2, MT-A and MT-B.

2.3. Microalgae inoculation

Microalgae inoculation in the MPBR was carried out as described in Viruela et al. (2016). This process consisted in a pre-cultivation phase under lab conditions (constant light and temperature of 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and 22°C, respectively) of microalgae isolated from the secondary settler of the full-scale Carraixet WWTP (i.e. the microorganisms were already adapted to sewage). The effluent from the above-mentioned AnMBR was used as growth medium. Under these conditions, the biomass formed a stable mixed culture of microalgae mainly composed of *Scenedesmus* sp. (>99%). All the PBRs of the MPBR were then started up using the laboratory-growth microalgal culture (10% of the total working volume) and the AnMBR effluent (90% of the total working volume). Once the

conditioning stage was achieved (i.e. stable total suspended solids) in batch mode, the PBRs were operated under automatic semi-continuous feeding mode.

2.4.MPBR operation

The MPBR pilot plant was operated outdoors (i.e. under variable solar irradiance and temperature) using the nutrient-loaded effluent from the AnMBR system. Table 5.1 shows the main characteristics of the influent entering the MPBR. The average influent nutrient concentrations to the MPBR during the experimental period were 51.3 ± 9.7 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ and 6.8 ± 1.6 mg $\text{PO}_4\text{-P}\cdot\text{L}^{-1}$. Nitrite and nitrate concentrations were negligible (~ 0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$). The nutrient load entering the MPBR was variable due to both the Carraixet WWTP intake dynamics and the performance of the AnMBR.

Table 5.1. Average operating and environmental conditions during the experimental period.

Parameter	Mean \pm SD
Ammonium (mg $\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$)	51.3 ± 9.7
Orthophosphates (mg $\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$)	6.8 ± 1.6
Nitrites (mg $\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$)	≈ 0
Nitrates (mg $\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$)	≈ 0
Total COD (mg $\text{COD}\cdot\text{L}^{-1}$)	31 ± 5
Alkalinity (mg $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	763 ± 87
VFA (mg $\text{HAc}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.5 ± 0.6

Allylthiourea (concentration in the photobioreactors of 10 mg $\cdot\text{L}^{-1}$) was used in this study to inhibit nitrification (Krustok et al., 2016; Viruela et al., 2016). Thus, the main process responsible of nitrogen depletion was nitrogen uptake by microalgae. Indeed, neither nitrate nor nitrite were detected in the system during the experimental period (data not shown). Allylthiourea was added to isolate processes thus assessing the potential of microalgae cultivation to enhance sustainability within the wastewater treatment field. Subsequent studies showed that nitrification can be avoided (without adding

allylthiourea) by adjusting the BRT for a given environmental conditions (i.e. light intensity and temperature).

The air flow-rate into each photobioreactor was set to $2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. This value was chosen to promote proper mixing conditions, avoid wall fouling and ensure adequate CO_2 transference within the broth column, but also contribute to reduce the light limitation effect. The air sparging intensity in each membrane tank was set to $5 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ to provide suitable shear conditions over the membrane surface.

The experimental set-up consisted of different periods within which the MPBR was operated under different conditions as regards: BRT; nutrient loading rate (NLR); temperature; solar irradiance; algae culture recycling mode through the membrane tank; and relation between membrane tank volume (dark volume) and PBRs volume, i.e. non-phototic volume fraction (Molina et al., 2001), calculated as the ratio between the membrane tank volume (fractional culture volume that does not receive light, non-phototic volume) and the PBR volume (fractional culture volume that receives light, i.e. phototic volume fraction).

Table 5.2 summarises the operating conditions (duration of the experiment, BRT and PBRs volume) and the daily average outdoor environmental conditions (temperature and solar irradiance) along the experiments. As commented before, daily average solar irradiance was also calculated for 24-h.

2.4.1. Influence of algae culture recirculation mode, temperature and NLR

Table 5.2 gives the operating and environmental conditions of the first operating period (78 days), which was divided into two sub-periods (i1 and i2) according to variations in NLR, solar irradiance, and temperature. During this period, the two lines of the MPBR were operated under similar environmental conditions and the only significant difference was the pumping system used for recycling the algae culture through the membrane tanks (progressing cavity pump in Line A and airlift system in Line B). The algal culture recycling velocity was set to $4.8 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ($350 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$) and $3.4 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ($250 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$) in

Line A and B, respectively. Both lines worked with an algae culture working volume of 1.1 m^3 and 8 days of BRT.

2.4.2. Influence of BRT

Table 5.2 shows the main operating and environmental conditions of the second operating period (41 days), which was divided into two sub-periods (ii1 and ii2), mainly according to the modifications in the BRT. During this period, the two treatment lines were operated as a single treatment unit, i.e. the four photobioreactors were connected to one membrane tank (algae culture working volume of 2.2 m^3 in the photobioreactors and 0.3 m^3 in the membrane tank). The pumping system used for recycling the algae culture through the membrane tank was the progressing cavity pump ($4.8 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$).

2.4.3. Influence of non-phototic volume fraction and feed-waste strategy

A third experiment was carried out divided into two sub-periods (iii1 and iii2) to study the influence of the non-phototic volume fraction on biomass productivity and NRR. Specifically, the non-phototic volume percentage was reduced from sub-period iii1 to iii2 by doubling the photobioreactor working volume (from 1.1 to 2.2 m^3 , respectively). Hence, the non-phototic volume fraction was reduced from 27.2% in sub-period iii1 to 13.6% in sub-period iii2. In both sub-periods, BRT was set to 9 days, NLR remained nearly stable and the recirculation of algae culture was carried out by mechanical pumping ($4.80 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$). Table 5.2 gives the main operating and environmental conditions of the third operating period.

Table 5.2. NRR, nutrient removal efficiency and biomass productivity within the pseudo-steady state of each operating (sub-)period.

Period	Duration (d)	BRT / PBRs Volume (d / L)	N loading rate (g N·d ⁻¹)	P loading rate (g P·d ⁻¹)	Solar irradiance (μE·m ⁻² ·s ⁻¹)	Temperature (°C)
P. i1	15	8 / 1100	13.9 ± 3.0	1.9 ± 0.4	169 ± 33	25.8 ± 1.4
P. i2	63	8 / 1100	17.9 ± 3.2	2.4 ± 0.4	263 ± 33	28.7 ± 1.5
P. ii	16	4.5 / 2200	31.5 ± 2.7	4.1 ± 0.5	378 ± 78	28.7 ± 2.1
P. ii	25	9 / 2200	25.9 ± 3.0	3.2 ± 0.3	343 ± 113	23.9 ± 3.8
P. iii1	16	9 / 1100	13.7 ± 2.5	1.9 ± 0.3	201 ± 12	25.6 ± 1.7
P. iii2	10	9 / 2200	13.1 ± 3.1	1.5 ± 0.5	362 ± 78	27.5 ± 1.5

2.5.MPBR performance monitoring

Nitrogen-NRR (mg N·L⁻¹·d⁻¹), phosphorus-NRR (mg P·L⁻¹·d⁻¹) and biomass productivity (mg VSS·L⁻¹·d⁻¹ and g VSS·m⁻²·d⁻¹) were calculated as follows:

$$\text{Nitrogen - NRR} = \frac{Q \cdot (N_i - N_e)}{V_{\text{PBR}}} \quad (\text{Eq. 5.1})$$

$$\text{Phosphorus - NRR} = \frac{Q \cdot (P_i - P_e)}{V_{\text{PBR}}} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

$$\text{Biomass productivity (per volume of PBR)} = \frac{Q_w \cdot X_{\text{VSS}}}{V_{\text{PBR}}} \quad (\text{Eq. 5.3})$$

$$\text{Biomass productivity (per surface of PBR)} = \frac{Q_w \cdot X_{\text{VSS}}}{S_{\text{PBR}}} \quad (\text{Eq. 5.4})$$

where Q is the treatment flow rate (m³·d⁻¹), N_i is the concentration of nitrogen in the influent (g N·m⁻³), N_e is the concentration of nitrogen in the effluent (g N·m⁻³), V_{PBR} (m³) is the total volume of the PBRs, P_i is the concentration of phosphorus in the influent (g P·m⁻³), P_e is the concentration of phosphorus in the effluent (g P·m⁻³), Q_w (m³·d⁻¹) is the flow rate of wasted biomass, S_{PBR} (m²) is the total surface of PBRs exposed to solar irradiance, and X_{VSS} (g VSS·m⁻³) is the volatile suspended solids concentration in the PBRs.

The theoretical maximum energy recovery from the valorisation through anaerobic digestion of the generated algal biomass ($\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$) and the theoretical CO_2 biofixation ($\text{kg CO}_2\cdot\text{m}^{-3}$) resulting from the growth of the algal biomass were calculated using Eq. 5.5 and Eq. 5.6, respectively. The chemical formula reported by Green et al. (1996) for stoichiometric calculations of algal biomass was used in this study ($\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$).

$$\text{Energy recovery} = \frac{\text{BM}_1 \cdot Y_{\text{CH}_4} \cdot \text{LHV} \cdot \eta}{Q} \quad (\text{Eq. 5.5})$$

$$\text{CO}_2 \text{ biofixation} = \frac{\text{BM}_2}{Y_{\text{CO}_2} \cdot Q} \quad (\text{Eq. 5.6})$$

where BM_1 is the algal biomass production rate in terms of $\text{kg COD}\cdot\text{d}^{-1}$, Y_{CH_4} is the theoretical methane yield ($0.35 \frac{\text{m}^3 \text{CH}_4}{\text{kg COD}}$), LHV is the lower heating value for methane ($\text{kWh}\cdot\text{m}^{-3}$), η is the power generation efficiency of a microturbine for electrical production from methane (set to 30% in this study), BM_2 is the algal biomass production rate in terms of $\text{kg VSS}\cdot\text{d}^{-1}$, and Y_{CO_2} is the stoichiometric CO_2 capture for microalgae growth ($0.52 \frac{\text{kg VSS}}{\text{kg CO}_2}$).

The photosynthetic efficiency (PE) was calculated using Eq. 5.7 (Soletto et al., 2018):

$$\text{PE}(\%) = \frac{r_G \cdot H_G}{\text{IPAR}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 5.7})$$

where r_G is the daily biomass growth $\text{g VSS}\cdot\text{d}^{-1}$, H_G is the enthalpy of dry biomass ($22.9 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1} \text{ VSS}$), and IPAR was calculated by multiplying PAR by the illuminated surface area (m^2) and a conversion factor $18.78 \text{ kJ}\cdot\text{s}\cdot\text{d}^{-1}$.

2.6. Sample and analytical methods

Grab samples were collected from influent, algae culture and effluent three times per week in order to evaluate the MPBR performance in terms of nutrient recovery and biomass productivity. Ammonium (NH_4^+), nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-) and phosphate (PO_4^{3-}) were determined according to Standard Methods (APHA, 2005) (4500-NH3-G, 4500-NO2-B, 4500-NO3-H, and 4500-P-F, respectively) in a Smartchem 200 automatic

analyser (Westco Scientific Instruments, Westco). Total suspended solids (TSS) and volatile suspended solids (VSS) were also measured for the algae culture (APHA, 2005) (method 2540 E). All the analytical measurements were performed in duplicate. Morphological identification and cell quantification of microalgae were performed by epifluorescence microscopic methods using a Leica DM2500 microscope.

2.7. Partial least squares regression (PLSR)

PLSR algorithm (Wold et al., 2001) was assessed in order to evaluate the effect of different environmental and operating factors (i.e. predictors, X) on process performance indicators (i.e. responses, Y). In this work, the set of predictors (X block) evaluated were the nitrogen to phosphorus ratio in the influent, the daily average temperature, the daily maximum temperature and the daily average solar irradiance. The responses (Y) evaluated consisted of the biomass productivity, the NRR referred to nitrogen (N-NRR), and the NRR referred to phosphorus (P-NRR). The PLSR analysis was conducted using the mixOmics library (<http://www.mixOmics.org>) through the software R version 3.2.3 (<http://www.R-project.org>).

3. RESULTS AND DISCUSSION

As commented before, the experimental set-up consisted of different periods within which the MPBR was operated under different conditions as regards: BRT; NLR; temperature; solar irradiance; algae culture recycling mode through the membrane tank; and relation between membrane tank volume (dark volume) and PBRs volume, i.e. non-photoc volume fraction.

3.1. Influence of algae culture recirculation mode, temperature and NLR

Figure 5.2 and Figure 5.3 show the resulting algal biomass productivity and NRR, the daily average and maximum temperature and the solar irradiance in both lines during

period i. As these figures show, biomass productivity (Figure 5.2) and NRR (Figure 5.3) were rather similar in both treatment lines. With regard to phytoplankton, *Scenedesmus* sp. remained as the predominant species (>99%) in both systems. These results suggest that the algae recirculation mode (pumping/airlift system) did not affect algae diversity and process performance within the evaluated range of operating and environmental conditions. The results obtained in this study are contrary to Scarsella et al. (2012), who reported that the effective growth rate of *Scenedesmus* sp. is significantly reduced when culture recirculation is accomplished by a mechanical pump (specifically a centrifugal pump) rather than an air-lift system. The results in Scarsella et al. (2012) were achieved when operating at flow-rates of $1300 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (velocity of $8.2\cdot 10^{-2} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). Thus, the discrepancy between the results of Scarsella et al. (2012) and this study could be explained not only by the type of mechanical pump used (progressing cavity pump vs. centrifugal pump), but also by possible shear-stress caused by the velocity imposed on the microalgal culture ($4.0\cdot 10^{-2} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ in this study vs. $8.2\cdot 10^{-2} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ in Scarsella et al., 2012). The results obtained in the present work revealed that the process can be adequately operated through different pumping methods, thus being possible to optimise the process in terms of energy demand and environmental impact (e.g. carbon footprint) by selecting adequate pumping systems, while keeping NRR and biomass productivity in adequate levels.

Differences in biomass productivity and NRR were observed between sub-periods i1 and i2 due to variations in NLR, temperature and solar irradiance. Important to highlight is the significant variability observed in NRR mainly due to the dynamics in solar irradiance, which strongly affected nutrient uptake by algal biomass.

As Figure 5.2 shows, biomass productivity remained fairly stable at the end of sub-period i1 (see days 8 to 16) and NRR yielded values of $5.86 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $0.56 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. However, during sub-period i2, a significant drop in algal biomass production was observed in both lines, resulting in an average value of $12.4 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (areal productivity of $2.97 \text{ g VSS}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$). With regard to nitrogen recovery rate, it also experienced a reduction in both lines, from 5.86 to $4.22 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ in average in sub-period i1 and i2, respectively. This could be associated with the temperature increase recorded in period i (see Figure 5.3), reaching average daily values of 30.7°C , thus affecting microalgae growth rate. Ras et al. (2013) highlighted the

importance of temperature in outdoor microalgae cultivation, since high temperatures (i.e. above that one for optimal growth) are more deleterious than low temperatures. Nevertheless, although the temperature remained above 25°C (temperature considered as optimal for *Scenedesmus* sp. growth by some authors such as, Xin et al., 2011), a significant increase in nitrogen recovery rate was observed around day 50. This behaviour was attributed to an increase in light-use efficiency, due to a reduction in both the light-shading effect (i.e. biomass concentration decreased) and higher average solar irradiance (values of daily average PAR over 280 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). The results obtained may indicate that high temperatures are less harmful in conditions of light saturation. Therefore, these results suggest that microalgae cultivation is a promising technology for resource recovery in locations with significant solar irradiances (e.g. vertical daily average PAR around 250-350 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). In addition, MPBR technology produces a source of water susceptible of reclamation, significantly valuable for those areas with high solar irradiances where water scarcity is a key issue. A solids-free and disinfected effluent was obtained thanks to the 0.03 μm -pore size membrane that was used in this study.

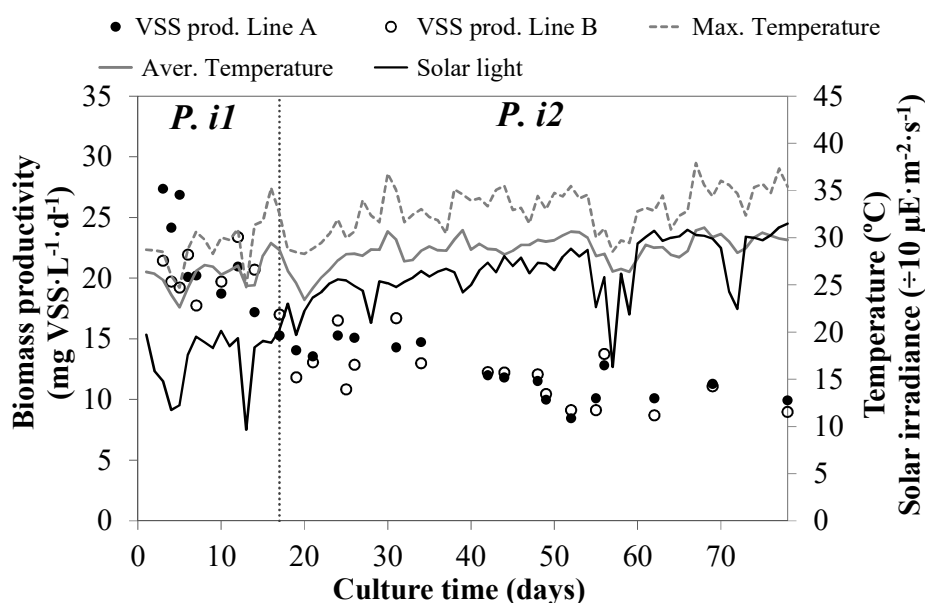


Figure 5.2. Time evolution of biomass productivity obtained during period i: daily average VSS productivity, temperature (average and maximum) and solar irradiance. The vertical line separates sub-period i1 and sub-period i2.

A considerable drop in NRR was observed at the end of sub-period i2 (see days 60-78 in Figure 5.3), which was associated with the continuous temperature increase recorded in period i (temperature reached maximum values of 38°C at noontime). At the end of sub-period i2, biomass production and NRR resulted in values of 10.8 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹ (areal productivity of 2.58 g VSS·m⁻²·d⁻¹), 4.39 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 0.40 mg P·L⁻¹·d⁻¹. Low values of biomass productivity are associated to thermal inhibition within the microalgal culture caused by high operating temperatures. This phenomenon was also reported by Tran et al. (2014), who observed a marked decrease in biomass productivity when operating at temperatures above 35°C in an outdoor open raceway for mass cultivation of *Scenedesmus* sp. Figure 5.4a shows the effect of temperature on algal biomass productivity. The results given in this figure suggest that operating at average temperatures above approx. 25°C negatively affects biomass productivity. These results are in accordance with other studies that found that high temperatures significantly reduced microalgae growth rate (Béchet et al., 2010; Tran et al., 2014; Viruela et al., 2016). In particular, despite different authors have reported a wide range of the optimal temperature for *Scenedesmus* sp. (30-35°C reported by Sanchez et al., 2008), Xin et al. (2011) reported that *Scenedesmus* sp. presents optimal growth rates at temperatures around 25°C, which supports the results obtained in this work. An economic and environmental assessment should be conducted in order to adequately determinate the feasibility of MPBR technology for resource recovery at different locations, accounting for given environmental conditions affecting biomass productivity and NRR.

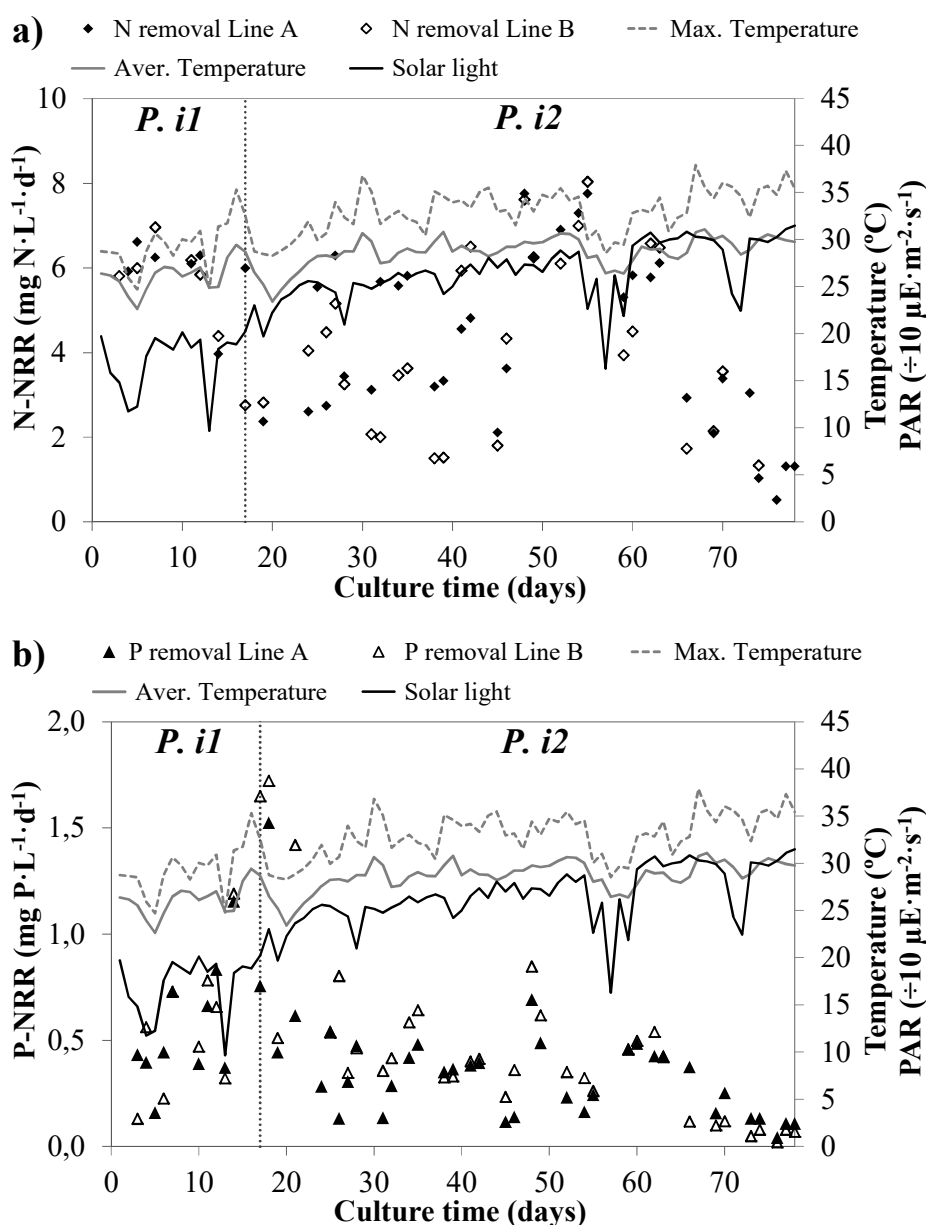


Figure 5.3. Time evolution of nutrient recovery obtained during period i: (a) NRR (nitrogen), temperature (average and maximum) and solar irradiance (PAR); and (b) NRR (phosphorus) temperature (average and maximum) and solar irradiance (PAR). The vertical line separates sub-period i1 and sub-period i2.

Figure 5.4b shows the PLSR analysis results obtained from the data from period i. Specifically, this figure shows the correlation circles plots obtained from the integration of the selected predictors (Influent N:P, T, Tmax and PAR) and responses (BioProd, N-NRR and P-NRR). The use of correlation circle plots through the PLSR analysis allows

visualising the relationship between the selected predictors and the responses (González et al., 2012).

In Figure 5.4b, the correlation between a predictor (Influent N:P, T, Tmax and PAR) and a response (BioProd, N-NRR and P-NRR) can be visualised through the angle formed by the projection of the variables on the axis defined by the component. The correlation is positive whether the formed angle is sharp, while the correlation is negative if the angle is obtuse. On the other hand, if the angle is right the correlation is null. As Figure 5.4b shows, the variables are projected inside a circle of radius 1 onto the space spanned by the two first principal components PC1 and PC2. The longer the distance from the origin, the stronger the relationship between the variables (González et al., 2012). Moreover, the higher the contribution of the principal components that defines the axis where the variables are projected, the stronger the relationship between the variables. In this case, the two first principal components PC1 and PC2 represent the 69.4% and 26.2% of the total variance, respectively. Figure 5.4b illustrates that biomass productivity was inversely correlated not only with temperature (as Figure 5.4a showed) but also with solar irradiance. These variables (T and PAR) were projected near the circle of radius 1, which indicates that these relationships can be directly interpreted (González et al., 2012). In this respect, the microalgal culture during period i should be affected by both the photoinhibition effect and the high deleterious temperature. Instantaneous PAR values reached maximum daily values around $1400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (see Figure 5.S1 in supplementary material of APPENDIX A).

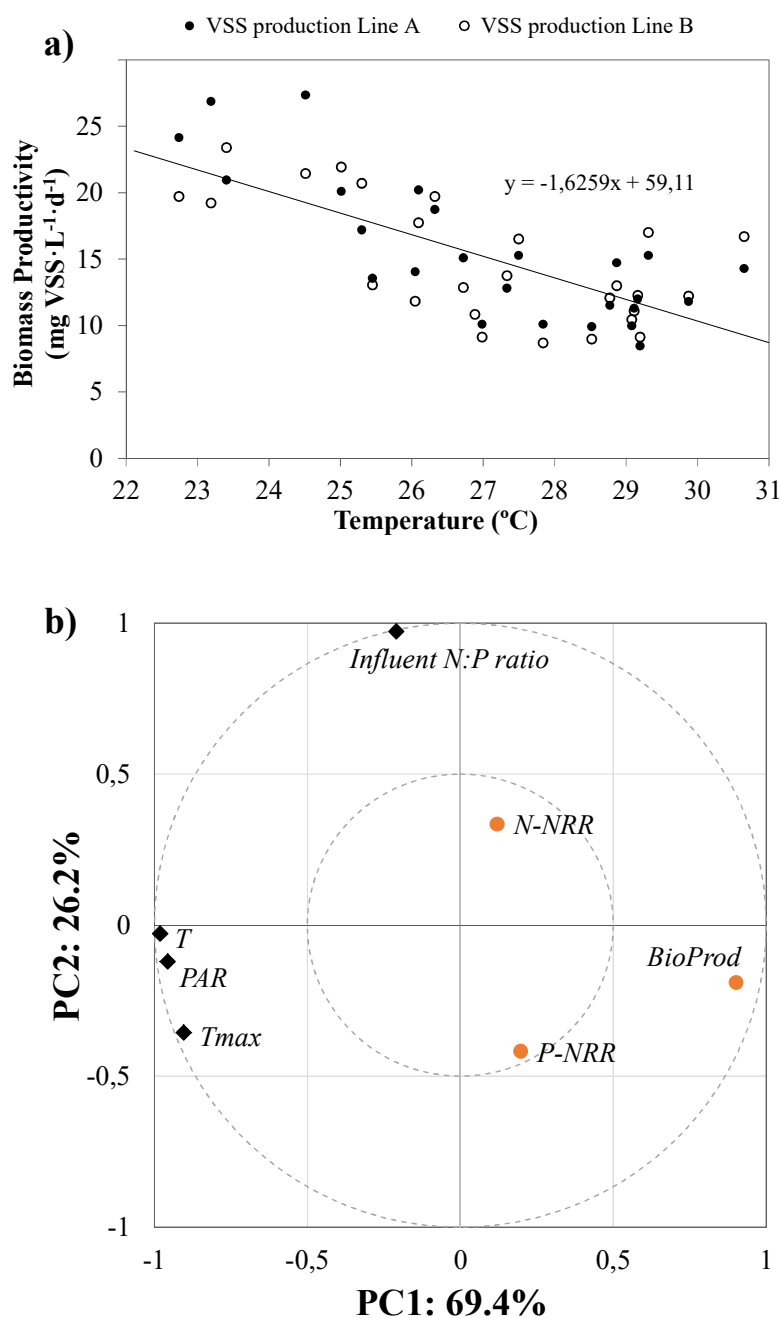


Figure 5.4. (a) Evolution of daily average VSS productivity versus daily average temperature during period i; and (b) PLSR results from period i: correlation circles plot from the integration of the selected predictors (Influent N:P, T, Tmax and PAR) and responses (BioProd, N-NRR and P-NRR). Nomenclature: PC: Principal Component; N:P: nitrogen to phosphorus ratio in the influent; T: daily average temperature; Tmax: daily maximum temperature; PAR: light intensity; BioProd: biomass productivity; N-NRR: nutrient recovery rate referred to nitrogen; and P-NRR: nutrient recovery rate referred to phosphorus.

In the case of phosphorus recovery rate (P-NRR), is affected by the nitrogen to phosphorus influent ratio, but in a lower degree than biomass productivity by temperature and light intensity (PC2 represents the 26.2% of total variance and these variables are inside the circle of radius 0.5). Specifically, P-NRR resulted inversely affected by the nitrogen to phosphorus influent ratio, meaning that higher phosphorus concentration in the influent enhances phosphorus recovery by microalgae accumulation. Similar results were obtained by Marcilhac et al. (2015) during microalgae-bacterial cultivation with digestate supernatant as growing media. Further experimental data under different operational conditions (e.g. long-term operation or operating at different N:P influent ratio) should be necessary to obtain more rigorous statistical correlations.

Concerning energy recovery, period i resulted in biomass productivities from 15 to 38 mg COD·L⁻¹·d⁻¹, corresponding with theoretical maximum methane productions from 0.005 to 0.013 L_{CH₄ STP}·L⁻¹·d⁻¹ if accounting for a theoretical methane yield of 350 mL CH₄ (STP) per g of COD removed. The biomethane potential will be lower than the theoretical one depending on the operational conditions, the type of pre-treatment applied and the biomass composition, among others.

Assuming a power generation efficiency of 30% for a combined heat and power system, the theoretical maximum electricity production for a biomethane potential of 100% could be as high as 0.20 kWh per m³ of treated water, which enhances the energy balance of WRRFs based on this green technology. The energy demand of current activated sludge systems is estimated in 0.67 kWh per m³ of treated water according to the Spanish Institute for Energy Diversification and Saving.

Regarding carbon footprint, this maximum electricity production from algal biomass can save up to 0.06 kg CO₂ per m³ of treated water, accounting for an energy mix with a carbon footprint of around 0.3 kg CO₂ eq. per kWh (e.g. Spain). In addition, carbon dioxide biofixation for algal biomass generation accounted for up to 0.23 kg CO₂ per m³ of treated water when assuming the typical composition of algal biomass reported by Green et al. (1996) (C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P), which enhances the environmental feasibility of microalgae cultivation technologies. Hence, a theoretical carbon input of around 0.29 kg CO₂ per m³ of treated water could be achieved under the operating conditions of period i.

Biomass productivity at the pseudo-steady state of sub-period i1 and sub-period i2 was around 22 and 11 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹, respectively. These values result in a PE of approx. 2.7 and 1.4%, respectively. These values are below the typical values obtained in flat-panel PBRs (Norsker et al., 2011), which indicates that further optimisation of the process is possible.

3.2. Influence of BRT

Figure 5.5 gives the resulting algal biomass productivity (Figure 5.5a), NRR (Figure 5.5b) and daily average temperature, and solar irradiance during period ii. Sub-period ii1, which was operated at 4.5 days of BRT and average temperature and PAR values of 28.7°C and 378 μE·m⁻²·s⁻¹, respectively, resulted in an average biomass productivity of 51.2 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹ (areal productivity of 12.24 g VSS·m⁻²·d⁻¹). After increasing BRT to 9 days in sub-period ii2, there was a significant reduction in algal biomass productivity, obtaining a mean value of 32.2 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹ (areal productivity of 7.7 g VSS·m⁻²·d⁻¹). During sub-period ii2 the daily average temperature fell considerably (from 30 to 22°C), as well as the daily average solar irradiance, which was characterised by strong dynamics with frequent low values. Biomass productivity during sub-period ii2 remained fairly constant, despite the continuous reduction in solar irradiance and temperature, suggesting that, in comparison with BRT, temperature and light variations had no significant influence on biomass productivity within the evaluated range of operating conditions. The differences in biomass productivity between sub-periods ii1 and ii2 were mainly attributed to the increase in BRT. This fact highlights the potential of BRT as control parameter in order to maximise resource recovery in MPBR systems. Indeed, BRT is a key parameter for palliating the effect of environmental conditions (i.e. variations on light intensity and temperature) on process performance and allows working at low HRTs (Luo et al., 2016).

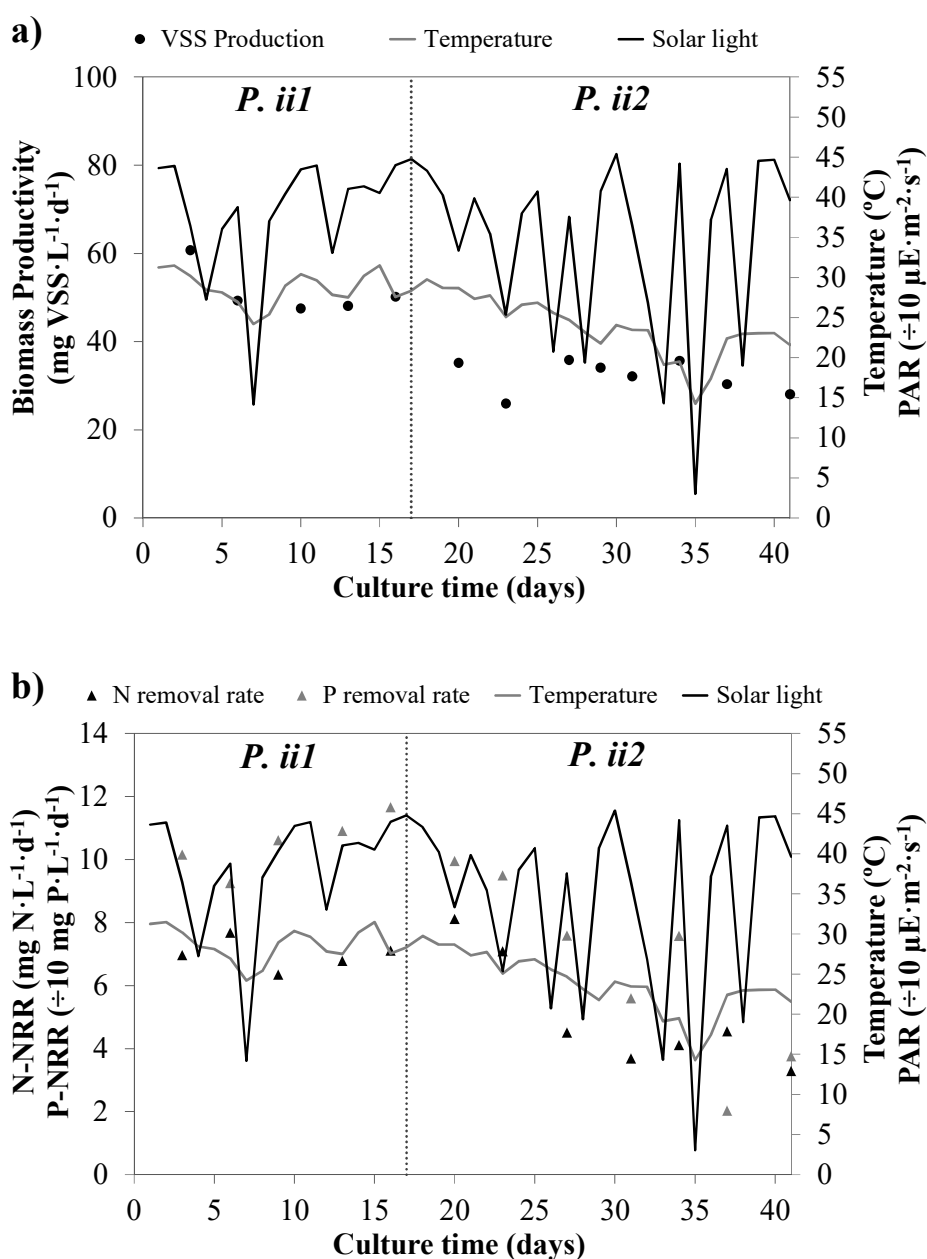


Figure 5.5. Time evolution of biomass productivity and nutrient recovery obtained during period ii: (a) VSS productivity, temperature and solar irradiance (PAR); and (b) NRR, temperature and solar irradiance (PAR). The vertical line separates sub-period ii1 and sub-period ii2.

Since BRT was doubled by halving the wasted volume of microalgae, the biomass concentration should have risen considerably to keep productivity constant. However, a rise in biomass concentration of only 27% was observed during operating period ii (from

370 mg VSS·L⁻¹ in sub-period ii1 to 471 mg VSS·L⁻¹ in sub-period ii2), which indicated reduced biomass productivity. This increase in biomass concentration could have favoured the light shading effect that negatively influences the cell growth rate (see, for instance, Cuaresma et al., 2011), and could explain the reduced biomass productivity in sub-period ii2.

In contrast to the reduced biomass productivity at the beginning of sub-period ii2, NRR remained at high values (8.12 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 0.95 mg P·L⁻¹·d⁻¹) until day 23. In addition, the specific nutrient uptake rates (with respect to VSS) also remained high: 30.1 mg N·gVSS⁻¹·d⁻¹ and 4.0 mg P·gVSS⁻¹·d⁻¹. However, NRR was reduced as temperature and solar irradiance declined throughout sub-period ii2. At the end of sub-period ii2, nitrogen and phosphorus recovery yielded values of 3.3 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 0.38 mg P·L⁻¹·d⁻¹. These results revealed that the combined effects of reducing daily average temperature and PAR from 28.7 to 23.9°C and from 378 to 343 μE·m⁻²·s⁻¹ on average, respectively, and increasing BRT from 4.5 to 9 days resulted in a reduction of about 30% in NRR. Another important effect observed in this period was that solar irradiance seemed to have a short-term effect on nutrient uptake (nitrogen and phosphorus), whilst the results obtained suggest that the same environmental factor has a more delayed effect on biomass productivity. Hence, as commented before, BRT should be modified accounting for variations on temperature and PAR in order to optimise resource recovery in MPBRs.

The NRR obtained in this study was higher than the daily NRR reported by Ji et al. (2014) in batch experiments using a novel green algae strain identified as *Desmodesmus* sp., which was fed with anaerobic digestion effluent under light/dark cycles. Park et al. (2010) also reported similar recovery rates (around 5-6 mg N·L⁻¹·d⁻¹) to Ji et al. (2014), by *Scenedesmus* sp. from the effluent of an anaerobic digester obtained from a piggery farm. However, the NRR results obtained in this study are significantly lower than the maximum NRR (19.53 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 3.7 mg P·L⁻¹·d⁻¹) reported by Ruiz-Martínez et al. (2012) at bench-scale under 24-h optimal light and temperature conditions and treating the same AnMBR effluent as the one used in the present study. Marcilhac et al. (2015) also obtained higher NRR (10.1 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 2.0 mg P·L⁻¹·d⁻¹) for *Scenedesmus* sp. in batch experiments at bench-scale with artificial illumination (in 12 h dark/12 h light cycle) while treating digestate supernatant. The present study was conducted outdoors (i.e. temperature and light intensity was not controlled), aiming to represent the expected

conditions of systems of this type at full-scale. Indeed, Van Den Hende et al. (2014) also reported a decrease in NRR when up-scaling microalgae cultivation from lab reactors to an outdoor pilot-scale raceway pond.

With regard to areal biomass productivity, the maximum value obtained in this study ($15.78 \text{ g VSS}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) is higher than other values reported for outdoor raceway ponds (Arbib et al., 2013; Van Den Hende et al., 2014). In comparison with other MPBR systems, Xu et al. (2014) reported lower average biomass productivities ($32.5 \text{ mg VSS}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $6.2 \text{ g VSS}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) than the ones reported in this study. Xu et al. (2014) worked with flat-panel PBR coupled with a submerged membrane module at bench-scale for P recovery in synthetic wastewater using *Chlorella* sp. However, the operating conditions are not fully comparable, since artificial lighting (in 12 h dark/12 h light cycle) was used by Xu et al. (2014), and an SRT and HRT of 180 and 1 days were set, respectively.

Figure 5.6 shows sample plot resulting from the principal component analysis of the 11 data sets from period ii, considering the explicative variables (Influent N:P, T and PAR) and responses (BioProd, N-NRR and P-NRR). The diagram is formed by projecting in plans the two first principal components or latent variables PC1 and PC2. The data from sub-period ii1 are located in the left-down side of the principal components diagram, in contrast to the data from sub-period ii2 which are more distributed mainly in the right side. These results corroborate the differences observed while operating at different BRT, i.e. a significant decrease in NRR and biomass productivity was reached when shifting BRT from 4.5 to 9 days.

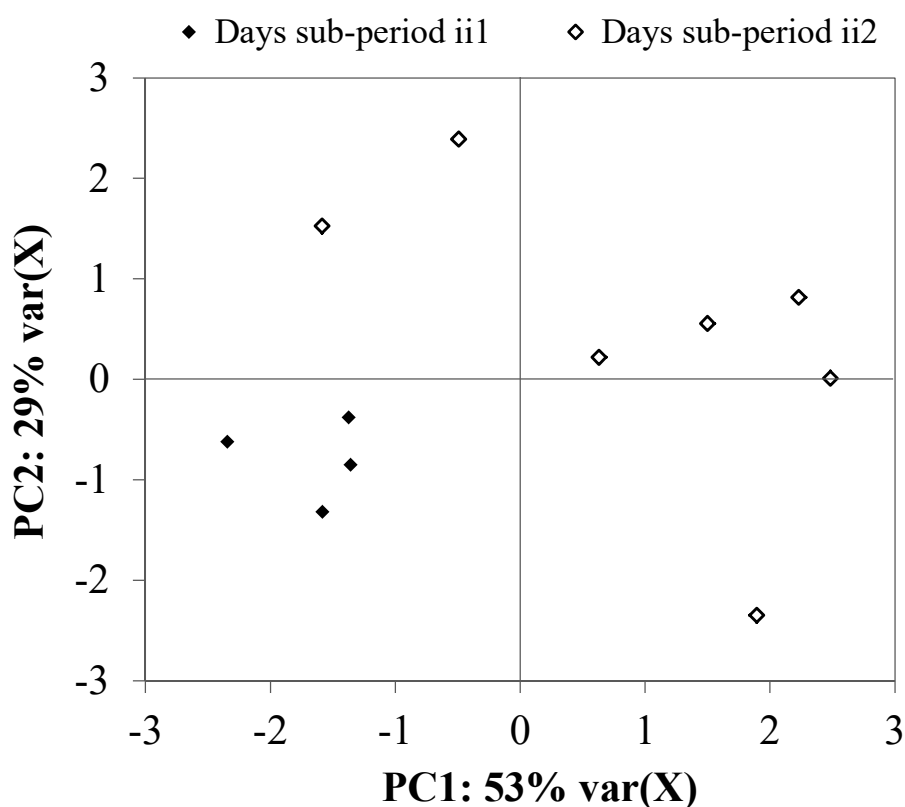


Figure 5.6. PLSR results from period ii: sample plot resulting from the principal component analysis of the 11 data sets from this period.

Analysing the overall process, the performance of this outdoor pilot-scale MPBR illustrates that further process optimisation is required to achieve higher microalgae productivity and nutrient recovery efficiency. Enhanced results regarding energy recovery and carbon footprint reduction were reached during period ii mainly due to the higher solar intensity recorded within this period in comparison with period i (see Table 5.2). In this respect, more solar energy was harvested, thus increasing the economic and environmental feasibility of the technology. Within period ii, theoretical maximum methane productivities from 0.015 to 0.033 $L_{CH_4\ STP} \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ would be achieved, corresponding to theoretical maximum electricity production of up to 0.43 kWh per m^3 of treated water. Concerning carbon footprint, maximum savings of up to 0.13 kg CO_2 per m^3 of treated water could be achieved from energy recovery. Carbon dioxide biofixation for algal biomass growth would account for up to 0.51 kg CO_2 per m^3 of

treated water. Hence, a theoretical carbon input of around 0.64 kg CO₂ per m³ of treated water could be achieved under similar operating conditions to the ones from period ii.

Biomass productivity at the pseudo-steady state of sub-period ii1 and sub-period ii2 was around 51 and 32 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹, respectively. These values result in a PE of approx. 6.3 and 4.0%, respectively. Therefore, enhanced performance was achieved during this period compared to period i. Indeed, sub-period ii1 resulted in PE values above the typical PE value of 5% observed in flat-panel PBRs (Norsker et al., 2011). Nevertheless, these values are still below than the maximum theoretical PE value of 9% (see e.g. Jonker and Faaij, 2013).

3.3. Influence of the non-photoc volume fraction

The results obtained in operating period iii (see Table 5.3) revealed that the non-photoc volume fraction is a key factor to be minimised in order to optimise the feasibility of MPBR for sewage treatment. Reducing the non-photoc volume fraction from 27.2% (sub-period iii1) to 13.6% (sub-period iii2) resulted in an increase of 40% in biomass productivity. Specifically, biomass productivity increased from 21.9 in sub-period iii1 to 30.6 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹ in sub-period iii2, which corresponds to an increase in the areal productivity from 5.24 to 7.32 g VSS·m⁻²·d⁻¹, respectively. Nutrient recovery efficiency was slightly lower in sub-period iii1 (6.61 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 0.81 mg P·L⁻¹·d⁻¹) than in sub-period iii2 (7.61 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 0.97 mg P·L⁻¹·d⁻¹), which was also attributed to an increase in the amount of harvested solar energy in the latter sub-period.

Table 5.2. NRR, nutrient removal efficiency and biomass productivity within the pseudo-steady state of each operating (sub-)period.

Period	Duration (d)	Biomass productivity (mg VSS·L ⁻¹ ·d ⁻¹ / g VSS·m ⁻² ·d ⁻¹)	N-NRR (mg N·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	P-NRR (mg P·L ⁻¹ ·d ⁻¹)
P. iii1	27.2	21.9 ± 2.2 / 5.24 ± 0.52	6.61 ± 0.56	0.56 ± 0.26
P. iii2	13.6	30.6 ± 6.54 / 7.32 ± 1.56	7.61 ± 0.72	0.97 ± 0.03

The effect of the non-photoc volume fraction on biomass productivity would be considerably reduced in full-scale operations, i.e. the non-photoc volume fraction would be considerably reduced as a result of operating with reduced membrane tank volumes, thus significantly enhancing the performance of MPBRs at full-scale.

4 CONCLUSIONS

A MPBR plant treating the nutrient-loaded effluent from an AnMBR sewage treatment system was operated under different outdoor environmental and operating conditions. The variations recorded in temperature and solar irradiance strongly affected biomass productivity and NRR. In this study, maximum nutrient recovery rates of 7.68 mg N·L⁻¹·d⁻¹ and 1.17 mg P·L⁻¹·d⁻¹, and maximum biomass productivities of 66 mg VSS·L⁻¹·d⁻¹ (15.78 g VSS·m⁻²·d⁻¹) were achieved when operating at 4.5 days of biomass retention time. Reducing the non-photoc volume fraction from 27.2% to 13.6% resulted in an increase of 40% in biomass productivity. The obtained results showed that microalgae cultivation systems could contribute to reduce the energy demand and the carbon footprint of the wastewater treatment process due to solar energy harvesting for algal biomass growth, while recovering valuable nutrients from sewage. Specifically, maximum carbon input of around 0.64 kg CO₂ per m³ of treated water could be achieved under favourable environmental conditions. By the use of ultrafiltration membranes (pore size of 0.03 μm), MPBR produces a high quality permeate (i.e. negligible levels of pathogens and suspended solids) which could be useful for reuse and recycling applications such as irrigation purposes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Projects CTM2011-28595-C02-01/02, CTM2014-54980-C2-1-R and CTM2014-54980-C2-2-R) jointly with the European Regional Development Fund (ERDF) and Generalitat Valenciana (GVA-ACOMP2013/203), which are gratefully acknowledged. The authors also like to acknowledge the support received from Generalitat Valenciana via one VALi+d post-doctoral grant (APOSTD/2014/049).

REFERENCES

- APHA, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., American Public Health Association, Washington, DC.
- 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. *Ecol. Eng.* 52, 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.089>
- Ashley, K., Cordell, D. Mavinic, D., 2011. A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere* 84, 737-746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.001>
- Béchet, Q., Shilton, A., Fringer, O., Munoz, R., Guieysse, B., 2010. Mechanistic modelling of broth temperature in outdoor photobioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2197-2203. <https://doi.org/10.1021/es903214u>
- Bilad, M.R., Arafat, H.A., Vankelecom I.F., 2014. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. *Biotechnol. Adv.* 32, 1283-1300. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.008>
- Cuaresma, M., Janssen, M., Vilchez, C., Wijffels R.H., 2009. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 352-359. <https://doi.org/10.1002/bit.22394>
- Do Nascimento, M., Sanchez Rizza, L., Arruebarrena Di Palma, A., Dublan, M.A., Salerno, G., Rubio, L.M., Curatti, L., 2015. Cyanobacterial biological nitrogen fixation as a sustainable nitrogen fertilizer for the production of microalgal oil. *Algal Res.* 12, 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.017>

- Flores-Alsina, X., Corominas, LL., Snip, L., Vanrolleghem, P.A., 2011. Including greenhouse gas emissions during benchmarking of wastewater treatment plant control strategies. *Water. Res.* 45, 4700-4710. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.040>
- 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. *Bioresour. Technol.* 167, 441-446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.042>
- Gao, F., Yang, Z.H., Li, C., Zeng, G.M., Ma, D.H., Zhou, L., 2015. A novel algal biofilm membrane photobioreactor for attached microalgae growth and nutrients removal from secondary effluent. *Bioresour. Technol.* 179, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.108>
- Ghisellini, P., Cialani, C. Ulgiati, S., 2016. A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *J. Clean. Prod.* 114, 11–32. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.007>
- Giménez, J.B., Robles, A., Carretero, L., Duran, F., Ruano, M.V., Gatti, M.N., Ribes, J., Ferrer, J., Seco, A., 2011. Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fiber membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresour. Technol.* 102, 8799-8806. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.014>
- Green, F.B., Bernstone, L.S., Lundquist, T.J., Oswald, W.J., 1996. Advanced integrated wastewater pond systems for nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* 33, 207–217. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00356-3](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00356-3)
- Intergovernmental Panel on Climate Change: IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, Prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme, Egglestone H.S., Buendia L., Miwa K., Ngara T. and Anabe K. (eds). Published 2006 by IGES, Japan. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl>. Volume 5: Waste, Chapter 6: Wastewater treatment and discharge.
- Jankowska, E., Sahu, A.K., Oleskowicz-Popiel, P., 2017. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 75, 692-709. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.045>
- Ji, F., Liu, Y., Hao, R., Li, G., Zhou, Y., Dong, R., 2014. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresour. Technol.* 161, 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.034>
- Jonker, J.G.G., Faaij, A.P.C., 2013. Techno-economic assessment of micro-algae as feedstock for renewable bio-energy production. *Applied Energy* 102, 461–475. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.053>

- Krustok, I., Odlare, M., Truu, J., Nehrenheim, E., 2016. Inhibition of nitrification in municipal wastewater-treating photobioreactors: Effect on algal growth and nutrient uptake. *Bioresour. Technol.* 202, 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.020>
- Luo, Y., Le-Clech, P., Henderson, R.K., 2017. Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: A review. *Algal Res.* 24, 425-437. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.026>
- Marcilhac, C., Sialve, B., Pourcher, A.-M., Ziebal, C., Bernet, N., Béline, F., 2015. Control of nitrogen behaviour by phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate. *Bioresour. Technol.* 175, 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.022>
- Mata, T., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Molina, E., Fernández, J., Ación-Fernández, F.G., Chisti, Y., 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J. Biotechnol.* 92, 113-131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00353-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00353-4)
- Nicolae, B., George-Vlad, B., 2015. Life cycle analysis in refurbishment of the buildings as intervention practices in energy saving. *Energ. Buildings* 86, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2014.10.021>
- Norsker, N-H., Barbosa, M.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Microalgal production — A close look at the economics. *Biotechnol. Adv.* 29, 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
- Park, J., Jin, H., Lim, B.-R., Park, K.-Y., Lee, K., 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 8649-8657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>
- Parravicini, V., Svardal, K., Krampe, J., 2016. Greenhouse Gas Emissions from Wastewater Treatment Plants. *Energy. Procedia.* 97, 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.10.067>
- Ras, M., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12, 153-164. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9310-6>
- Robles, A., Durán, F., Ruano, M.V., Ribes, J., Rosado, A., Seco, A., Ferrer, J., 2015. Instrumentation, control, and automation for submerged anaerobic membrane bioreactors. *Environ. Technol.* 25, 1-12. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1012180>
- Ruiz-Martínez, A., Martín García, N., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2012. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour. Technol.* 126, 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>

- Ruiz-Rosa, I., García-Rodríguez, F.J., Mendoza-Jiménez, J., 2016. Development and application of a cost management model for wastewater treatment and reuse processes. *J. Clean. Prod.* 113, 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.12.044>
- Sánchez, J.F., Fernández-Sevilla, J.M., Acién-Fernández, F.G., Cerón, M.C., Pérez-Parra, J., Molina-Grima, E., 2008. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 719–729. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1494-2>
- Scarsella, M., Torzillo, G., Cicci, A., Belotti, G., De Filippis, P., Bravi, M., 2012. Mechanical stress tolerance of two microalgae. *Process Biochem.* 47, 1603-1611. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.002>
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Zilli, M., Converti, A., 2008. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochem. Eng. J.* 39, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.10.007>
- Tran, K.C., Mendoza Martin, J.L., Heaven, S., Banks, C.J., Acién-Fernández, F.G., Molina-Grima, E., 2014. Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open raceway. *Algal Res.* 5, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.06.001>
- Tsolcha, O.N., Tekerlekopoulou, A.G., Akratos, C.S., Aggelis, G., Genitsaris, S., Moustaka-Gouni, M., Vayenas, D.V., 2017. Biotreatment of raisin and winery wastewaters and simultaneous biodiesel production using a *Leptolyngbya*-based microbial consortium. *J. Clean. Prod.* 148, 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.026>
- Van Den Hende, S., Beelen, V., Bore, G., Boon, N., Vervaeren, H., 2014. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresour. Technol.* 159, 342-354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.113>
- Viruela, A., Murgui, M., Gómez-Gil, T., Durán, F., Robles, Á, Ruano, M.V., Ferrer, J., 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, *Bioresour. Technol.* 218, 447-454. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.116>
- Winans, K., Kendall, A., Deng, H., 2017. The history and current applications of the circular economy concept. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 68, 825-833. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.123>
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58, 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

Xin, L., Hong-Ying, H., Yu-ping, Z., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol.* 102, 3098-3102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>

Xu, M., Bernards, M., Hu, Z., 2014. Algae-facilitated chemical phosphorus removal during high-density *Chlorella emersonii* cultivation in a membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 153, 383-387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.026>

APPENDIX A. Supplementary Material

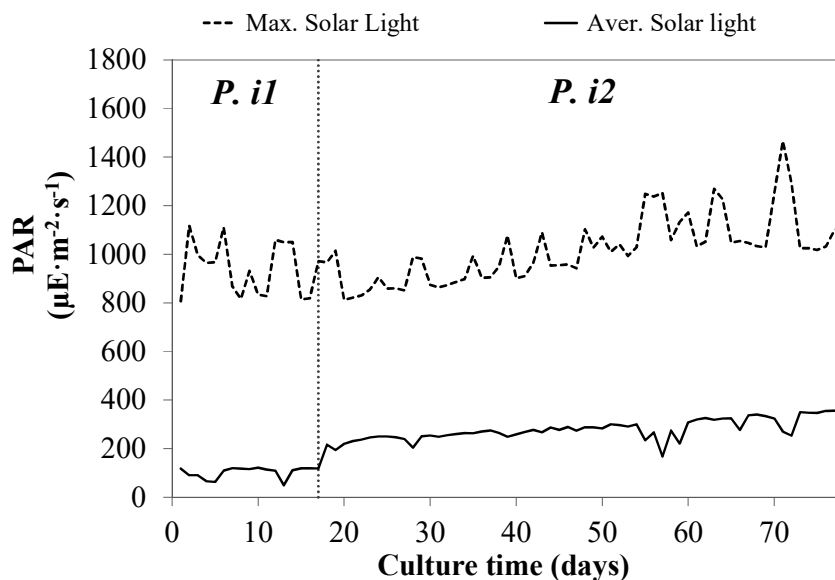


Figure 5.S1. Time evolution of maximum instantaneous and daily average solar irradiance (PAR) during period i. The vertical line separates sub-period i1 and sub-period i2.

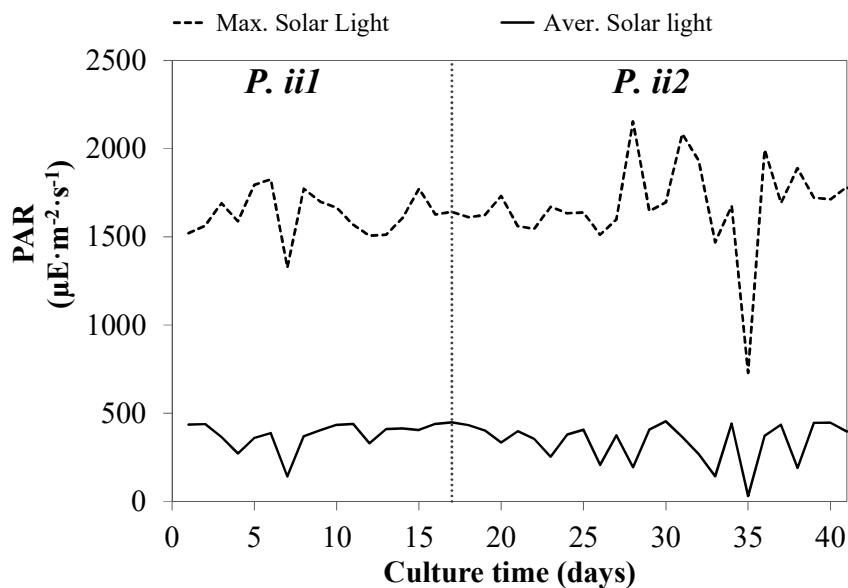


Figure 5.S2. Time evolution of maximum instantaneous and daily average solar irradiance (PAR) during period ii. The vertical line separates sub-period ii1 and sub-period ii2.

CAPÍTULO 6

**KINETIC MODELING OF AUTOTROPHIC
MICROALGAE MAINLINE PROCESSES FOR
SEWAGE TREATMENT IN PHOSPHORUS-
REPLETE AND -DEplete CULTURE CONDITIONS**

CAPÍTULO 6:

KINETIC MODELING OF AUTOTROPHIC MICROALGAE MAINLINE PROCESSES FOR SEWAGE TREATMENT IN PHOSPHORUS-REPLETE AND -DEplete CULTURE CONDITIONS

Viruela, A., Aparicio, S., Robles, Á., Falomir, L.B., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., 2021. Kinetic modeling of autotrophic microalgae mainline processes for sewage treatment in phosphorus-replete and -deplete culture conditions. Sci. Total Environ. 797, 149165. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149165>

ABSTRACT

A kinetic model of autotrophic microalgal growth in sewage was developed to determine the biokinetic processes involved, including carbon-, nitrogen- and phosphorus-limited microalgal growth, dependence on light intensity, temperature and pH, light attenuation and gas exchange to the atmosphere. A new feature was the differentiation between two metabolic pathways of phosphorus consumption according to the availability of extracellular phosphorus. Two scenarios were differentiated: phosphorus-replete and -deplete culture conditions. In the former, the microalgae absorbed phosphorus to grow and store polyphosphate. In the latter the microalgae used the stored polyphosphate as a phosphorus source for growth.

Calibration and validation were performed with experimental data from a pilot-scale membrane photobioreactor (MPBR) fed with the permeate obtained from an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) pilot plant fed with real urban wastewater. 12 of the model parameters were calibrated. Despite the dynamics involved in the operating and environmental conditions, the model was able to reproduce the overall process performance with a single set of model parameters values. Four periods of different environmental and operational conditions were accurately simulated. Regarding the former, light and temperature ranged $10\text{-}406 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and $19.7\text{-}32.1^\circ\text{C}$, respectively.

Concerning the later, the photobioreactors widths were 0.25 and 0.10 m, and the biomass and hydraulic retention times ranged 3-4.5 and 1.5-2.5 days, respectively. The validation of the model resulted in an overall correlation coefficient (R^2) of 0.9954. The simulation results showed the potential of the model to predict the dynamics of the different components: the relative proportions of microalgae, nitrogen and phosphorus removal, polyphosphate storage and consumption, and soluble organic matter concentration, as well as the influence of environmental parameters on the microalgae's biokinetic processes. The proposed model could provide an effective tool for the industry to predict microalgae production and comply with the discharge limits in areas declared sensitive to eutrophication

1. INTRODUCTION

Sewage contains large amounts of nutrients (nitrogen and phosphorus) which have traditionally been removed to avoid eutrophication of aquatic ecosystems (Song et al., 2018). Conventional sewage treatment provides satisfactory levels of nutrient removal, but at the expense of intensive energy consumption, greenhouse gas emissions and a limited nutrient recovery capacity. (Acién-Fernández et al., 2016a; Rahman et al., 2016; Sabeen et al., 2018). Using a global and improved circular economy approach, sewage treatment thus needs to shift towards more cost-effective and eco-friendly alternatives, e.g. a microalgae-based system.

Treatment by green microalgae is a promising technology with several benefits, since it can biofix greenhouse gases and recover nitrogen and phosphorus from wastewater (González-Camejo et al., 2020a) with a lower energy consumption than conventional processes (González-Camejo et al., 2019a). Microalgae require macronutrients and micronutrients for photosynthesis and thus for growth, while combining wastewater with a photobioreactor provides the necessary environmental conditions for photosynthesis and autotrophic microalgae growth (González-Camejo et al., 2020b). High nutrient removal efficiencies (over 80%) can be achieved by means of microalgae phototrophic growth (Acién-Fernández et al., 2018; Álvarez-Díaz et al., 2017; García et al., 2018; Li et al., 2011; Sydney et al., 2011; Viruela et al., 2016; Zhu et al., 2013). Other advantages

of using microalgae for wastewater treatment are: low operating costs; recycle of nutrients assimilated into the microalgae biomass as a fertilizer when allowed by the regulations, avoiding problems related to sludge handling; CO₂ biofixation (CO₂ capture and storage by microalgae); removal of emerging pollutants; and discharge of oxygenated effluent into aquatic ecosystems (Abargues et al., 2013, Abargues et al., 2018; Aslan & Kapdan, 2006; Kassim & Meng, 2017; Matamoros et al., 2016).

Although wastewater treatment systems based on microalgae have been studied for many years, some metabolic processes are still relatively unknown. Nutrient removal and storage processes and the effect of environmental and operational conditions on the different metabolic pathways are still not properly understood.

The relationship between the nutrient removal rate and microalgae intracellular phosphorus content was experimentally evaluated by Ruiz-Martínez et al. (2014), who found that intracellular phosphorus compounds can support microalgae growth in an extracellular phosphorus-depleted medium. Furthermore, after a single phosphorus addition to culture medium, intracellular phosphorus content increased rapidly (luxury uptake), and so did nitrogen uptake rate (Ruiz-Martínez et al., 2014).

Nutrient removal depends not only on the concentration and availability of nutrients but temperature and pH also play an important role in effluent nutrient discharge. Like other organisms, microalgae have an optimal temperature and pH for rapid metabolism, nutrient removal and biomass productivity (Cabello et al., 2015; Chinnasamy et al., 2009; González-Camejo, et al., 2019b; Ruiz-Martínez et al., 2015b). Many studies have been carried out to evaluate potential microalgae-based wastewater treatment and found that the operating conditions that most affect pollutant removal efficiency and biomass productivity are the biomass and hydraulic retention time (BRT and HRT, respectively) together with the available light intensity (Acién-Fernández et al., 2016b; Ashadullah et al., 2021; González-Camejo et al., 2019b; González-Camejo et al., 2020b; Nguyen et al., 2021; Viruela et al., 2018; Xu et al., 2015). However, microalgae-based technologies increase pH to values above 9 by photosynthesis and thus increase free ammonia stripping and phosphorus precipitation, which are considered to be an undesirable nutrient removal pathway (Delgadillo-Mirquez et al., 2016; García et al., 2000; Larsdotter, 2006).

Within this framework, in which many factors affect algal metabolism, a complete and realistic understanding of simultaneous effects of different environmental and operational variables on microalgae culture is necessary in order to predict performance and optimize reactor design. Mathematical models can be used to study the effects of the environmental and operational variables, which are mathematically related to the output variables (biomass productivity, nutrient uptake, etc.), allowing the effect of changing the input variables to be studied without the need for individual experimental tests. Bernard et al. (2009) proposed a photobioreactor model that deals only with both light and nitrogen limitation through Beer-Lambert's Law and the Droop Equation, respectively. These researchers considered that microalgae growth is related to light intensity and the intracellular nitrogen concentration or quota, but they did not include the effect of other relevant parameters such as temperature or phosphorus concentration. The PhBT model provided by Ruiz et al. (2013) focused on microalgae growth according to nitrogen and phosphorus availability, regardless of the effect of other environmental parameters. This model incorporated luxury uptake as a key factor in microalgae modeling; this is the ability to take up more nitrogen or phosphorus than needed to support the next cell cycle and store the excess. Due to luxury uptake, the PhBT model features two different kinetics: one for microalgae growth through the Verhulst expression and another for nutrient uptake. The model proposed by Solimeno et al. (2015) accounts for the effects of inorganic carbon, nitrogen, temperature, and light on microalgae growth, including free ammonia, oxygen, and carbon dioxide stripping, although phosphorus is not considered to be a limiting factor. Wágner et al. (2016) developed a model for photoautotrophic and heterotrophic microalgal growth. Besides the PhBT model, the authors considered that growth and nutrient uptake are decoupled processes and so only studied growth with stored nutrients. This model examined the effect of light intensity on microalgae growth biokinetics without including the temperature effect on the model's parameter values.

Previous modeling studies have taken on the specific challenge of modeling growth and nutrient removal in wastewater algae systems. However, not all environmental parameters have been considered in biokinetics (culture temperature was not considered by Bernard et al. (2009) and Ruiz et al. (2013), Ruiz et al. (2013) did not include light intensity for microalgae photosynthesis, and available phosphorus concentration was not considered in the models proposed by Bernard et al. (2009) and Solimeno et al. (2015), who used

small-scale laboratory data or synthetic wastewater to validate their data. It is well known that a lab-scale nutrient removal rate, microalgae productivity and synthetic wastewater do not accurately represent industrial scale facilities. To fully understand the potential of microalgae-based wastewater treatment, models should therefore be able to predict microalgae productivity in an achievable industrial scale configuration while incorporating real-world location characteristics, since ever-changing environmental conditions, such as solar irradiance, have a strong impact on microalgae growth and the sewage treatment process.

The aim of the present study was thus to propose a new model that included crucial physical and biokinetic processes to analyze autotrophic microalgae growth in sewage. The proposed model can predict the evolution of the key process indicators, such as biomass concentration, intracellular phosphorus concentration or nitrogen and phosphorus contents in the liquid phase, as well as free ammonia, carbon dioxide and oxygen exchange in the gas phase. The model was calibrated and validated by data gathered from a pilot-scale Membrane Photobioreactor (MPBR) over two different seasons (winter and summer) at different BRT and HRT. The photobioreactor influent was obtained from an AnMBR pilot plant fed with real urban wastewater. This stream had low organic matter content, negligible suspended solids and a nutrient concentration similar to the influent urban wastewater. The proposed model will provide new insights into microalgae culture operations, while helping to explore the simultaneous effects of environmental (light intensity, temperature and pH) and operational (BRT, HRT and disturbance) parameters that affect microalgae in sewage treatment processes.

2. MODEL DESCRIPTION

2.1. Conceptual model

A scheme of the conceptual model is shown in Figure 6.1. It can be seen that microalgae grow with nitrogen and phosphorus in the presence of light, using inorganic carbon and releasing oxygen through photosynthesis (Calvin Cycle). It should be noted that micronutrients are not considered limiting factors in the proposed model, as they tend to be widely available in sewage and is the type of culture primarily targeted by this model.

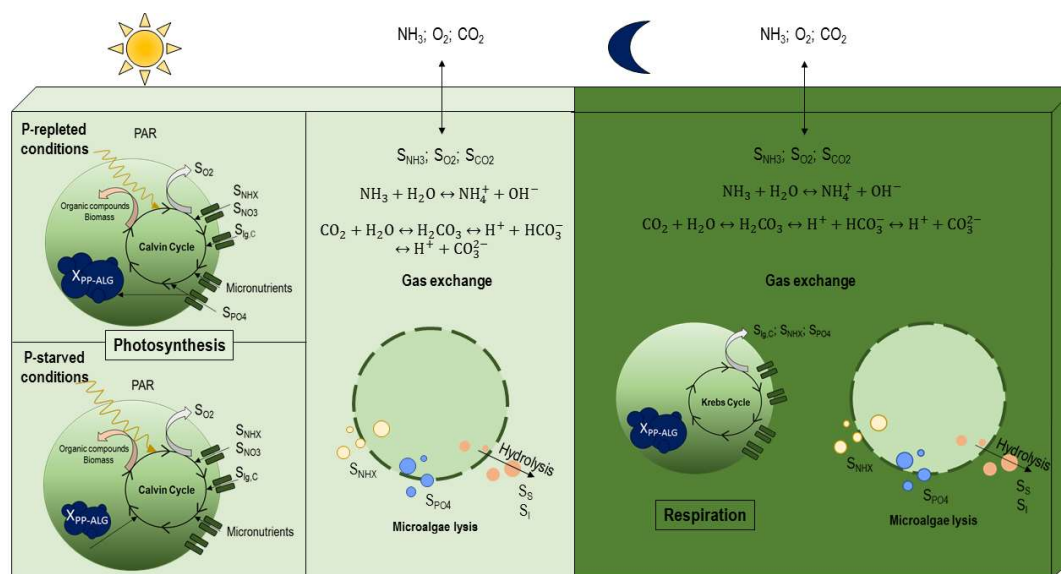


Figure 6.1. Simplified schematic representation of the conceptual model showing the main microalgae processes in a photobioreactor in light (left) and dark conditions (right). The nomenclature of the dissolved and particulate components is described in Section 2.3 as are the model processes. The components shown in the Figure 1 are: PAR: photosynthetically active radiation; S_{O_2} : dissolved oxygen; S_{NH_3} : ammonium plus free ammonia nitrogen; S_{NH_3} : free ammonia nitrogen; S_{NO_3} : nitrate nitrogen; S_{PO_4} : total soluble inorganic phosphorus; X_{PP-ALG} : polyphosphates stored by microalgae; $S_{i,C}$: total inorganic carbon; S_{CO_2} : carbon dioxide; S_S : readily biodegradable soluble organic matter and S_I : inert soluble organic matter.

However, in the specific case of the presence of a limiting micronutrient, the dependence of microalgae growth on it could be easily applied in the model by means of a Monod-type function. Microalgae can grow with both ammonium-ammonia (they are considered to be in chemical equilibrium) and nitrate, but will preferably take up ammonium from sewage before nitrate. As a result of microalgal photosynthesis, pH increases and bicarbonate-carbonate equilibrium shifts towards the formation of carbonate, boosting free ammonia stripping. In terms of phosphorus absorption, the luxury uptake concept was applied. In a phosphorus-replete culture, microalgae will absorb more phosphorus than they need to support their vital biological functions and will store an excess to continue growing under phosphorus-deplete conditions. P-deplete conditions refer to periods where no phosphates were detected in the medium. P-replete conditions refer to

periods where phosphates never drop below $0.5 \text{ g P}\cdot\text{m}^{-1}$. Photosynthesis is disabled in darkness and endogenous respiration (Krebs Cycle) is the dominant process, releasing carbon dioxide into the culture medium, so that hydrogen ion concentration increases and pH decreases. Decreasing pH shifts carbon equilibrium and the carbonate is turned into bicarbonate, which can be used again as a carbon source in the presence of light. Endogenous respiration and cell lysis continue regardless of the light conditions and phosphate and organic matter are released as a result of these processes while the organic compounds released into the culture medium are hydrolyzed to readily biodegradable organic matter. The microalgae processes are influenced by temperature, which also affects pH, gas solubility and chemical equilibria, while excess oxygen, carbon dioxide and free ammonia are transferred from the liquid phase to the gaseous phase, and vice versa.

Figure 6.1. Simplified schematic representation of the conceptual model showing the main microalgae processes in a photobioreactor in light (left) and dark conditions (right). The nomenclature of the dissolved and particulate components is described in Section 2.3 as are the model processes. The components shown in the Figure 6.1 are: PAR: photosynthetically active radiation; S_{O_2} : dissolved oxygen; S_{NHX} : ammonium plus free ammonia nitrogen; S_{NH_3} : free ammonia nitrogen; S_{NO_3} : nitrate nitrogen; S_{PO_4} : total soluble inorganic phosphorus; X_{PP-ALG} : polyphosphates stored by microalgae; $S_{Ig,C}$: total inorganic carbon; S_{CO_2} : carbon dioxide; S_S : readily biodegradable soluble organic matter and S_I : inert soluble organic matter.

2.2. Model assumptions

The model was based on the following set of general assumptions:

- The microalgae considered do not belong to a specific genus, since in the microalgae cultures used to calibrate and validate the model, processes of ecological succession between the genera *Chlorella* and *Scenedesmus* were observed.

- Microalgal inhibition caused by excess oxygen or excess free ammonia is not considered, as the pilot-scale MPBR plant was operated at oxygen concentrations near saturation and at 7.5 pH, reducing free ammonia concentration. Moreover, the influent to the MPBR plant was characterized by pH values close to 7 and total ammonia concentrations ranging from 46 to 69 mg N·L⁻¹. Thus, negligible inhibition of microalgae due to free ammonia concentration was expected.
- As the growth of heterotrophic bacteria is not considered in the model, complete and direct hydrolysis of the biodegradable particulate organics is assumed, resulting in the formation of biodegradable soluble organics.

2.3. Model Components

The model considers 10 soluble and 4 suspended components. The following two sections describe the model components and their interactions with each other, as well as their role in the kinetic processes described in Section 2.5.

2.3.1. Soluble components

S_{O2} [g O₂·m⁻³]: dissolved oxygen. Dissolved oxygen concentration in the liquid phase produced by microalgae growth through photosynthesis and gas exchange, while its concentration is also affected by endogenous respiration and gas exchange.

S_{NHx} [g N·m⁻³]: ammonium plus free ammonia nitrogen (S_{NH4} + S_{NH3}). Nitrogen present in liquid phase as ammonium and free ammonia. S_{NHX} is produced by endogenous respiration and microalgae lysis, and its concentration is reduced by microalgae growth and gas exchange.

S_{NO3} [g N·m⁻³]: nitrate nitrogen. Nitrogen present in the water as nitrate which is consumed as a nitrogen source for microalgae growth.

S_{PO4} [g P·m⁻³]: total soluble inorganic phosphorus. Phosphorus present in liquid phase, assumed to be orthophosphate. To balance the electrical charges, S_{PO4} is assumed to

consist of H_2PO_4^- , regardless of pH. S_{PO_4} concentration increases as a result of endogenous respiration and lysis of both microalgae and the intracellular phosphorus component (polyphosphate) and is consumed by microalgae growth and phosphorus storage processes.

$S_{\text{Ig,C}}$ [$\text{mol C}\cdot\text{m}^{-3}$]: total inorganic carbon consists of CO_2 , HCO_3^- and CO_3^{2-} in liquid phase produced by endogenous respiration and microalgae lysis. For all stoichiometric computations it is assumed that $S_{\text{Ig,C}}$ is CO_2 . $S_{\text{Ig,C}}$ concentration decreases as a result of the combination of microalgae growth and gas exchange.

S_{H} [$\text{mol H}\cdot\text{m}^{-3}$]: proton representing the analytical summary of all the species in which the H^+ component participates (Eq. 6.1). Proton concentration decreases with microalgae growth using S_{NO_3} as nitrogen source, as well as polyphosphate storage, lysis of microalgae and polyphosphate and dioxide carbon stripping. S_{H} increases with microalgae growth using S_{NH_x} as nitrogen source and with endogenous respiration.

$$S_{\text{H}} = [\text{H}^+] - [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{HPO}_4^{2-}] + 2[\text{H}_2\text{PO}_4^-] + 3[\text{H}_3\text{PO}_4] - [\text{NH}_3] - [\text{OH}^-] \quad (\text{Eq. 6.1})$$

S_{Mg} [$\text{g Mg}\cdot\text{m}^{-3}$]: total soluble inorganic magnesium. Magnesium concentration present in liquid phase, which is consumed by storage of intracellular phosphorus compound and released to culture medium by microalgae growth and intracellular phosphorus lysis.

S_{K} [$\text{g K}\cdot\text{m}^{-3}$]: total soluble inorganic potassium. Potassium concentration present in liquid phase. Soluble potassium is consumed by microalgae and S_{Mg} , through the storage of phosphorus intracellular compound and released to culture medium by microalgae growth when phosphorus sources are polyphosphate and intracellular phosphorus lysis.

S_{s} [$\text{g COD}\cdot\text{m}^{-3}$]: readily biodegradable soluble organic matter. Fraction of the biodegradable soluble organic matter in liquid phase. Microorganism lysis produces biodegradable particulate organic matter (X_{S}) hydrolyzed to S_{s} by heterotrophic bacteria. Since this model does not account for indigenous wastewater bacteria, the biokinetics was simplified by the assumption that operating and environmental conditions promote complete hydrolysis of X_{S} to S_{s} . When this simplification is not assumed, the simulated data show an accumulation of X_{S} and an absence of S_{s} , unlike the experimental measurements.

S_I [g COD·m⁻³]: inert soluble organic matter. Fraction of the inert soluble organic matter in liquid phase. The same simplification is assumed for S_I as for S_S , by which S_I is produced because of microalgae lysis.

MINTEQA2 software was used to compute the equilibrium, including the calculation of the ionic species, free ammonia and dissolved carbon dioxide.

2.3.2. Particulate components

X_{ALG} [g COD·m⁻³]: microalgae biomass. Concentration of microalgae in liquid phase that increases with growing processes and is reduced by endogenous respiration and lysis. The common composition for microalgae cell $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ is assumed for stoichiometric considerations (Oswald, 1988).

X_I [g COD·m⁻³]: inert particulate organic matter. Concentration of inert particulate organic matter in liquid phase which increases by microorganic lysis.

X_{PP-ALG} [g P·m⁻³]: polyphosphates stored by X_{ALG} and part of the particulate phosphorus concentration. Concentration of inorganic intracellular polyphosphates but not included in the mass of X_{ALG} . For stoichiometric considerations, X_{PP-ALG} is assumed to have the composition of $(K_{0.34}Mg_{0.33}PO_3)_n$. Polyphosphate is consumed by microalgae in phosphorus-deplete medium, and is also reduced as a result of X_{PP-ALG} lysis. Intracellular polyphosphates increase with storage of polyphosphates process.

X_{NVSS} [g TSS·m⁻³]: influent non-volatile suspended solids. This component does not include non-volatile suspended solids related to X_{PP-ALG} . It should be noted that X_{NVSS} have not been included in stoichiometric matrix since they are not involved in the kinetic processes defined. X_{NVSS} should be considered in sedimentation or harvesting processes. In this case study, an influent was used with a negligible X_{TSS} concentration, so that the X_{NVSS} concentration was zero. Incorporating the X_{NVSS} component in the stoichiometric matrix involves total suspended solids being added to conversion factors and mathematical expressions associated with the binding processes.

Note that in calibration and validation procedures, microalgae biomass was quantified by both total and volatile suspended solids measures (TSS and VSS, respectively). In order to compare experimental data with simulated results, two additional components were defined through the components described above: X_{TSS} [g TSS·m⁻³] and X_{VSS} [g VSS·m⁻³]. Since TSS and VSS not only involve microalgae biomass but also other suspended fractions, X_{TSS} was considered as the sum of all particulate compounds (X_{ALG} , X_I , and X_{PP-ALG} , Eq. 6.2) and X_{VSS} was the sum of X_{ALG} and X_I (Eq. 6.3). The modeled and experimental data were thus compared through X_{TSS} and X_{VSS} . It should be noted that these components are not included in the stoichiometric matrix, but the model computes them from the sum of the components as described above.

$$X_{TSS} = X_{PP-ALG} \cdot i_{TSS,XPP-ALG} + X_{ALG} \cdot i_{TSS,ALG} + X_I \cdot i_{TSS,XI} + X_{NVSS} \quad (\text{Eq. 6.2})$$

$$X_{VSS} = X_{ALG} \cdot i_{TSS,ALG} + X_I \cdot i_{TSS,XI} \quad (\text{Eq. 6.3})$$

where X_{TSS} is the total suspended solids concentration [g TSS·m⁻³], X_{ALG} is the microalgae biomass [g COD·m⁻³], X_I is the inert particulate organic matter [g COD·m⁻³], X_{NVSS} is the influent non-volatile suspended solids [g TSS·m⁻³], and $i_{TSS,XPP-ALG}$ [g TSS·g P⁻¹], $i_{TSS,XALG}$ [g TSS·g COD⁻¹] and $i_{TSS,XI}$ [g TSS·g COD⁻¹] are TSS contained in X_{PP-ALG} , X_{ALG} and X_I , respectively. Conversion factors, $i_{TSS,XPP-ALG}$ and $i_{TSS,XALG}$ were calculated from the stoichiometry, C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P (Oswald, 1988), while $i_{TSS,XI}$ was set to fit the TSS modeled with experimental data.

Intracellular phosphorus concentration can be quantified by different analytical methods, but these are complicated, time consuming and require many reagents. Total suspended phosphorus was proposed as an indirect measure of X_{PP-ALG} , as it comprises all suspended phosphorus fractions, including both suspended organic phosphorus and X_{PP-ALG} as well as adsorbed and precipitated phosphorus. The comparison and validation of the experimental and simulated results were thus performed from the total suspended phosphorus concentrations: X_P [g P·m⁻³]. As with the suspended solid components, X_P was not included in the stoichiometric matrix, but was obtained from the sum of all the suspended phosphorus fractions included in the model, i.e., X_{PP-ALG} and the phosphorus content of the particulate components (Eq. 6.4).

$$X_P = X_{PP-ALG} + X_{ALG} \cdot i_{P,ALG} + X_I \cdot i_{P,XI} \quad (\text{Eq. 6.4})$$

where X_P is the total suspended phosphorus concentration [$\text{g P} \cdot \text{m}^{-3}$], X_{ALG} is the microalgae biomass [$\text{g COD} \cdot \text{m}^{-3}$], X_I is the inert particulate organic matter [$\text{g COD} \cdot \text{m}^{-3}$] and $i_{P,ALG}$ [$\text{g P} \cdot \text{g COD}^{-1}$] and $i_{P,XI}$ [$\text{g P} \cdot \text{g COD}^{-1}$] are phosphorus content in X_{ALG} and X_I , respectively. Conversion factor, $i_{P,ALG}$ was calculated from the stoichiometry, $\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$ (Oswald, 1988), while $i_{P,XI}$ was set to fit X_P modeled with experimental data.

The stoichiometric parameters values are shown in supplementary material (APPENDIX A).

2.4. Effects of light intensity, pH and temperature

Fluctuations in environmental parameters affect processes related to microalgae metabolism and gas stripping. The main environmental parameters considered in this model are light intensity, pH and temperature.

- **Light intensity (I) [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$].** Light intensity is measured as photosynthetically active radiation (PAR), which is responsible for providing energy for light-reactions and comprises wavelengths in the range of 400 to 700 nm. The light factor (f_L) plays a key role in photosynthetic organisms, becoming one of the most important parameters in modeling microalgae processes. Steele's Equation was used to model f_L (Eq. 6.5) since it is the most straightforward model that considers microalgae photoinhibition and is suitable for modeling microalgae growth in shallow photobioreactors (Steele, 1965):

$$f_L = \frac{I_{av}}{I_{opt}} \cdot e^{\left(1 - \frac{I_{av}}{I_{opt}}\right)} \quad (\text{Eq. 6.5})$$

where I_{opt} [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] is the optimal light intensity for microalgae growth and I_{av} [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] is the average light intensity.

I_{av} [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] is obtained using Lambert-Beer's Law and is attenuated by X_{TSS} [$\text{g TSS} \cdot \text{m}^{-3}$] and depth (d [m]) of photobioreactors (Eq. 6.6):

$$I_{av} = \frac{I_{0,s} \cdot (1 - e^{-(k_w + k_b \cdot X_{TSS}) \cdot d})}{(k_w + k_b \cdot X_{TSS}) \cdot d} \quad (\text{Eq. 6.6})$$

where $I_{0,s}$ [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] is the incident light intensity and k_w [m^{-1}] and k_b [$\text{m}^2 \cdot \text{g TSS}^{-1}$] are the extinction coefficient associated to water and particulate components respectively.

- **pH.** pH of the medium is obtained from mass-balance for S_H . MINTEQA2 software was used for pH calculation and species equilibrium. The effect of pH on biokinetics was modeled by a pH factor (f_{pH}) resulting from the combination of a Monod and non-competitive inhibition switching functions (Serralta et al., 2004) (Eq. 6.7):

$$f_{\text{pH}} = \frac{\frac{S_H}{S_H + K_{S,H}} \cdot \frac{K_{I,H}}{S_H + K_{I,H}}}{\frac{S_{H,\text{opt}}}{S_{H,\text{opt}} + K_{S,H}} \cdot \frac{K_{I,H}}{S_{H,\text{opt}} + K_{I,H}}} \quad (\text{Eq. 6.7})$$

where S_H represents free proton concentration, $K_{S,H}$ and $K_{I,H}$ the half-saturation and inhibition parameters for S_H [$\text{mol H}^+ \text{L}^{-1}$], and $S_{H,\text{opt}}$ represents the optimum S_H concentration obtained as $\sqrt{K_{I,H} \cdot K_{S,H}}$. This last factor is used to remove pH inhibition under optimal pH conditions.

- **Temperature** [$^{\circ}\text{C}$]. The dependence of biokinetics on water temperature was modeled by a Ratkowsky thermic factor (f_T) (Eq. 6.8):

$$f_T = (b \cdot (T_0 - T_{\text{MIN}}))^2 \cdot (1 - e^{c \cdot (T_0 - T_{\text{MAX}})}) \quad (\text{Eq. 6.8})$$

where T_0 [$^{\circ}\text{C}$] is the temperature of culture medium, T_{MIN} [$^{\circ}\text{C}$] is the lowest temperature limit for growth and below which the expected growth rate is zero, b is a parameter of the model that is defined as the square root regression coefficient of the rate versus the suboptimal temperature, T_{MAX} [$^{\circ}\text{C}$] is the upper temperature limit above which the expected growth rate is zero, c is a parameter

that enables the model to fit data at a temperature near and above the optimal temperature for growth.

2.5. Kinetic processes

The proposed model considers 8 biological and 3 physical kinetically-governed processes which are listed in Table 6.1 and described below.

2.5.1. Microalgae growth

Two different scenarios related to microalgae growth were considered in the model: phosphorus-replete medium and phosphorus-deplete medium.

- In a phosphorus-replete medium, microalgae uptake inorganic phosphate from the culture medium as a source of phosphorus along with inorganic carbon and inorganic nitrogen. The growth rate of microalgae was modeled as the product of the biomass concentration at that time (X_{ALG}), maximum specific growth rate (μ_{ALG}), environmental correction factors (f_L , f_{pH} and f_T) and the Monod functions, which introduce phosphate, ammonium/ammonia and inorganic carbon as limiting factors (Process 1 in Table 6.1). As it is assumed that microalgae can grow with both ammonium/ammonia and nitrate as a nitrogen source (Eze et al., 2018; Wang et al., 2017), two different processes were defined according to the nitrogen source (Processes 1 and 2 in Table 6.1). However, it should be noted that when ammonium/ammonia and nitrate are both present in the culture medium, ammonium/ammonia is generally preferred by microalgae. To represent this phenomenon a non-competitive inhibition function for S_{NHX} is introduced when nitrate is the nitrogen source for microalgae growth (Process 2 in Table 6.1). González-Camejo et al. (2019a) and Shoener et al. (2019) observed that microalgae uptake nitrate at a lower rate than ammonium, since it has to be intracellularly reduced to ammonium before being assimilated and incorporated into the cellular matter. The rate for microalgae growth with nitrate is therefore reduced by the factor η_{NO3} .

- In a phosphorus-deplete medium, the biokinetics proposed for microalgae growth is akin to Processes 1 and 2, described above (microalgae growth in a phosphorus-replete medium). The main difference is that under these conditions, polyphosphate supplies a phosphorus source for the microalgae growth, while phosphate uptake ceases (Processes 3 and 4 in Table 6.1). The saturation parameter $K_{XPP-ALG}$ indicates cell internal properties of microalgae, while X_{PP-ALG}/X_{ALG} stands for the maximum possible X_{PP-ALG} content of microalgae, X_{ALG} . In the study conducted by Ruiz-Martínez et al. (2014), nitrogen removal rate in a phosphorus-deplete medium was significantly lower than in a culture medium with available inorganic phosphorus. Specific saturation parameters K_{NHX} and $K_{NHX-qXPP}$ were included to represent the effect of the phosphorus source on the nitrogen removal rate (S_{PO4} or X_{PP-ALG} , respectively).

2.5.2. Storage of intracellular phosphorus

The storage of intracellular phosphorus as X_{PP-ALG} in microalgae cell is represented through Process 5 in Table 6.1. The rate of this phosphorus uptake process was modeled as a result of the product of microalgae biomass concentration, X_{ALG} , at that time, the rate constant for storage of X_{PP-ALG} (q_{PP}), the environmental correction factors (f_L , f_{pH} and f_T) and the Monod functions, which introduce phosphate, magnesium and potassium limitations. The influence of X_{PP-ALG} on the phosphorus uptake process was modeled by the Hill Equation (Eq. 6.9):

$$\frac{K_{XPP-qXPP}^n}{K_{XPP-qXPP}^n + \left(\frac{X_{PP-A}}{X_{ALG}}\right)^n} \quad (\text{Eq. 6.9})$$

where X_{PP-ALG}/X_{ALG} is the intracellular stored polyphosphate in $\text{g P} \cdot \text{g TSS}^{-1}$, $K_{XPP-qXPP}$ is the half saturation parameter of X_{PP-ALG}/X_{ALG} in the storage X_{PP-ALG} process in $\text{g P} \cdot \text{g TSS}^{-1}$ and n is the Hill number or the regulation coefficient. The Hill Equation was previously used to successfully reproduce the influence of X_{PP-ALG} content on phosphorus uptake rate by Ruiz-Martínez et al. (2015a).

2.5.3. Microalgae endogenous respiration

The rate of the Process 6 in Table 6.1 is expressed as the product of microalgae biomass concentration, X_{ALG} at that time by the maximum inactivation rate ($b_{ALG,1}$) and by the thermic factor, f_T (as used for microalgae growth).

2.5.4. Microalgae lysis

The rate of microalgae lysis (Process 7 in Table 6.1) was modeled as the product between microalgae biomass concentration, X_{ALG} at that time, the maximum decay rate ($b_{ALG,2}$) and the thermic factor f_T applied in the rest of the processes described above. When microalgae die, the components that make up their cell membrane are degraded, causing the expulsion of all internal compounds (S_S and S_I) to the external environment (complete and direct hydrolysis of the biodegradable particulate organics is assumed). In this process, intracellular polyphosphates are dissolved forming soluble phosphates. The proposed model assumes that lysis of microalgae and polyphosphates occurs at the same rate, $b_{ALG,2}$. As both, microalgae and polyphosphates lysis depend on the temperature, the thermic factor, f_T , must be applied to both processes.

2.5.5. Lysis of intracellular phosphorus

Since the storage product X_{PP-ALG} is accounted for separately from X_{ALG} , this component must be subject to a separate decay process. In the proposed model it was assumed that composition of photosynthetic organisms does not change due to microalgae decay, so that the rate constants for X_{ALG} and X_{PP-ALG} are equal. Process 8 in Table 6.1 is described in the same way as the X_{ALG} lysis process using the concentration of X_{PP-ALG} and the same decay rate, $b_{ALG,2}$ and f_T .

2.5.6. Gas transfer

Gas-liquid transfer is included through stripping carbon dioxide, oxygen and free ammonia, which correspond to Processes 9, 10 and 11, respectively. Stripping process were included in the model by the general equation (Eq. 6.10):

$$K_{La,j} \cdot (S_j - S_j^*) \quad (\text{Eq. 6.10})$$

where $K_{La,j}$ is the surface mass transfer coefficient of the gas j gas (d^{-1}), S_j is the j gas concentration in liquid phase ($g\ m^{-3}$) and S_j^* is the saturation concentration of j gas in the liquid phase ($g\ m^{-3}$).

Table 6.1. Kinetics of the processes included in the model.

Processes	Processes rate [M·L ⁻³ ·T ⁻¹]
1. X _{ALG} growth on S _{NHX} and S _{PO4}	$\mu_{ALG} \cdot \frac{S_{Ig,C}}{K_{Ig,C} + S_{Ig,C}} \cdot \frac{S_{NHX}}{K_{NHX} + S_{NHX}} \cdot \frac{S_{PO4}}{K_{PO4} + S_{PO4}} \cdot X_{ALG} \cdot f_L \cdot f_{pH} \cdot f_T$
2. X _{ALG} growth on S _{NO3} and S _{PO4}	$\mu_{ALG} \cdot \eta_{NO3} \cdot \frac{S_{Ig,C}}{K_{Ig,C} + S_{Ig,C}} \cdot \frac{K_{NHX}}{K_{NHX} + S_{NHX}} \cdot \frac{S_{NO3}}{K_{NO3} + S_{NO3}} \cdot \frac{S_{PO4}}{K_{PO4} + S_{PO4}} \cdot X_{ALG} \cdot f_L \cdot f_{pH} \cdot f_T$
3. X _{ALG} growth on S _{NHX} and X _{PP-ALG}	$\mu_{ALG} \cdot \frac{S_{Ig,C}}{K_{Ig,C} + S_{Ig,C}} \cdot \frac{S_{NHX}}{K_{NHX-qXPP} + S_{NHX}} \cdot \frac{K_{I,PO4}}{K_{I,PO4} + S_{PO4}} \cdot \frac{\frac{X_{PP-ALG}}{X_{ALG}}}{K_{XPP-ALG} + \frac{X_{PP-ALG}}{X_{ALG}}} \cdot X_{ALG} \cdot f_L \cdot f_{pH} \cdot f_T$
4. X _{ALG} growth on S _{NO3} on X _{PP-ALG}	$\mu_{ALG} \cdot \eta_{NO3} \cdot \frac{S_{Ig,C}}{K_{Ig,C} + S_{Ig,C}} \cdot \frac{K_{NHX}}{K_{NHX-qXPP} + S_{NHX}} \cdot \frac{S_{NO3}}{K_{NO3} + S_{NO3}} \cdot \frac{K_{I,PO4}}{K_{I,PO4} + S_{PO4}} \cdot \frac{\frac{X_{PP-ALG}}{X_{ALG}}}{K_{XPP-ALG} + \frac{X_{PP-ALG}}{X_{ALG}}} \cdot X_{ALG} \cdot f_L \cdot f_{pH} \cdot f_T$
5. X _{PP-ALG} storage	$q_{PP-ALG} \cdot \frac{S_{PO4}}{K_{PO4} + S_{PO4}} \cdot \frac{S_{Mg}}{K_{Mg} + S_{Mg}} \cdot \frac{S_K}{K_K + S_K} \cdot \frac{K_{XPP-qXPP}^n}{K_{XPP-qXPP}^n + \left(\frac{X_{PP-ALG}}{X_{ALG}}\right)^n} \cdot X_{ALG} \cdot f_L \cdot f_{pH} \cdot f_T$
6. X _{ALG} endogenous respiration	$b_{ALG,1} \cdot X_{ALG} \cdot f_T$
7. X _{ALG} lysis	$b_{ALG,2} \cdot X_{ALG} \cdot f_T$
8. X _{PP-ALG} lysis	$b_{ALG,2} \cdot X_{PP-ALG} \cdot f_T$
9. S _[CO2] stripping	$K_{La,CO2} \cdot (S_{[CO2]} - S_{[CO2]}^*)$
10. S _{O2} stripping	$K_{La,O2} \cdot (S_{O2} - S_{O2}^*)$
11. S _[NH3] stripping	$K_{La,NH3} \cdot (S_{[NH3]} - S_{[NH3]}^*)$

2.6. Stoichiometry and parameter values

The simplified stoichiometry matrix is shown in Table 6.2. The stoichiometry matrix and the conversion factors to be applied to the 7 continuity equations in the model are provided as supplementary material (APPENDIX A). Also provided as supplementary material are the mathematical expressions of the stoichiometric coefficients for each process and values of chemical, physical and biokinetic parameters along with the values of the carbon, oxygen, nitrogen, phosphorus, magnesium and potassium fractions in the microalgae. The production rate of each component (r_i) in all processes was computed from Eq. 6.11:

$$r_i = \sum v_{ji} \cdot \rho_j \quad (\text{Eq. 6.11})$$

where i is the component considered and j is the transformation process; v_{ji} is the stoichiometric coefficient and ρ_j is the process rate for each process j (supplementary material of APPENDIX A).

Table 6.2. Stoichiometry of the processes considered in the microalgae model.

Components → i	S _{O2}	S _{NHX}	S _{NO3}	S _{PO4}	S _{Ig,C}	S _H	S _{Mg}	S _K	S _S	S _I	X _{ALG}	X _I	X _{PP-ALG}
Processes ↓ j	g O ₂ ·m ⁻³	g N·m ⁻³	g N·m ⁻³	g P·m ⁻³	mol·C m ⁻³	mol·H m ⁻³	g Mg·m ⁻³	g K·m ⁻³	g COD·m ⁻³	g COD·m ⁻³	g COD·m ⁻³	g COD·m ⁻³	g P·m ⁻³
1. X _{ALG} growth on S _{NHX} and S _{PO4}	1	-i _{N,ALG}		-i _{P,ALG}	v _{5,1}	v _{6,1}					1		
2. X _{ALG} growth on S _{NO3} and S _{PO4}	v _{1,2}		-i _{N,ALG}	-i _{P,ALG}	v _{5,2}	v _{6,2}					1		
3. X _{ALG} growth on S _{NHX} and X _{PP-ALG}	1	-i _{N,ALG}			v _{5,3}	v _{6,3}	v _{7,3}	v _{8,3}			1		-i _{P,ALG}
4. X _{ALG} growth on S _{NO3} on X _{PP-ALG}	v _{1,4}		-i _{N,ALG}		v _{5,4}	v _{6,4}	v _{7,4}	v _{8,4}			1		-i _{P,ALG}
5. X _{PP-ALG} storage				-1		v _{6,5}	-i _{Mg,XPPALG}	-i _{K,XPPALG}					1
6. X _{ALG} endogenous respiration	-1	i _{N,ALG}		i _{P,ALG}	v _{5,6}	v _{6,6}					-1		
7. X _{ALG} lysis		v _{2,7}		v _{4,7}	v _{5,7}	v _{6,7}			v _{9,7}	f _{SI}	-1	f _{XI}	
8. X _{PP-ALG} lysis				1		v _{6,8}	i _{Mg,XPPALG}	i _{K,XPPALG}					-1
9. S _[CO2] stripping					v _{5,9}	v _{6,9}							
10. S _{O2} stripping	-1												
11. S _[NH3] stripping		-1											

3. EXPERIMENTAL SETUP

3.1. MPBR pilot plant

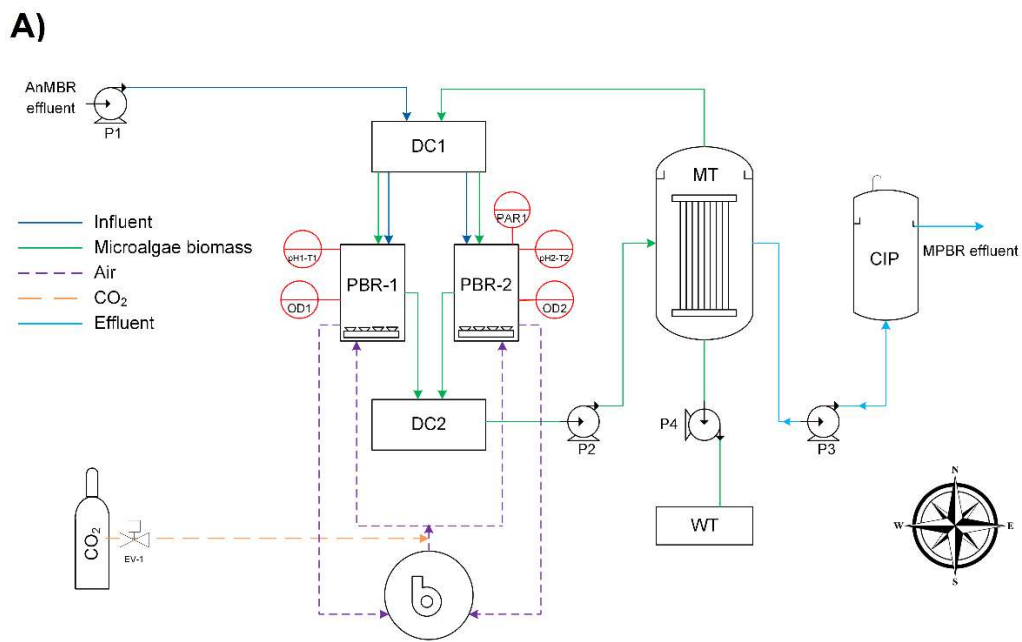
The model was calibrated and validated using data gathered from an outdoor MPBR pilot plant at the “Carraixet” WWTP (39°30′04.0″N 0°20′00.1″W, Valencia, Spain) fed with effluent from an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) pilot plant in the WWTP. The AnMBR effluent consisted of a nutrient-rich permeate with a negligible concentration of suspended solids and biodegradable organic matter ($0 \text{ g TSS}\cdot\text{m}^{-3}$ and $14 \pm 4 \text{ g BOD}\cdot\text{m}^{-3}$, respectively) making it a suitable culture medium for microalgae growth and limiting the development of heterotrophic bacteria populations. Nitrifying bacteria were inhibited keeping a constant concentration of 5 ppm of allylthiourea (ATU). As a result, a biological culture dominated by eukaryotic microalgae was developed in the MPBR system, the only ones involved in the biological processes, thus simplifying the calibration and validation process of the microalgae model. Further details on the AnMBR plant can be found in Seco et al. (2018).

The MPBR plant mainly consisted of two flat-panel photobioreactors (PBRs) connected to one membrane tank (MT) (Figure 6.2). The influent is fed into the MPBR pilot plant by a centrifugal pump (P1 in Figure 6.2) and mixed with microalgal culture in a distribution chamber (DC1) to be fed the PBRs by gravity. The microalgae culture from the PBRs then falls into a second distribution chamber (DC2), from where it is pumped to the MT. The microalgae culture is recirculated from MT to the PBRs by a progressing cavity pump (P2). Permeate is obtained from the MT from a rotary lobe vacuum pump (P3) and stored in the clean-in-place (CIP) tank. The BRT is controlled by extracting a specific volume of the microalgal culture from the MT to a waste tank (WT) with a centrifugal pump (P4). Further details on the MPBT pilot plant can be found in Viruela et al. (2018). The PBRs had a sun-exposed surface area of 2.3 m^2 ($1.15 \times 2 \text{ m}$). Two periods were considered according to the PBR width. In Period 1 (December 2016 through August 2017), 0.25-m width PBRs with a working volume of 0.550 m^3 were operated, while 0.10-m width PBRs with a working volume of 0.220 m^3 were operated during Period 2 (November 2017 through May 2018). Comparison of the periods enabled the effect of available light intensity on microalgae yield and nutrient removal to be calibrated. The PBRs were continuously air-stirred for mixing the culture medium and

keeping oxygen concentration near saturation, avoiding possible inhibition of microalgae growth due to a high oxygen concentration.

The total working volume of the MT was 14 L with a filtration area of 3.4 m² and included one commercial ultrafiltration hollow-fiber membrane system (PURON[®] Koch Membrane Systems (PUR-PSH31), 0.03 µm pores). Air-sparging was used for membrane scouring to reduce membrane fouling. PBR and MT stirring conditions have a remarkable effect on K_{La} coefficient and thus on gas stripping. Pure CO₂ was injected into the air system to set pH at 7.5 and ensure culture conditions rich in inorganic carbon. Uncontrolled phosphorus precipitation and free ammonia stripping were effectively reduced. A temperature control system was implemented consisting of a cooling device equipped with a thermostat (Daikin R410A inverter). The set point temperature was 20°C. The cooled fluid was supplied to the MPBR plant through a 20-m long spiral tube immersed in the PBRs.

Online sensors were installed in the MPBR plant to obtain real-time information on the process performance. One pH sensor (pHD sc DPD1R1, Hach Lange) and one dissolved oxygen-temperature sensor (LDO Hach Lange) in each PBR. A light irradiance sensor (Apogee Quantum SQ-200) was set up on the surface of the PBRs to monitor and measure the PAR. Besides sunlight, PBRs were constantly lit by twelve LED lamps (Unique Led IP65 WS-TP4S-40W-ME) placed on the back of the PBRs, providing a continuous light irradiation of 300 µmol·m⁻²·s⁻¹ (measured on the PBR surface).



B)



Figure 6.2. (A) Flow diagram of the MPBR pilot plant. Nomenclature: P: pump; DC: distribution chamber; PBR: photobioreactor; C: compressor; MT: membrane tank; WT: waste tank; and CIP: clean-in-place. (B) General view of the MPBR pilot plant.

3.2. MPBR plant operation

The pilot-scale MPBR plant was continuously operated for 3 years and was fed with effluent from the AnMBR plant. The experimental phase was divided into Periods 1 and 2 according to PBR width, as mentioned in Section 3.1. Four operating periods were selected to cover different environmental and operational conditions in both periods: P1_1 (from 2nd December, 2016 to 20th December, 2016) and P1_2 (from 28th July, 2017 to 11th August, 2017) for Period 1, with P2_1 (from 30th November, 2017 to 20th December, 2017) and P2_2 (from 26th April, 2018 to 9th May, 2018) for Period 2. The average characterization of the influent and environmental and operational conditions during the four periods are shown in Table 6.3. The four periods covered a wide range of environmental and operational parameters: available light intensity (PAR registered), temperature, BRT, HRT and both P-replete and P-deplete culture conditions. Period P1_1, with a 0.25-m width PBR, was selected due to drops in light intensity and to analyze the modeling response to operational changes, including an increase in HRT from 2.48 ± 0.05 to 4.4 ± 0.5 days. Period P1_2 was selected because light intensity and operating temperature remained virtually constant ($259 \pm 48 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and $27 \pm 2^\circ\text{C}$, respectively), in contrast to P1_1. Because of an operating error in the MPBR pilot plant, a sharp increase in the volume of wasting was recorded, changing the dynamics of some components during P1_2. As in P1_1, in P2_1 the PBRs were exposed to periods of reduced light intensity, but the main difference between both periods was the PBR width. In P1_1, this was 0.25 m, while in P2_1 it was 0.10 m. This difference in width allowed us to analyze the effect of parameter k_b (attenuation coefficient due to particulate components) on the modeling response. The main feature of this model was the differentiation of the two metabolic phosphorus consumption pathways, depending on the availability of S_{PO_4} in the culture medium. Period P2_2, with a negligible S_{PO_4} concentration, was therefore selected to analyze the processes of $X_{\text{PP-ALG}}$ accumulation and microalgae growth with $X_{\text{PP-ALG}}$.

Table 6.3. Average characteristics of the influent and environmental and operational conditions of the periods selected.

Parameter		P1_1	P1_2	P2_1	P2_2
S_{NHX}	$g\ N \cdot m^{-3}$	69 ± 8	55 ± 7	46 ± 10	48 ± 12
S_{PO4}	$g\ P \cdot m^{-3}$	6.3 ± 1.4	6.8 ± 0.7	7 ± 2	2.8 ± 0.6
S_{NO3}	$g\ N \cdot m^{-3}$	0.3 ± 0.2	0.61 ± 0.10	0.7 ± 0.5	0.40 ± 0.12
S_s	$g\ COD \cdot m^{-3}$	negligible	negligible	negligible	negligible
S_I	$g\ COD \cdot m^{-3}$	40 ± 15	32 ± 8	40 ± 5	42 ± 12
X_{TSS}	$g\ TSS \cdot m^{-3}$	negligible	negligible	negligible	negligible
PBRs width	m	0.25	0.25	0.10	0.10
HRT	d	$2.48 \pm 0.05^*$	2.0 ± 0.3	1.46 ± 0.34	1.51 ± 0.04
BRT	d	4.4 ± 0.5	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.3	3.0 ± 0.2
T_{MIN}	°C	24.8	23.9	19.7	23.2
T_{MAX}	°C	28.1	32.1	26.3	24.3
PAR_{MIN}	$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	67	112	10	284
PAR_{MAX}	$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	394	289	406	394

3.3. Analytical methods

Besides the information provided by the online sensors, samples were taken from influent, effluent, and microalgae culture. The streams were sampled in duplicate three times a week to monitor MPBR plant performance. Ammonium (NH_4^+), nitrate (NO_3^-), phosphate (PO_4^{3-}), TSS and VSS were determined according to the Standard Methods (APHA, 2005), 4500-NH3-G, 4500-NO3-H, 4500-P-F, 2540-TSS-D and 2540-VSS-E respectively. Total nitrogen (N_T) concentration of microalgae culture was measured by a commercial total nitrogen test kit (1.14537.001, Merck Millipore). Microalgae sample was digested at 150°C for 2 hours, followed by PO_4^{3-} determination, 4500-P-F according to the Standard Methods, to quantify total phosphorus (P_T) concentration. Soluble organic matter was estimated once a week in duplicate through soluble chemical oxygen demand

(CODs) and soluble biological oxygen demand (BODs) according to Standard Methods (APHA, 2005) 5220-COD-D and 5210-BOD-C respectively.

4. MODEL SETUP

The model was run on MATLAB[®]. The PBRs were considered as completely stirred tanks, assuming a perfect mixture. The MPBR plant was operated in a continuous regime, and the recorded influent dynamics, effluent (membrane permeate) and MPBR waste were considered. The initial component concentrations used to run the model were those of the experimental data from the MPBR and varied according to the different data sets validated.

4.1. Model Calibration

Dynamic calibration of the model was performed with experimental data from the pilot-scale MPBR plant. Manual adjustment of the parameters by trial and error was used to match the measured data as closely as possible by means of graphical representations. Morris's Sensitivity Analysis (Ruano et al., 2011) was used to screen out parameters having the greatest influence on the model response (data not shown). The most influential parameters in the model were: maximum growth rate of X_{ALG} (μ_{ALG}), maximum decay rate of X_{ALG} ($b_{ALG,2}$), rate constant for storage of X_{PP-ALG} (q_{XPP}), half saturation parameter for S_{NHX} in a phosphorus-replete medium (K_{NHX}), half saturation parameter for S_{NHX} in a phosphorus-deplete medium ($K_{NHX-qXPP}$), half saturation parameter for S_{PO4} (K_{PO4}), inhibition parameter for X_{PP-ALG} use in a phosphorus-replete medium ($K_{I,PO4}$), maximum and minimum temperature for microalgae growth (T_{MAX} and T_{MIN} , respectively), optimal light intensity for X_{ALG} growth (I_{OPT}), attenuation coefficient due to particulate components (k_b) and mass transfer coefficient for oxygen, dioxide carbon and free ammonia ($K_{La,O2}$, $K_{La,CO2}$ and $K_{La,NH3}$, respectively). Calibration was by comparing the modeled and experimental data curves.

The mass transfer coefficient for dissolved oxygen, carbon dioxide and free ammonia, was calculated from Eq. 6.12:

$$K_{La,j} = k \cdot \left(\frac{Q_g}{V_L} \right)^r \quad (\text{Eq. 6.12})$$

where $K_{La,j}$ is the mass-transfer coefficient of the gas j (h^{-1}); Q_g is the gas flow rate ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$); V_L is the liquid volume (L); r and k are constants of equation.

Calibration of mass transfer coefficient was performed through the variation of constants r and k , since Q_g and V_L are fixed by PBR operation.

4.2. Model Validation

The Four periods described in Section 3.2 (P1_1, P1_2, P2_1 and P2_2) were selected for model validation. The data collected covered a wide range of environmental and operational parameters (Table 6.3): periods with different HRT and BRT; different operational conditions; and both phosphorus-replete medium and phosphorus-deplete mediums were considered. Although it was intended to control the culture temperature, the ever-changing environmental conditions resulted in temperature fluctuations in the PBRs (variations of up to 8°C). Likewise, fluctuations in PAR, with values of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and $406 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ over two consecutive days were also observed. Comparisons between Periods 1 and 2 enabled extending the range of available light intensity registered and validated (0.25-m and 0.10-m PBRs width). The selected data sets were simulated to verify that the calibrated parameters were able to reproduce the MPBR dynamics under changing environmental and operating conditions. The initial component concentrations in the PBRs at the beginning of the selected periods were used to run the simulations (Table 6.4).

Table 6.4. Initial concentrations of the components used for run validations procedure of selected periods.

Parameters		P1_1	P1_2	P2_1	P2_2
S_{O2}	g O₂ m⁻³	10	12	11	11
S_{NHX}	g N m⁻³	39	29	27	0.13
S_{NO3}	g N m⁻³	1.2	0.8	2	0.26
S_{PO4}	g P m⁻³	4	3	3	0.02
X_P	g P m⁻³	3.0	2.7	4.7	4.3
S_{Mg}	g Mg m⁻³	54	55	52	50
S_K	g K m⁻³	22	20	22	19
X_I	g COD m⁻³	10	10	10	10
X_{TSS}	g TSS m⁻³	208	282	888	724
S_S	g COD m⁻³	29	27	27	28
S_I	g COD m⁻³	44	40	41	42
S_{Ig,C}	g C m⁻³	35	40	33	38
S_H	mol H m⁻³	1.94E-08	2.02E-08	1.98E-08	1.92E-08

Calibration and validation steps were not performed against variation of dissolved oxygen and pH in the culture medium, since the dissolved oxygen was nearly at saturation concentration and pH kept constant at 7.5. The variations of these two variables resulting from microalgae metabolisms were therefore not registered.

5. RESULTS AND DISCUSSION

5.1. Model calibration

Table 6.5 collects the kinetic and stoichiometric parameters resulting from the model calibration. The calibrated value of μ_{ALG} obtained was 1.8 d^{-1} , which agrees with the values adopted in the literature (Reichert et al., 2001; Sánchez-Zurano et al., 2021a; Solimeno et al., 2015; Zambrano et al., 2016). The maximum decay rate of X_{ALG} ($b_{\text{ALG},2}$) in the literature ranges from 0.012 to 0.21 d^{-1} (Ruiz-Martínez et al., 2014; Wágner et al., 2016). As the calibrated value obtained was 0.15 d^{-1} , the kinetic parameter was within the variation range. The calibrated K_{NHX} value was 0.1 g N m^{-3} , which coincides with the value used by Reichert et al. (2001). As a result of the calibration, a value of K_{PO_4} of 0.05 g P m^{-3} was obtained, which is in the same order of magnitude as the K_{PO_4} obtained by Reichert et al. (2001). $q_{\text{XPP-ALG}}$, with a calibrated value of 0.01 d^{-1} , is in agreement with the EXPIM model (Singh et al., 2018). Ruiz-Martínez et al. (2014) observed that nitrogen uptake rate was higher in P-replete conditions than in P-deplete culture conditions, as the parameter $K_{\text{NHX-QPP}}$ (half saturation parameter for S_{NHX} in a phosphorus-deplete medium) was introduced to implement this approach. The calibrated value was $3 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-3}$. The results suggest that microalgae growing under P-deplete conditions have a higher value of $K_{\text{NHX-QPP}}$ than microalgae growing in a P-replete culture medium, K_{NHX} , which concurs with the observations made by Ruiz-Martínez et al. (2014). Environmental parameters T_{MAX} , T_{MIN} , I_{OPT} and k_b calibrated values were 40 and 0°C , $230 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and $0.025 \text{ m}^2 \cdot \text{g TSS}^{-1}$ respectively. Thermic parameters are within the range of values compiled by Bernard & Rémond (2012), while those associated with available light intensity are in the range cited in the literature (Barbera et al., 2020; Khalili et al., 2015; Ruiz-Martínez et al., 2014; Sánchez-Zurano et al., 2021b). The $K_{\text{L,PO}_4}$, r and k constants (constants of mass transfer coefficient) were introduced specifically for the proposed model, so that it was not possible to compare them with other studies.

Table 6.5. Values for the kinetic and physical parameters considered in the model.

Parameters	Description	Value	Unit	Source
μ_{ALG}	Maximum growth rate of X_{ALG}	1.8	d^{-1}	Calibrated
$b_{\text{ALG},1}$	Maximum inactivation rate of X_{ALG}	0.1	d^{-1}	(Reichert et al., 2001)
$b_{\text{ALG},2}$	Maximum decay rate of X_{ALG}	0.15	d^{-1}	Calibrated
q_{XPP}	Rate constant for storage of $X_{\text{PP-ALG}}$	0.01	d^{-1}	Calibrated
K_{O_2}	Half saturation parameter for S_{O_2}	0.2	$\text{g O}_2 \text{ m}^{-3}$	(Reichert et al., 2001)
$K_{\text{Ig,C}}$	Half saturation parameter for $S_{\text{Ig,C}}$	$4.32 \cdot 10^{-3}$	g C m^{-3}	(Solimeno et al., 2015)
K_{NHX}	Half saturation parameter for S_{NHX} in a phosphorus-replete medium	0.1	g N m^{-3}	Calibrated
$K_{\text{NHX-qXPP}}$	Half saturation parameter for S_{NHX} in a phosphorus-deplete medium	3	g N m^{-3}	Calibrated
K_{NO_3}	Half saturation parameter for S_{NO_3}	12.61	g N m^{-3}	(Wágner et al., 2016)
η_{NO_3}	Reduction factor for X_{ALG} growth of S_{NO_3}	0.59	–	(Eze et al., 2018)
K_{PO_4}	Half saturation parameter for S_{PO_4}	0.05	g P m^{-3}	Calibrated
$K_{\text{I,PO}_4}$	Inhibition parameter for $X_{\text{PP-ALG}}$ use in a phosphorus-replete medium	0.15	g P m^{-3}	Calibrated
K_{XPP}	Half saturation parameter of X_{ALG} growth for $X_{\text{PP-ALG}}$	0.0027	g P m^{-3}	(Ruiz-Martínez et al., 2014)
$K_{\text{XPP-qXPP}}$	Half saturation parameter of X_{PP} storage for $X_{\text{PP-ALG}}$	0.003	g P m^{-3}	(Ruiz-Martínez et al., 2015a)
n	Regulation coefficient or Hill number	0.006	–	(Ruiz-Martínez et al., 2015a)
K_{Mg}	Half saturation parameter for S_{Mg}	0.13	g Mg m^{-3}	(Sydney et al., 2010)
K_{K}	Half saturation parameter for S_{K}	8.78	g K m^{-3}	(Sydney et al., 2010)
T_{MIN}	Minimum temperature for microalgae growth	2	$^{\circ}\text{C}$	Calibrated
T_{MAX}	Maximum temperature for microalgae growth	40	$^{\circ}\text{C}$	Calibrated

Table 6.5 (Continued). Values for the kinetic and physical parameters considered in the model.

Parameters	Description	Value	Unit	Source
b	Intrinsic model parameter	87.13	–	Calibrated
c	Intrinsic model parameter	1.46	–	Calibrated
I_{OPT}	Optimal light intensity for X _{ALG} growth	230	μmol·m ⁻² ·s ⁻¹	Calibrated
k_w	Attenuation coefficient due to water	1.97	m ⁻¹	(Sun et al., 2016)
k_b	Attenuation coefficient due to particulate components	0.025	m ² g·TSS ⁻¹	Calibrated
K_{L,H}	Lower half saturation parameter for S _H	0.00001	mol H ⁺ ·L ⁻¹	(Siegrist et al., 1993)
K_{S,H}	Upper half saturation parameter for S _H	0.00063	mol H ⁺ ·L ⁻¹	(Siegrist et al., 1993)
S_{H,opt}	Optimal pH for X _{ALG} growth	7.50	pH	Calculated
K_{La,O2}	Mass transfer coefficient for oxygen	16.2	h ⁻¹	Calibrated
K_{La,CO2}	Mass transfer coefficient for dioxide carbon	16.2	h ⁻¹	Calibrated
K_{La,NH3}	Mass transfer coefficient for free ammonia	16.2	h ⁻¹	Calibrated
k	Constants of mass transfer coefficient equation	0.05	-	Calibrated
r	Constants of mass transfer coefficient equation	1	-	Calibrated

5.2. Model validation

To validate the behavior of the model in dynamic conditions, 4 operating periods were simulated in different environmental and operational conditions with the calibrated parameters provided in Table 6.5. Values for the chemical equilibrium, physical and stoichiometric parameters are supplied in the supplementary material (APPENDIX A). Figures 6.3, 6.4, 6.5 and 6.6 show the comparison between the experimental data (markers) and the model predictions (lines).

5.2.1. P1_1 validation

Figure 6.3 shows the simulation results for period P1_1 of the operation of a 0.25-m wide PBR at a constant temperature of $24.14 \pm 1.03^\circ\text{C}$. Figure 6.3A reproduces the dynamics of X_{TSS} and the operational BRT and HRT parameters. From the 6th day on, HRT was increased from 2.5 to 4.5 days, keeping BRT constant at 4.5 days (Figure 6.3A). The model was able to reproduce the X_{TSS} dynamics arising from operational changes with a good degree of accuracy. Figure 6.3B shows the measured X_{VSS} concentration and PAR evolution and the simulated X_{VSS} and X_{ALG} concentration. Simulated X_{VSS} also accurately matched the growth patterns from the experimental data. As can be seen in Figure 6.3B, 99.3% of the X_{VSS} was for microalgae biomass (X_{ALG}) and the remaining concentration was attributed to X_{I} . During this period, X_{ALG} decreased, following sharp drops in PAR on days 4, 5, 8, 9 and 10. High PAR and 5-days BRT resulted in an increase in microalgae biomass from day 11 onwards.

The modeled data followed the trend observed for S_{NH_4} , S_{NO_3} and S_{PO_4} measurements with a good degree of success (Figure 6.3C and Figure 6.3D). The simulated S_{NH_4} and S_{PO_4} curves fitted quite well the experimental concentration and presented a clear pattern of oscillation with lower values of both variables from day 11. According to the model structure, the resulting S_{NO_3} concentration in the PBR is related to the concentration in the MPBR influent and the consumption by microalgae as a nitrogen source. As mentioned above, MPBR influent was provided from an AnMBR plant and nitrate concentration was negligible, while nitrifying bacteria were inhibited with ATU. Variations in S_{NO_3} concentrations were thus not detected, as represented by the modeled period. It should be noted that in this period the discharged limits established for sensitive areas (according to the European Directive 91/271/CEE) were considerably exceeded.

X_{P} and $X_{\text{PP-ALG}}$ are represented in Figure 6.3E. Modeled X_{P} concentration fitted well with the experimental data. As expected, X_{P} followed the X_{TSS} and X_{VSS} trends, although the percentage of $X_{\text{PP-ALG}}$ in algal cells remained constant throughout the simulated period. This behavior can be explained by the fact that the model was structured on the premise that $X_{\text{PP-ALG}}$ would only be used in the absence of S_{PO_4} .

Modeled S_S and S_I concentrations fitted well with the experimental data (Figure 6.3F). Each component gradually increased throughout the simulated period. This could be related to an accumulation of organic compounds resulting from the lysis of X_{ALG} and the absence of heterotrophic organisms that consume biodegradable organic matter.

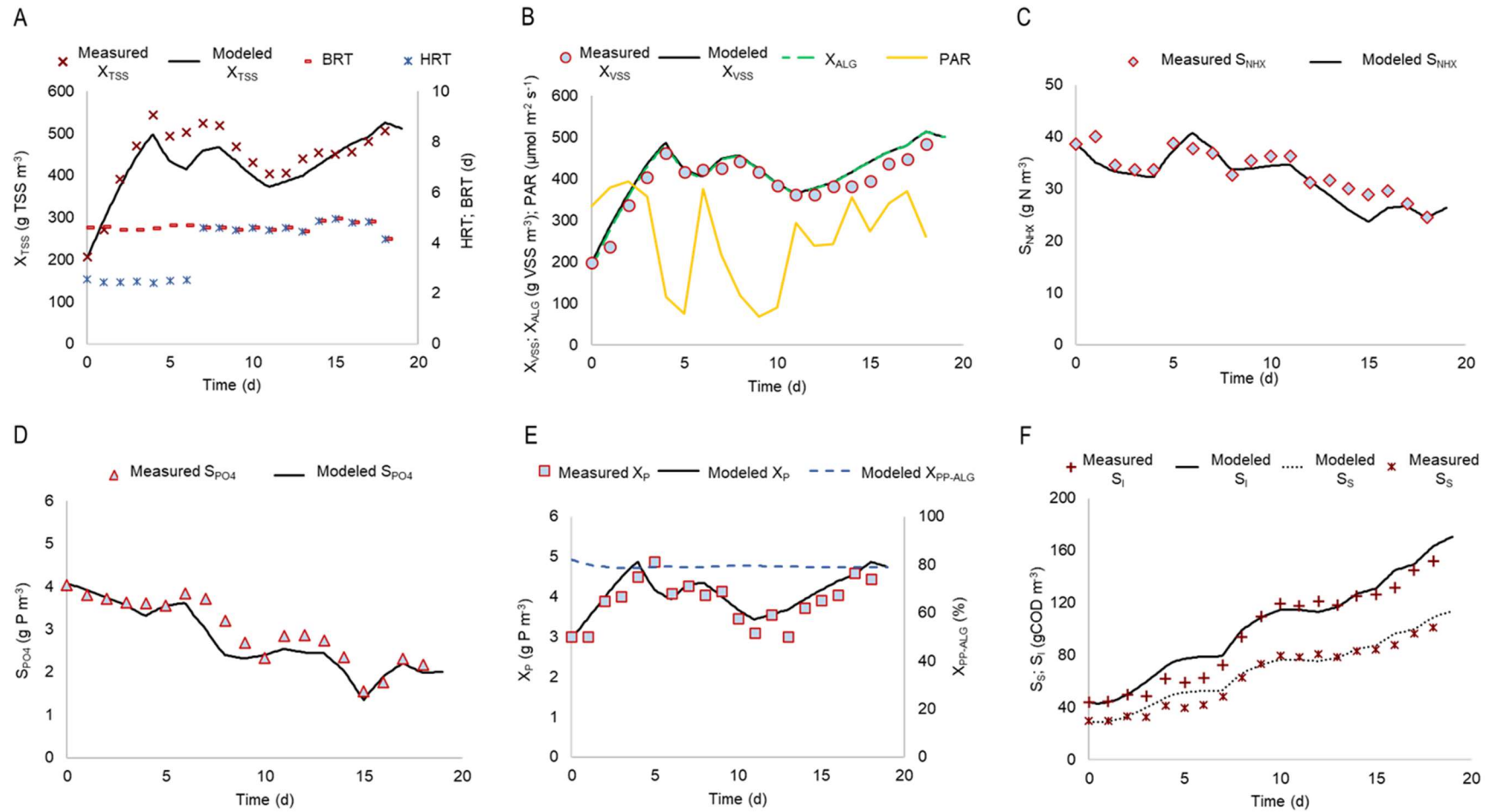


Figure 6.3. Dynamic simulation of P1_1. Evolution of: (A) X_{TSS} [g TSS·m⁻³], BRT and HRT [d]; (B) X_{VSS} and X_{ALG} [g VSS·m⁻³] and PAR [$\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]; (C) S_{NHX} concentration [g N·m⁻³] in the PBR culture medium; (D) S_{PO4} concentration [g P·m⁻³] in the PBR culture medium; (E) X_P [g P·m⁻³] and X_{PP-ALG} [% of average of X_P] and (F) S_S and S_I [g COD·m⁻³] concentrations in the PBR culture medium. Experimental and modeled data are represented by markers and lines, respectively.

5.2.2. P1_2 validation

Figure 6.4 shows the results of P1_2, during which light intensity ($259 \pm 48 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and operating temperature ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) remained virtually constant, while the volume of wasting increased due to an operational problem. The plant was operated at HRT and BRT of 2 and 3.5 days, respectively, and PBRs had a light width of 0.25 m. This period was chosen to analyze whether the model was capable of simulating operational disturbances, which would make it useful for decision-making. Figure 6.4A and Figure 6.4B show microalgae biomass growth by means of TSS and VSS. The model was indeed able to accurately reproduce this microalgae growth pattern. Due to an operational problem on day 9, wasting was three times the daily volume required to maintain the established retention times, and two days of operation in batch mode were necessary to achieve the X_{TSS} and X_{VSS} concentration before this operational disturbance. The model accurately represented the culture dynamics, showing that it could be used to predict the necessary steps to obtain a specific algae concentration as well as to evaluate different actions aimed at recovering process stability. The model estimated X_{ALG} , and X_{I} and the relative proportion of particulate components with respect to X_{VSS} . Most of the biomass concentration was microalgae (98.8%), while the remaining 1.2% was attributed to X_{I} . Although, average daily temperature fluctuated between 23.9 and 32.1°C (i.e. changes in temperature of about 8°C), no changes in X_{ALG} or X_{VSS} concentration were detected associated with thermal variations.

Figures 6.4C, 6.4D and 6.4E show the measured and simulated nutrient concentrations in the PBRs as well as the suspended phosphorus for X_{P} . The modeled nutrients concentration satisfactorily matched the trend of the experimental data. As this figure shows, inorganic nutrient concentrations did not comply with the discharge limits established by the European Directive 271/91/EEC, showing that the model could be used to predict long-term inorganic nutrient concentrations with different environmental factors and operating conditions to achieve the discharge limits specified in the E.U. Directive. Total suspended phosphorus (X_{P}) consisted of $78 \pm 2\%$ of polyphosphate ($X_{\text{PP-ALG}}$), remaining stable during the modeled period since P-deplete conditions were not produced.

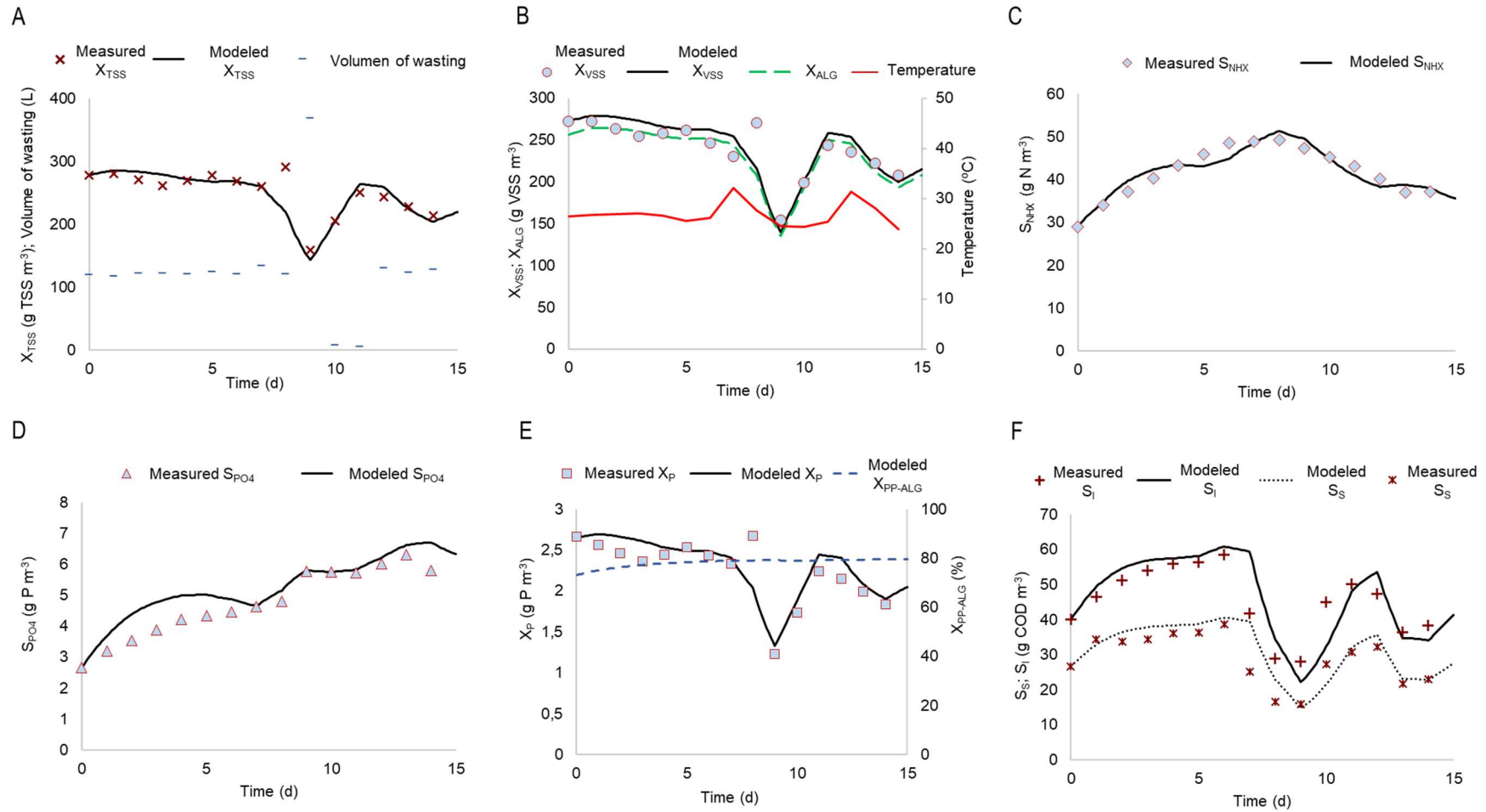


Figure 6.4. Dynamic simulation of P1_2. Evolution of: (A) X_{TSS} [g TSS \cdot m $^{-3}$] and volume of wasting [L]; (B) X_{VSS} and X_{ALG} [g VSS \cdot m $^{-3}$] and temperature [$^{\circ}C$]; (C) S_{NHX} [g N \cdot m $^{-3}$] in the PBR culture medium; (D) S_{PO4} concentration [g P \cdot m $^{-3}$] in the PBR culture medium; (E) X_P [g P \cdot m $^{-3}$] and X_{PP-ALG} [% in average of X_P] and (F) S_S and S_I [g COD \cdot m $^{-3}$] in the PBR culture medium. Experimental and modeled data are represented by markers and lines, respectively.

Figure 6.4F shows the evolution of soluble organic matter in the PBRs. In contrast to inorganic nutrients concentration, S_S and S_I fractions would be affected by the extra volume of wasting. The dynamics of the organic matter fraction linked to the volume of wasting was due to S_S and S_I being generated as a result of microalgae lysis. An increase in the volume of wasting thus implies a reactor dilution with the AnMBR effluent (with low organic matter content).

5.2.3. P2_1 validation

Figure 6.5 gives the simulation results of P2_1, simulating the operation of 0.10-m-wide PBRs at 1.46 ± 0.04 and 4.3 ± 0.3 days of HRT and BRT, respectively. Operating temperature remained almost constant ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) compared with the incident light intensity, which varied from average intensities of 10 to $406 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ due to weather conditions. As can be seen in Figures 6.5A and 6.5B, the model captured the dynamics of X_{TSS} and X_{VSS} even with drastic changes in light intensity. Figure 6.5B represents the predicted X_{ALG} concentration, which implied an average of 99.7% of X_{VSS} . Simulated X_{ALG} exhibited an oscillation pattern associated with natural light intensity. A gradual reduction in X_{ALG} concentration occurred on days 5, 6 and 10 in the period, but the relationship between light intensity and microalgae evolution became evident from day 16 onwards, when 4 continuous days of a light intensity below $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ implied a 19.5% reduction in algal biomass.

Figures 6.5C and 6.5D show the evolution of inorganic nutrients concentration during the experimental period. Once more, the modeled data matches the trend of experimental data with a good degree of accuracy. Overall, S_{NHX} concentration was below $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ during the first 15 days, although this concentration increased from day 16, mainly due to the reduction in recorded light intensity. Figure 6.5D shows how the model was able to represent the trend recorded for S_{PO4} quite well.

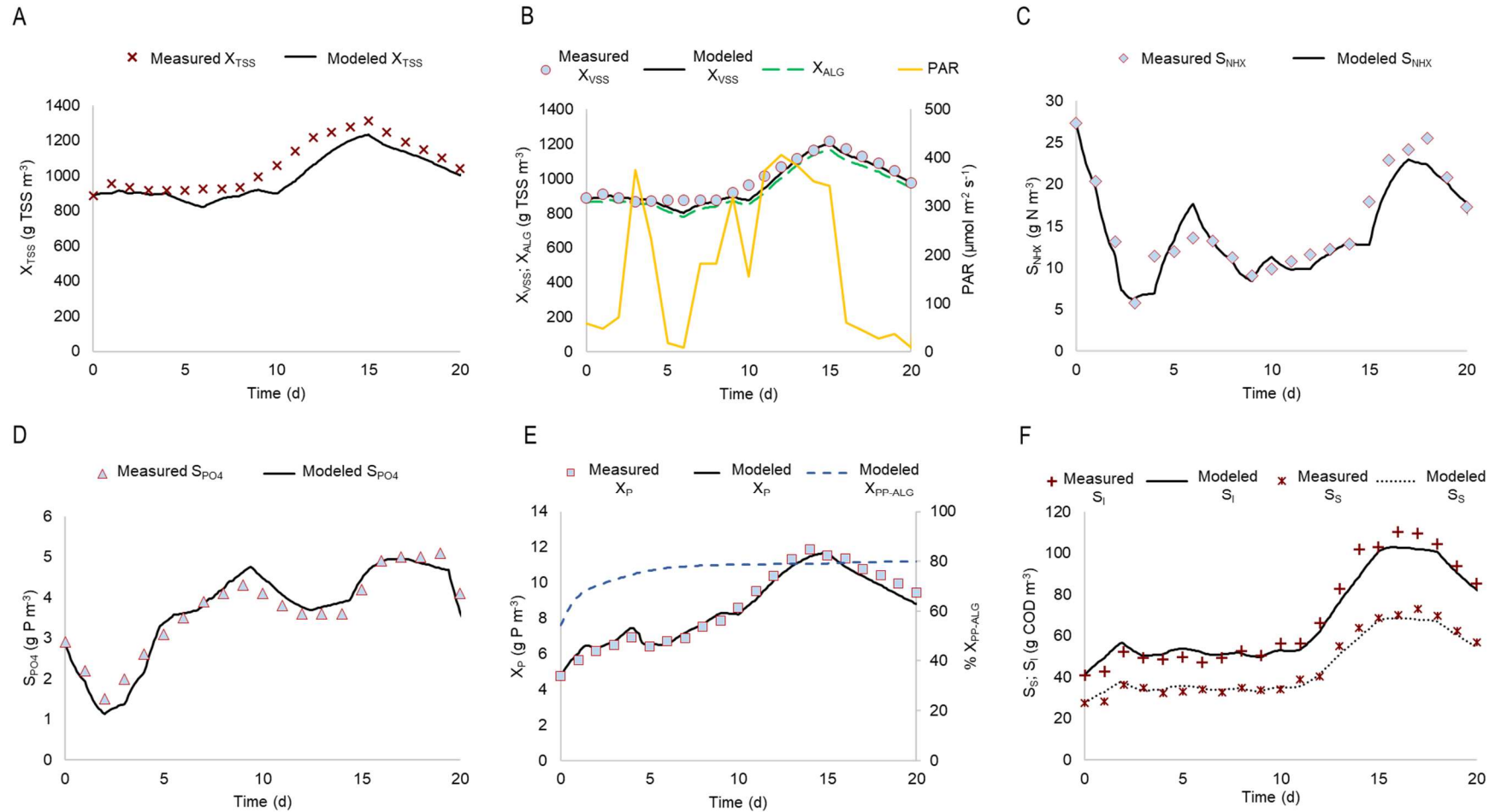


Figure 6.5. Dynamic simulation of P2_1. Evolution of: (A) X_{TSS} [g TSS·m⁻³]; (B) X_{VSS} and X_{ALG} [g VSS·m⁻³] and PAR [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]; (C) S_{NHX} [g N·m⁻³] in the PBR culture medium; (D) S_{PO4} concentration [g P·m⁻³] in the PBR culture medium; (E) X_P [g P·m⁻³] and X_{PP-ALG} [% in average of X_P] and (F) S_s and S_i [g COD·m⁻³] in the PBR culture medium. Experimental and modeled data are represented by markers and lines, respectively.

The experimental and modeled data for X_P is shown in Figure 6.5E, showing that both sets fit well and that X_P follows the same pattern as the rest of the particulate components. However, a 25.63% increase was seen in X_{PP-ALG} (from 54.20 to 79.83%). Comparing Figures 6.5D and 5E, the increase in X_{PP-ALG} percentage coincides with the sharp drop in S_{PO4} concentration during the first three days of the period, which can be explained by the luxury uptake mechanism considered in the model. Under P-replete conditions, microalgal cells will uptake phosphorus to satisfy their metabolic requirements and to store phosphorus as X_{PP-ALG} for P-deplete conditions.

The model results also successfully represented S_S and S_I concentrations (Figure 6.5F). As it also captured X_{ALG} dynamics, the monitored variations in S_S and S_I concentrations could be attributed to the release of intracellular organic compounds due to X_{ALG} lysis, as in the P1_1 analysis.

5.2.4. P2_2 validation

Figure 6.6 shows the results of P2_2, operating 0.10-m-wide PBRs with no significant variations in environmental and operational conditions. This period was characterized by a nearly stable operating temperature ($23.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$) and average light intensity ($345 \pm 36 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), while HRT and BRT were set at 1.5 and 3 days, respectively. This period was selected to evaluate microalgae cells' growth in a P-deplete medium, since S_{PO4} concentration was nearly $0 \text{ g P}\cdot\text{m}^{-3}$ throughout the whole period.

Figures 6.6A and 6B show the experimental and predicted X_{TSS} and X_{VSS} concentrations. In this case, the modeled data for these two particulate components fits the experimental data with different degrees of accuracy. The model accurately predicted the X_{TSS} concentration up to day 6, after which the predicted X_{TSS} concentration did not match as well with the experimental data in the other selected periods, but it did reproduce the experimental pattern. Conversely, the model was able to accurately predict X_{VSS} dynamics. As in the other periods, it predicted that X_{ALG} would account for more than 97% of the measured X_{VSS} . The X_{ALG} oscillation pattern was not associated with the available light intensity but rather with the inorganic nutrient concentration in the MPBR influent. The low S_{PO4} concentration ($0.014 \pm 0.011 \text{ g P}\cdot\text{m}^{-3}$, see Figure 6.6D) in

conjunction with an increase in the phosphorus loading rate recorded during this period resulted in a significant increase in X_{ALG} (see Figure 6.6B), suggesting phosphorus was limited for microalgae growth. Indeed, the percentage of X_{PP-ALG} estimated from the predicted X_P gradually decreased from around 66 to 58% (see Figure 6.6E). It can thus be assumed that the microalgae grew by consuming part of X_{PP-ALG} . In contrast to S_{PO4} , S_{NHX} concentrations above $5 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-3}$ were determined (see Figure 6.6C). The model was set for S_{NHX} uptake by microalgae in a P-deplete medium at a slower rate than in a culture medium with available S_{PO4} . According to the structure of the model, the parameter $K_{NHX-qXPP}$ thus plays a key role when representing the experimental data. The modeled S_s and S_I matched the experimental data and exhibited the oscillation pattern related to microalgal lysis, already mentioned in P2_1.

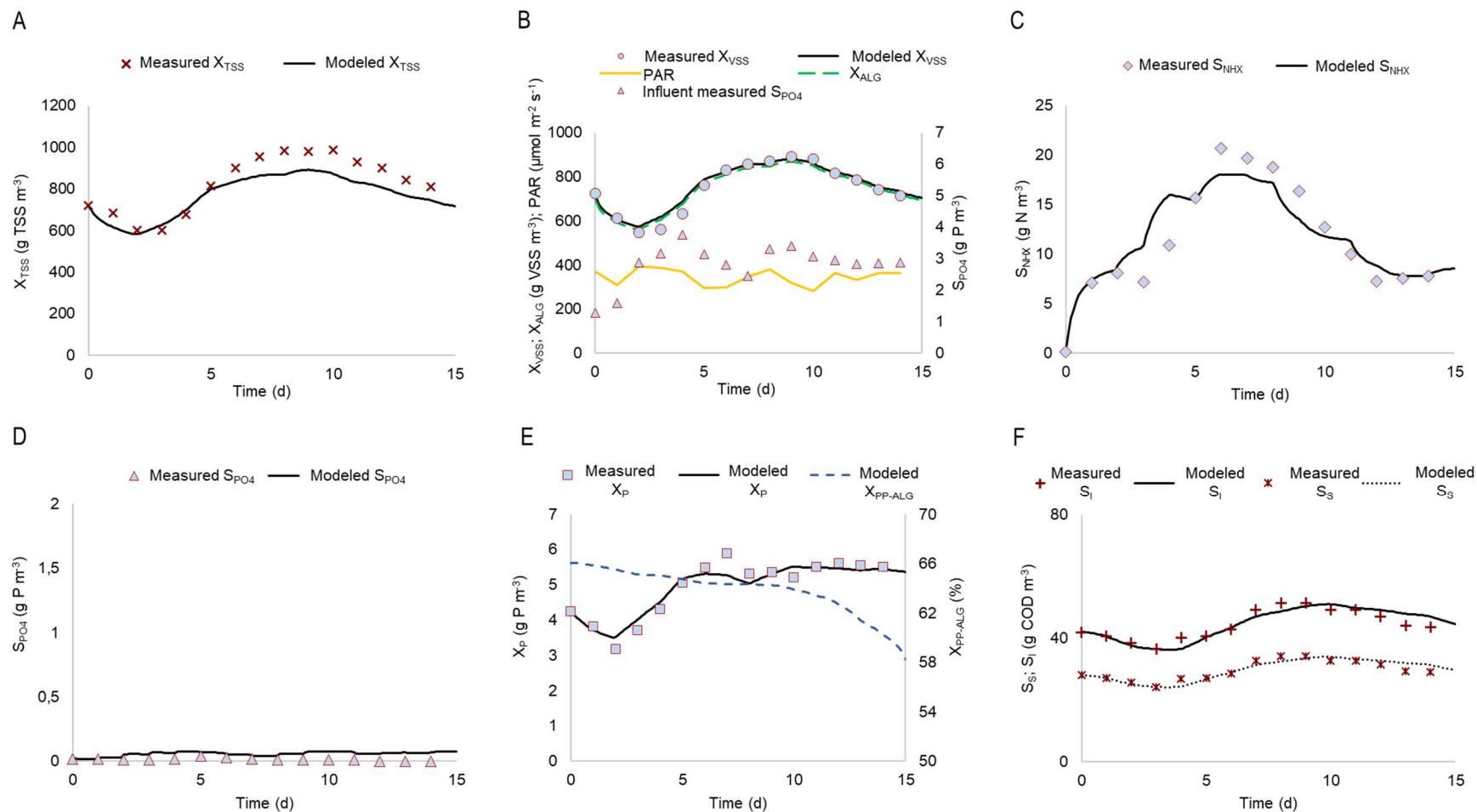


Figure 6.6. Dynamic simulation of P2_2. Evolution of: (A) X_{TSS} [g TSS·m⁻³]; (B) X_{VSS} and X_{ALG} [g VSS·m⁻³], PAR [μmol·m⁻²·s⁻¹] and S_{PO4} [g P·m⁻³] concentration in the influent of MPBR; (C) S_{NHX} [g N·m⁻³] in the PBR culture medium; (D) S_{PO4} concentration [g P·m⁻³] in the PBR culture medium; (E) X_P [g P·m⁻³] and X_{PP-ALG} [% in average of X_P] and (F) S_S and S_I [g COD·m⁻³] in the PBR culture medium. Experimental and modeled data are represented by markers and lines, respectively.

5.3. Overall model performance

A scatter plot of the experimental and modeled data is provided as supplementary material (APPENDIX A). More than 400 pairs of data were evaluated, resulting in an R^2 coefficient of 0.9954, highlighting the reproducibility of both the model structure and the calibrated parameter values. The t-test was used to compare the means of the experimental and simulated data: the experimental data mean was 246.1 and for the modeled data was 238.5. This test also constructs confidence intervals, or confidence limits, for each mean and the differences between means. The confidence interval of the difference between the means, which extends from -37.31 to 52.56 is of particular interest, given that it obtained a value of 0, indicating no significant difference between the means of the two data samples, with a confidence level of 95.0%.

The t-test can also be used to evaluate specific hypotheses on the difference between the means of the experimental and simulated data. In this case, the test was constructed to determine whether the difference between the two means is equal to 0.0, versus the alternate hypothesis that the difference is not equal to 0.0. Since the calculated P-value of 0.7394 is not less than 0.05, the null hypothesis cannot be rejected, which specifies that the means of both data sets are statistically equal.

These results assume that the variances of the two samples are equal. In this case, this assumption seems reasonable, based on the F-test results, since the standard deviation obtained for the experimental and modeled data were 339.0 and 323.7 respectively. The F-test also constructs confidence intervals or confidence limits for each standard deviation and for the ratio of variances. The confidence interval for the variance ratio, which ranges from 0.9040 to 1.3293, is of interest. Since the interval has the value of 1, there is no statistically significant difference between the standard deviations of the experimental and modeled data at a 95.0% confidence level.

Like the T-test, an F-test can also be run to evaluate a specific hypothesis on the SD of the populations from which the two samples are drawn. In this case, the test was constructed to determine whether the SD ratio was equal to 1.0, versus the alternative hypothesis by which the ratio was not equal to 1.0. Since the calculated P-value (0.3458)

was not less than 0.05, the null hypothesis cannot be rejected, which means that the means of both data sets are statistically equal.

Finally, a Mann-Whitney U-test was run to compare the medians of two samples, combining the two samples with the data from smallest to largest and comparing the average rankings of the two samples in the combined data. The median for the experimental data was 47.91 and for the simulated data 49.07. Since the P-value was 0.9137, there was no statistically significant difference between the medians, at 95.0%.

Periods 1 and 2 were differentiated according to the width of the PBRs, i.e. 0.25 and 0.10 m, respectively, and both were adequately reproduced, with single values of optimal intensity and biomass attenuation coefficient.

As previously commented, the 4 validation periods were selected based on variations in the processes' operational and environmental conditions. The model was validated with 2 different PBR (0.25-m and 0.10-m PBRs width), steady and unsteady temperature and light intensity while changing the reactor operating conditions. Despite the added variability, the model was able to accurately reproduce the process performance with the same calibrated values for all the model parameters. It should be noted that the proposed model was able to reproduce the inorganic nutrient concentration in the culture medium, which is essential in MPBR technology to determine the operational conditions that satisfy the E.U.'s discharge limits in areas sensitive to eutrophication. MPBR technology can also be integrated into innovative water resource recovery facilities (WRRFs) for the recovery of carbon, nutrients and reclaimed water. For instance, the harvested microalgae can also be used as a carbon source in anaerobic digestion for methane production, improving the WRRF energy balance (Seco et al., 2018). In this respect, since the model is capable of faithfully reproducing X_{TSS} , X_{VSS} and X_{ALG} dynamics, it could be used to predict microalgal production and potentially assess WRRF energy recovery.

The changes in the MPBR algal population were detected by Leica DM2500 epifluorescence microscopy over the 3 years of operation, which indicated alternating microalgae of the *Chlorella* and *Scenedesmus* genera (P1_1: 8% *Chlorella* and 92% *Scenedesmus*; P1_2: 56% *Chlorella* and 44% *Scenedesmus*; P2_1: 87% *Chlorella* and 13% *Scenedesmus*; and P2_2: 96% *Chlorella* and 4% *Scenedesmus*). However, as the

model did not focus on a specific microalgae species, model calibration and validation were performed with a heterogeneous population of microalgae composed of different indigenous species. Despite variations in the microalgae genus, the calibrated values enabled the model results to fit well with the experimental data from the four periods, showing that the proposed model could easily be extended to other microalgae genera. The model calibration and validation in two PBRs with different widths also showed that it can operate under variable operating and environmental conditions.

The model also has certain limitations, which should be mentioned: for instance, in reactors operating with uncontrolled pH, daily pH fluctuations can range from 7 to 9 (Foladori et al., 2018). As alkaline pH can promote not only the stripping of free ammonia and other gases but also uncontrolled precipitation of phosphorus compounds, with variable pH, the precipitation kinetic equations described by Barat et al. (2011) should be included.

The model was fitted with experimental data that accounted for the most significant parameters that affect microalgae metabolism and was intended to promote and assist the development of evaluation applications in the microalgae field, including variable impact studies, optimized reactor control, parameter estimation or performance optimization. It was also developed as a predictive tool to determine the combination of environmental and operational parameters that promote maximum biomass productivity and to comply with the discharge limits stipulated in the UWWTD for sensitive areas.

5 CONCLUSIONS

The model was validated using data from 4 operating periods in a pilot-scale MPBR plant operating under different operational and environmental conditions. Despite the dynamics on the operating (BRT, HRT and PBR width) and environmental conditions (T, PAR and nutrients concentration), the model was able to reproduce the process performance and effluent quality successfully (no statistically significant differences were found between the model and the experimental results), which is essential for the design of nutrient recovery or removal technologies. Microalgae growth and phosphorus storage were also reproduced at phosphorus-replete and -deplete culture conditions, including new and

specific parameters for phosphorus-deplete culture conditions ($K_{\text{NHX-qPP}}$ and $K_{\text{I, PO4}}$). The predicted data accurately reproduced the dynamics of the MPBR performance in all 4 periods with a single calibrated data set (a satisfactory overall correlation coefficient (R^2) of 0.9954 was achieved), highlighting the model's potential for simulating microalgae wastewater treatment systems. However, further research along these lines would be useful to extend the model to deal with pH variation, indigenous heterotrophic and autotrophic wastewater bacteria, especially those of the nitrifying type.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO, Projects CTM2014-54980-C2-1-R and CTM2014-54980-C2-2-R) jointly with the European Regional Development Fund (ERDF), both of which are gratefully acknowledged. It was also supported by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport via a pre-doctoral FPU fellowship to author Stéphanie Aparicio (FPU/15/02595).

REFERENCES

- Abargues, M.R., Ferrer, J., Bouzas, A., Seco, A., 2013. Removal and fate of endocrine disruptors chemicals under lab-scale posttreatment stage. Removal assessment using light, oxygen and microalgae. *Bioresour. Technol.* 149, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.051>
- Abargues, M.R., Giménez, J.B., Ferrer, J., Bouzas, A., Seco, A., 2018. Endocrine disrupter compounds removal in wastewater using microalgae: Degradation kinetics assessment. *Chem. Eng. J.* 334, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.187>
- Acién-Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M.M., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2016a. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9013–9022. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Acién-Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M.M., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2016b. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to

- significant urban wastewater treatment? Appl. Microbiol. Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Acién-Fernández, F.G., Gómez-Serrano, C., Fernández-Sevilla, J.M., 2018. Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae. Front. Sustain. Food Syst. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00059>
- Álvarez-Díaz, P.D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, M.C., Perales, J.A., 2017. Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. Algal Res. 24, 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.006>
- APHA, AWWA, WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed, American Public Health Association. Washington, DC. USA.
- Ashadullah, A.K.M., Shafiquzzaman, M., Haider, H., Alresheedi, M., Azam, M.S., Ghumman, A.R., 2021. Wastewater treatment by microalgal membrane bioreactor: Evaluating the effect of organic loading rate and hydraulic residence time. J. Environ. Manage. 278, 111548. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111548>
- Aslan, S., Kapdan, I.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecol. Eng. 28, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>
- Barat, R., Montoya, T., Seco, A., Ferrer, J., 2011. Modelling biological and chemically induced precipitation of calcium phosphate in enhanced biological phosphorus removal systems. Water Res. 45, 3744–3752. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.028>
- Barbera, E., Sforza, E., Grandi, A., Bertucco, A., 2020. Uncoupling solid and hydraulic retention time in photobioreactors for microalgae mass production: A model-based analysis. Chem. Eng. Sci. 218, 115578. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.115578>
- Bernard, O., Masci, P., Sciandra, A., 2009. A photobioreactor model in nitrogen limited conditions, in: MATHMOD 09 Vienna. pp. 1521–1530. <https://hal.science/hal-03523391>
- Bernard, O., Rémond, B., 2012. Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. Bioresour. Technol. 123, 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.022>
- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. Bioresour. Technol. 181, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>

- 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. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 518–532. <https://doi.org/10.3390/ijms10020518>
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., Pareau, D., 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnol. Reports* 11, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>
- Eze, V.C., Velasquez-Orta, S.B., Hernández-García, A., Monje-Ramírez, I., Orta-Ledesma, M.T., 2018. Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. *Algal Res.* 32, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.015>
- Foladori, P., Petrini, S., Andreottola, G., 2018. Evolution of real municipal wastewater treatment in photobioreactors and microalgae-bacteria consortia using real-time parameters. *Chem. Eng. J.* 345, 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.178>
- García, D., Posadas, E., Blanco, S., Acién-Fernández, F.G., García-Encina, P., Bolado, S., Muñoz, R., 2018. Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 248, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.079>
- García, J., Mujeriego, R., Hernández-Mariné, M., 2000. High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal, in: *Journal of Applied Phycology*. Springer Netherlands, pp. 331–339. <https://doi.org/10.1023/a:1008146421368>
- González-Camejo, J., Aparicio, S., Jiménez-Benítez, A., Pachés, M., Ruano, M. V., Borrás, L., Barat, R., Seco, A., 2020a. Improving membrane photobioreactor performance by reducing light path: operating conditions and key performance indicators. *Water Res.* 172, 115518. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115518>
- González-Camejo, J., Aparicio, S., Ruano, M. V., Borrás, L., Barat, R., Ferrer, J., 2019a. Effect of ambient temperature variations on an indigenous microalgae-nitrifying bacteria culture dominated by *Chlorella*. *Bioresour. Technol.* 290, 121788. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121788>
- González-Camejo, J., Barat, R., Aguado, D., Ferrer, J., 2020b. Continuous 3-year outdoor operation of a flat-panel membrane photobioreactor to treat effluent from an anaerobic membrane bioreactor. *Water Res.* 169, 115238. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115238>
- González-Camejo, J., Jiménez-Benítez, A., Ruano, M.V., Robles, A., Barat, R., Ferrer, J., 2019b. Optimising an outdoor membrane photobioreactor for tertiary sewage treatment. *J. Environ. Manage.* 245, pp. 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.010>

- Kassim, M.A., Meng, T.K., 2017. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. *Sci. Total Environ.* 584–585, 1121–1129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.172>
- Khalili, A., Najafpour, G.D., Amini, G., Samkhaniyani, F., 2015. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 20, 284–290. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0845-8>
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater Treatment with Microalgae - A Literature Review. *Vatten* 62, 31–38.
- Li, Y., Chen, Y.F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., Ruan, R., 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 5138–5144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>
- Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., Bayona, J.M., 2016. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: A laboratory scale study. *J. Hazard. Mater.* 301, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.050>
- Nguyen, T.T., Bui, X.T., Ngo, H.H., Nguyen, T.T.D., Nguyen, K.Q., Nguyen, H.H., Huynh, K.P.H., Némery, J., Fujioka, T., Duong, C.H., Dang, B.T., Varjani, S., 2021. Nutrient recovery and microalgae biomass production from urine by membrane photobioreactor at low biomass retention times. *Sci. Total Environ.* 785, 147423. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147423>
- Oswald, W.J., 1988. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, pp. 305–328. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387448948115968>
- Rahman, S.M., Eckelman, M.J., Onnis-Hayden, A., Gu, A.Z., 2016. Life-Cycle Assessment of Advanced Nutrient Removal Technologies for Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3020–3030. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05070>
- Reichert, P., Borchardt, D., Henze, M., Rauch, W., Shanahan, P., Somlyódy, L., Vanrolleghem, P., 2001. River Water Quality Model no. 1 (RWQM1): II. Biochemical process equations. *Water Sci. Technol.* 43, 11–30. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0241>
- Ruano, M. V., Ribes, J., Ferrer, J., Sin, G., 2011. Application of the Morris method for screening the influential parameters of fuzzy controllers applied to wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 63, 2199–2206. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.442>

- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Pachés, M., Seco, A., Ferrer, J., 2014. Mixed microalgae culture for ammonium removal in the absence of phosphorus: Effect of phosphorus supplementation and process modeling. *Process Biochem.* 49, 2249–2257. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.002>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2015a. Effect of intracellular P content on phosphate removal in *Scenedesmus* sp. Experimental study and kinetic expression. *Bioresour. Technol.* 175, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.081>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., 2015b. Effect of temperature on ammonium removal in *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 191, 346–349. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.070>
- Ruiz, J., Arbib, Z., Álvarez-Díaz, P.D., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., Perales, J.A., 2013. Photobiotreatment model (PhBT): a kinetic model for microalgae biomass growth and nutrient removal in wastewater, *Environmental Technology* 34(8), 979–991. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.724451>
- Sabeen, A.H., Noor, Z.Z., Ngadi, N., Almuraisy, S., Raheem, A.B., 2018. Quantification of environmental impacts of domestic wastewater treatment using life cycle assessment: A review. *J. Clean. Prod.* 190, 211–233. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.053>
- Sánchez-Zurano, A.; Rodríguez-Miranda, E.; Guzmán, J.L.; Acien-Fernández, F.G.; Fernández-Sevilla, J.M.; Molina Grima, E. ABACO: A New Model of Microalgae-Bacteria Consortia for Biological Treatment of Wastewaters. *Appl. Sci.* 11(3), 998. <https://doi.org/10.3390/app11030998>
- Sánchez-Zurano, A., Gómez Serrano, C., Acien-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina-Grima, E., 2021. Modeling of photosynthesis and respiration rate for microalgae–bacteria consortia. *Biotechnol. Bioeng.* 118, 952–962. <https://doi.org/10.1002/bit.27625>
- Seco, A., Aparicio, S., González-Camejo, J., Jiménez-Benítez, A., Mateo, O., Mora, J.F., Noriega-Hevia, G., Sanchis-Perucho, P., Serna-García, R., Zamorano-López, N., Giménez, J.B., Ruiz-Martínez, A., Aguado, D., Barat, R., Borrás, L., Bouzas, A., Martí, N., Pachés, M., Ribes, J., Robles, A., Ruano, M. V., Serralta, J., Ferrer, J., 2018. Resource recovery from sulphate-rich sewage through an innovative anaerobic-based water resource recovery facility (WRRF). *Water Sci. Technol.* 78, 1925–1936. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.492>
- Serralta, J., Ferrer, J., Borrás, L., Seco, A., 2004. An extension of ASM2d including pH calculation. *Water Res.* 38, 4029–4038. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.009>
- Shoener, B.D., Schramm, S.M., Béline, F., Bernard, O., Martínez, C., Plósz, B.G., Snowling, S., Steyer, J.P., Valverde-Pérez, B., Wágner, D., Guest, J.S., 2019. Microalgae and cyanobacteria modeling in water resource recovery facilities: A critical review. *Water Res.* X 2, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2018.100024>

CAPÍTULO 6

- Siegrist, H., Renggli, D., Gujer, W., 1993. Mathematical modelling of anaerobic mesophilic sewage sludge treatment, in: *Water Science and Technology*. pp. 25–36. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0070>
- Singh, D., Nedbal, L., Ebenhöh, O., 2018. Modelling phosphorus uptake in microalgae. *Biochem. Soc. Trans.* <https://doi.org/10.1042/BST20170262>
- Solimeno, A., Samsó, R., Uggetti, E., Sialve, B., Steyer, J.P., Gabarró, A., García, J., 2015. New mechanistic model to simulate microalgae growth. *Algal Res.* <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.008>
- Song, X., Luo, W., Hai, F.I., Price, W.E., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., 2018. Resource recovery from wastewater by anaerobic membrane bioreactors: Opportunities and challenges. *Bioresour. Technol.* 270, 669–677. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.001>
- Steele, J.H., 1965. Notes on some theoretical problems in production ecology. Goldman, C. R. (ed.), *Prim. Product. Aquat. Environ. (Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 18 Suppl.)* 383–398.
- Sun, Y., Huang, Y., Liao, Q., Fu, Q., Zhu, X., 2016. Enhancement of microalgae production by embedding hollow light guides to a flat-plate photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 207, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.136>
- Sydney, E.B., da Silva, T.E., Tokarski, A., Novak, A.C., de Carvalho, J.C., Woiciechowski, A.L., Larroche, C., Soccol, C.R., 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl. Energy* 88, 3291–3294. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.024>
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A., Soccol, C.R., 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresour. Technol.* 101, 5892–5896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.088>
- Viruela, A., Murgui, M., Gómez-Gil, T., Durán, F., Robles, Á., Ruano, M.V., Ferrer, J., 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. *Bioresour. Technol.* 218, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.116>
- Viruela, A., Robles, Á., Durán, F., Ruano, M.V., Barat, R., Ferrer, J., Seco, A., 2018. Performance of an outdoor membrane photobioreactor for resource recovery from anaerobically treated sewage. *J. Clean. Prod.* 178, 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.223>
- Wagner, D.S., Valverde-Pérez, B., Sæbø, M., Bregua de la Sotilla, M., Van Wageningen, J., Smets, B.F., Plósz, B.G., 2016. Towards a consensus-based biokinetic model for green microalgae – The ASM-A. *Water Res.* 103, 485–499. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.026>

- Wang, J.H., Zhang, T.Y., Dao, G.H., Xu, X.Q., Wang, X.X., Hu, H.-Y., 2017. Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8184-x>
- Xu, M., Li, P., Tang, T., Hu, Z., 2015. Roles of SRT and HRT of an algal membrane bioreactor system with a tanks-in-series configuration for secondary wastewater effluent polishing. *Ecol. Eng.* 85, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.064>
- Zambrano, J., Krustok, I., Nehrenheim, E., Carlsson, B., 2016. A simple model for algae-bacteria interaction in photo-bioreactors. *Algal Res.* 19, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.022>
- Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., Yuan, Z., 2013. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Res.* 47, 4294–4302. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.004>

APPENDIX A. Supplementary Material

Table 6.S1. Stoichiometry of the processes considered in the microalgae model.

Components → i	S_{O2}	S_{NHX}	S_{NO3}	S_{PO4}	S_{Ig,C}	S_H	S_{Mg}	S_K	S_S	S_I	X_{ALG}	X_I	X_{PP-ALG}
Processes ↓ j	g O₂·m⁻³	g N·m⁻³	g N·m⁻³	g P·m⁻³	mol C·m⁻³	mol H·m⁻³	g Mg·m⁻³	g K·m⁻³	g COD·m⁻³	g COD·m⁻³	g COD·m⁻³	g COD·m⁻³	g P·m⁻³
1. X _{ALG} growth on S _{NHX} and S _{PO4}	v _{1,1}	v _{2,1}		v _{4,1}	v _{5,1}	v _{6,1}					v _{11,1}		
2. X _{ALG} growth on S _{NO3} and S _{PO4}	v _{1,2}		v _{3,2}	v _{4,2}	v _{5,2}	v _{6,2}					v _{11,2}		
3. X _{ALG} growth on S _{NHX} and X _{PP-ALG}	v _{1,3}	v _{2,3}			v _{5,3}	v _{6,3}	v _{7,3}	v _{8,3}			v _{11,3}		v _{13,3}
4. X _{ALG} growth on S _{NO3} on X _{PP-ALG}	v _{1,4}		v _{3,4}		v _{5,4}	v _{6,4}	v _{7,4}	v _{8,4}			v _{11,4}		v _{13,4}
5. X _{PP-ALG} storage				v _{4,5}		v _{6,5}	v _{7,5}	v _{8,5}					v _{13,5}
6. X _{ALG} endogenous respiration	v _{1,6}	v _{2,6}		v _{4,6}	v _{5,6}	v _{6,6}					v _{11,6}		
7. X _{ALG} lysis		v _{2,7}		v _{4,7}	v _{5,7}	v _{6,7}			v _{9,7}	v _{10,7}	v _{11,7}	v _{12,7}	
8. X _{PP-ALG} lysis				v _{4,8}		v _{6,8}	v _{7,8}	v _{8,8}					v _{13,8}
9. S _[CO2] stripping					v _{5,9}	v _{6,9}							
10. S _{O2} stripping	v _{1,10}												
11. S _[NH3] stripping		v _{2,11}											

Table 6.S2. Conversion factors to be applied in the continuity equations of the microalgae model for N, P, Mg, K, carbon and proton.

CONVERSION FACTORS	S_{O_2} g $O_2 \cdot m^{-3}$	S_{NH_4} g $N \cdot m^{-3}$	S_{NO_3} g $N \cdot m^{-3}$	S_{PO_4} g $P \cdot m^{-3}$	$S_{Ig,C}$ mol $\cdot C \cdot m^{-3}$	S_H mol $\cdot H \cdot m^{-3}$	S_{Mg} g $Mg \cdot m^{-3}$	S_K g $K \cdot m^{-3}$	S_S g $COD \cdot m^{-3}$	S_I g $COD \cdot m^{-3}$	X_{ALG} g $COD \cdot m^{-3}$	X_I g $COD \cdot m^{-3}$	X_{PP-ALG} g $P \cdot m^{-3}$
COD (g O_2)	1	$-i_{N,ALG}$		$-i_{P,ALG}$	$v_{5,1}$	$v_{6,1}$					1		
N (g N)	$v_{1,2}$		$-i_{N,ALG}$	$-i_{P,ALG}$	$v_{5,2}$	$v_{6,2}$					1		
P (g P)	1	$-i_{N,ALG}$			$v_{5,3}$	$v_{6,3}$	$v_{7,3}$	$v_{8,3}$			1		$-i_{P,ALG}$
Mg (g Mg)	$v_{1,4}$		$-i_{N,ALG}$		$v_{5,4}$	$v_{6,4}$	$v_{7,4}$	$v_{8,4}$			1		$-i_{P,ALG}$
K (g K)				-1		$v_{6,5}$	$-i_{Mg,XPPALG}$	$-i_{K,XPPALG}$					1
C (mol C)	-1	$i_{N,ALG}$		$i_{P,ALG}$	$v_{5,6}$	$v_{6,6}$					-1		
H ⁺ (mol H)		$v_{2,7}$		$v_{4,7}$	$v_{5,7}$	$v_{6,7}$			$v_{9,7}$	f_{SI}	-1	f_{XI}	

Table 6.S3. Mathematical expressions of the stoichiometric coefficients of the processes considered in the microalgae model.

Stoichiometric coefficients	Unit
X_{ALG} growth on S_{NHX} and S_{PO4}	
$v_{1,1} = 1$	g O ₂ ·g COD ⁻¹
$v_{2,1} = -i_{N,ALG}$	g N·g COD ⁻¹
$v_{4,1} = -i_{P,ALG}$	g P·g COD ⁻¹
$v_{5,1} = \frac{-i_{C,ALG}}{10^3}$	mol C·g COD ⁻¹
$v_{6,1} = \frac{i_{N,ALG}}{14} \cdot \frac{1}{10^3} - \frac{2i_{C,ALG}}{10^3} - \frac{3i_{P,ALG}}{31} \cdot \frac{1}{10^3}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{11,1} = 1$	g COD·g COD ⁻¹
X_{ALG} growth on S_{NO3} and S_{PO4}	
$v_{1,2} = 1 + \frac{64}{14} \cdot i_{N,ALG}$	g O ₂ ·g COD ⁻¹
$v_{3,2} = -i_{N,ALG}$	g N·g COD ⁻¹
$v_{4,2} = -i_{P,ALG}$	g P·g COD ⁻¹
$v_{5,2} = \frac{-i_{C,ALG}}{10^3}$	mol C·g COD ⁻¹
$v_{6,2} = -\frac{i_{N,ALG}}{14} \cdot \frac{1}{10^3} - \frac{2i_{C,ALG}}{10^3} - \frac{3i_{P,ALG}}{31} \cdot \frac{1}{10^3}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{11,2} = 1$	g COD·g COD ⁻¹
X_{ALG} growth on S_{NHX} and X_{PP-ALG}	
$v_{1,3} = 1$	g O ₂ ·g COD ⁻¹
$v_{2,3} = -i_{N,ALG}$	g N·g COD ⁻¹
$v_{5,3} = \frac{-i_{C,ALG}}{10^3}$	mol C·g COD ⁻¹
$v_{6,3} = \frac{i_{N,ALG}}{14} \cdot \frac{1}{10^3} - \frac{2i_{C,ALG}}{10^3} - \frac{2i_{P,ALG} \cdot i_{Mg,XPP-ALG}}{24.3} \cdot \frac{1}{10^3} - \frac{i_{P,ALG} \cdot i_{K,XPP-ALG}}{39.1} \cdot \frac{1}{10^3}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{7,3} = i_{P,ALG} \cdot i_{Mg,XPP-ALG}$	g Mg·g COD ⁻¹
$v_{8,3} = i_{P,ALG} \cdot i_{K,XPP-ALG}$	g K·g COD ⁻¹
$v_{11,3} = 1$	g COD·g COD ⁻¹
$v_{13,3} = -i_{P,ALG}$	g P·g COD ⁻¹
X_{ALG} growth on S_{NO3} on X_{PP-ALG}	
$v_{1,4} = 1 + \frac{64}{14} \cdot i_{N,ALG}$	g O ₂ ·g COD ⁻¹
$v_{3,4} = -i_{N,ALG}$	g N·g COD ⁻¹
$v_{5,4} = \frac{-i_{C,ALG}}{10^3}$	mol C·g COD ⁻¹
$v_{6,4} = -\frac{i_{N,ALG}}{14} \cdot \frac{1}{10^3} - \frac{2i_{C,ALG}}{10^3} - \frac{2i_{P,ALG} \cdot i_{Mg,XPP-ALG}}{24.3} \cdot \frac{1}{10^3} - \frac{i_{P,ALG} \cdot i_{K,XPP-ALG}}{39.1} \cdot \frac{1}{10^3}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{7,4} = i_{P,ALG} \cdot i_{Mg,XPP-ALG}$	g Mg·g COD ⁻¹
$v_{8,4} = i_{P,ALG} \cdot i_{K,XPP-ALG}$	g K·g COD ⁻¹
$v_{11,4} = 1$	g COD·g COD ⁻¹
$v_{13,4} = -i_{P,ALG}$	g P·g COD ⁻¹

Table 6.S3 (Continued). Mathematical expressions of the stoichiometric coefficients of the processes considered in the microalgae model.

Stoichiometric coefficients	Unit
X_{PP-ALG} storage	
$v_{4,5} = -1$	g P·g COD ⁻¹
$v_{6,5} = -\frac{3}{31 \cdot 10^3} + \frac{2i_{Mg,XPPALG}}{24.3} \frac{1}{10^3} + \frac{i_{K,XPPALG}}{39.1} \cdot \frac{1}{10^3}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{7,5} = -i_{Mg,XPPALG}$	g Mg·g COD ⁻¹
$v_{8,5} = -i_{K,XPPALG}$	g K·g COD ⁻¹
$v_{13,5} = 1$	g P·g COD ⁻¹
X_{ALG} endogenous respiration	
$v_{1,6} = -1$	g COD·g COD ⁻¹
$v_{2,6} = i_{N,ALG}$	g N·g COD ⁻¹
$v_{4,6} = i_{P,ALG}$	g P·g COD ⁻¹
$v_{5,6} = \frac{i_{C,ALG}}{10^3}$	mol C·g COD ⁻¹
$v_{6,6} = 3 \cdot \frac{i_{P,ALG}}{31} + 2 \cdot \frac{i_{CALG}}{10^3} - \frac{i_{NALG}}{14}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{11,6} = -1$	g COD·g COD ⁻¹
X_{ALG} storage	
$v_{2,7} = i_{N,ALG} - (1 - f_{SI} - f_{XI}) \cdot i_{N,SS} - f_{SI} \cdot i_{N,SIALG} - f_{XI} \cdot i_{N,XIALG}$	g N·g COD ⁻¹
$v_{4,7} = i_{P,ALG} - (1 - f_{SI} - f_{XI}) \cdot i_{P,SS} - f_{SI} \cdot i_{P,SIALG} - f_{XI} \cdot i_{P,XIALG}$	g P·g COD ⁻¹
$v_{5,7} = \frac{i_{C,ALG} - (1 - f_{SI} - f_{XI}) \cdot i_{C,SS} - f_{SI} \cdot i_{C,SIALG} - f_{XI} \cdot i_{C,XIALG}}{10^3}$	mol C·g COD ⁻¹
$v_{6,7} = \frac{3 \cdot (i_{P,ALG} - (1 - f_{SI} - f_{XI}) \cdot i_{P,SS} - f_{SI} \cdot i_{P,SIALG} - f_{XI} \cdot i_{P,XIALG})}{10^3} + \frac{2 \cdot (i_{C,ALG} - (1 - f_{SI} - f_{XI}) \cdot i_{C,SS} - f_{SI} \cdot i_{C,SIALG} - f_{XI} \cdot i_{C,XIALG})}{10^3} - \frac{i_{N,ALG} - (1 - f_{SI} - f_{XI}) \cdot i_{N,SS} - f_{SI} \cdot i_{N,SIALG} - f_{XI} \cdot i_{N,XIALG}}{14}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{9,7} = (1 - f_{SI} - f_{XI})$	g COD·g COD ⁻¹
$v_{10,7} = f_{SI}$	g COD·g COD ⁻¹
$v_{11,7} = -1$	g COD·g COD ⁻¹
$v_{12,7} = f_{XI}$	g COD·g COD ⁻¹
X_{PP-ALG} lysis	
$v_{4,8} = 1$	g P·g COD ⁻¹
$v_{6,8} = -\frac{3}{31 \cdot 10^3} - \frac{2i_{Mg,XPPALG}}{24.3} \frac{1}{10^3} - \frac{i_{K,XPPALG}}{39.1} \cdot \frac{1}{10^3}$	mol H·g COD ⁻¹
$v_{7,8} = i_{Mg,XPPALG}$	g Mg·g COD ⁻¹
$v_{8,8} = i_{K,XPPALG}$	g K·g COD ⁻¹
$v_{13,8} = -1$	g P·g COD ⁻¹
S_[CO₂] stripping	
$v_{5,9} = \frac{-1}{10^3}$	-
$v_{6,9} = \frac{-2}{10^6}$	-

Table 6.S3 (Continued). Mathematical expressions of the stoichiometric coefficients of the processes considered in the microalgae model.

Stoichiometric coefficients	Unit
SO₂ stripping	
$v_{1,10} = -1$	-
S_[NH₃] stripping	
$v_{2,11} = -1$	-

Table 6.S4. Values for the chemical equilibrium and conversion factors for conservation equation.

Parameters		Equations		
Chemical equilibrium $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3$		$K_{\text{eq},1} = 10^{2.891 - \frac{2727}{T+273.15}}$		
Chemical equilibrium $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$		$K_{\text{eq},2} = 10^{17.843 - \frac{3404.71}{T+273.15} - 0.032786(T+273.15)}$		
Chemical equilibrium $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$		$K_{\text{eq},3} = 10^{9.494 - \frac{2902.39}{T+273.15} - 0.02379(T+273.15)}$		
Chemical equilibrium $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$		$K_{\text{eq},1} = 10^{17.843 - \frac{3404.71}{T+273.15} - 0.032786(T+273.15)}$		
Kinetic parameters				
Parameters	Description	Value	Unit	Source
$k_{\text{eq},1}$	Dissociation constant of $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3$	1000	d^{-1}	(Reichert et al., 2001)
$k_{\text{eq},2}$	Dissociation constant of $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$	10000	d^{-1}	(Reichert et al., 2001)
$k_{\text{eq},3}$	Dissociation constant of $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$	1000	d^{-1}	(Reichert et al., 2001)
$k_{\text{eq},w}$	Dissociation constant of $\text{H}^+ \leftrightarrow \text{OH}^-$	1000	$\text{g m}^{-1} \text{d}^{-1}$	(Reichert et al., 2001)

Table 6.S4 (Continued). Values for the chemical equilibrium and conversion factors for conservation equation.

Stoichiometric parameters				
$i_{N,ALG}$	Fraction of nitrogen in microalgae	0.060	$g\ N \cdot g\ COD^{-1}$	Calculated from Oswald (1988)
$i_{P,ALG}$	Fraction of phosphorus in microalgae	0.0016	$g\ P \cdot g\ COD^{-1}$	(Ruiz-Martínez et al., 2015)
$i_{C,ALG}$	Fraction of carbon in microalgae	0.3372	$g\ C \cdot g\ COD^{-1}$	Calculated from Oswald (1988)
$i_{TSS,ALG}$	Fraction of total suspended solids in microalgae	0.646	$g\ TSS \cdot g\ COD^{-1}$	Calculated from Oswald (1988)
$i_{N,XI}$	Fraction of nitrogen in X_I	0.01	$g\ N \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{P,XI}$	Fraction of phosphorus in X_I	0.005	$g\ P \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{C,XI}$	Fraction of carbon in X_I	0.025	$g\ C \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{TSS,XI}$	Fraction of total suspended solids in X_I	0.60	$g\ TSS \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{Mg,XPP-ALG}$	Fraction of magnesium in X_{PP-ALG}	0.26	$g\ Mg \cdot g\ P^{-1}$	Calculated from $(K_{0.34}Mg_{0.33}PO_3)_n$
$i_{K,XPP-ALG}$	Fraction of potassium in X_{PP-ALG}	0.42	$g\ K \cdot g\ P^{-1}$	Calculated from $(K_{0.34}Mg_{0.33}PO_3)_n$
$i_{TSS,XPP-ALG}$	Fraction of total suspended solids in X_{PP-ALG}	3.23	$g\ TSS \cdot g\ P^{-1}$	Calculated from $(K_{0.34}Mg_{0.33}PO_3)_n$
$i_{N,SS}$	Fraction of nitrogen in S_S	0.01	$g\ N \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{P,SS}$	Fraction of phosphorus in S_S	0.001	$g\ P \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{C,SS}$	Fraction of carbon in S_S	0.025	$g\ C \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{N,SI}$	Fraction of nitrogen in S_I	0.001	$g\ N \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{P,SI}$	Fraction of phosphorus in S_I	0.001	$g\ P \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
$i_{C,SI}$	Fraction of carbon in S_I	0.03	$g\ C \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
F_{XI}	Fraction of X_I generated microalgae decay	0.25	$g\ COD \cdot g\ COD^{-1}$	Current study
F_{SI}	Fraction of S_I generated microalgae decay	0.6	$g\ C \cdot g\ COD^{-1}$	Current study

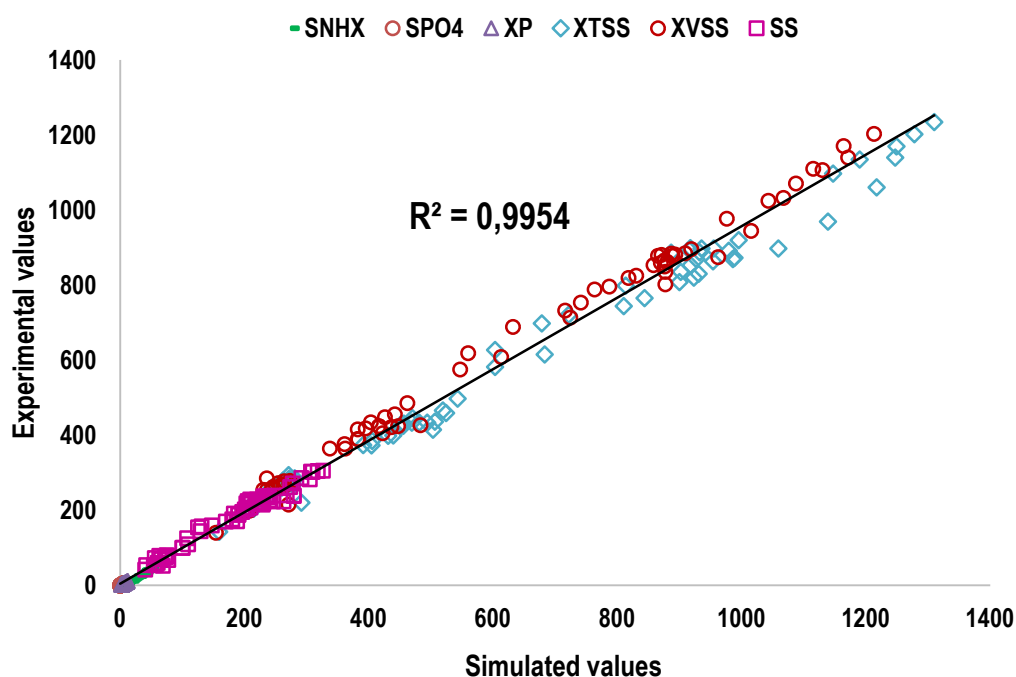


Figure 6.S1. Model validation results using data from an MPBR plant operated at different conditions.

REFERENCES (Supplementary Material)

- Oswald, W.J., 1988. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, pp. 305–328. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387448948115968>
- Reichert, P., Borchardt, D., Henze, M., Rauch, W., Shanahan, P., Somlyódy, L., Vanrolleghem, P., 2001. River Water Quality Model no. 1 (RWQM1): II. Biochemical process equations. *Water Science and Technology* 43(5), 11–30. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0241>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2015. Effect of intracellular P content on phosphate removal in *Scenedesmus* sp. Experimental study and kinetic expression. *Bioresource Technology* 175, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.081>

CAPÍTULO 7

RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

CAPÍTULO 7: RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La tecnología basada en los cultivos de microalgas ha emergido en las últimas décadas como una solución muy interesante para la recuperación de nutrientes y energía de las aguas residuales. No obstante, la mayoría de los estudios existentes se centran en evaluar los cultivos de microalgas a escala laboratorio y en condiciones controladas *indoor*. Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar más estudios con microalgas a mayor escala para evaluar las posibilidades de eliminación de nutrientes y producción de biomasa que permite esta tecnología en condiciones *outdoor*. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral contribuyen a profundizar en el conocimiento de las microalgas en sistemas de cultivo cerrados *outdoor* a escala piloto, y han permitido generar datos experimentales suficientes para la elaboración de un modelo matemático de crecimiento de microalgas.

El efluente de un sistema AnMBR para el tratamiento de agua residual urbana real ha sido catalogado por Ruiz-Martínez et al. (2012) como un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de microalgas en experimentos de laboratorio con iluminación artificial constante, obteniendo resultados prometedores de eliminación de N y P, y producción de biomasa. Los resultados presentados en los **CAPÍTULOS 4 y 5** de esta tesis demuestran que, escalando el proceso de cultivo de microalgas a una planta piloto con fotobiorreactores de placa plana (FBR) de gran volumen, en condiciones *outdoor*, es posible obtener también elevadas eficiencias de recuperación de nutrientes aprovechando la luz solar disponible como fuente de energía y tratando un caudal importante de agua residual.

En el **CAPÍTULO 4** se presenta la operación en semi-continuo de tres FBR de 550 L alimentados con el efluente del sistema AnMBR rico en amonio y fosfato. Durante todos los experimentos realizados, las microalgas de la clase Chlorophyceae fueron predominantes en los cultivos (género *Scenedesmus* sp. > 99%). Este mismo resultado fue observado por Ruiz-Martínez et al. (2012), lo que pone de manifiesto la capacidad de este tipo de microalgas para crecer a partir de agua residual y, en concreto, a partir del efluente de un sistema AnMBR y en condiciones *outdoor*. Esta prevalencia de *Scenedesmus* sp. frente a otros géneros que también han sido ampliamente reportados en

bibliografía en estudios con cultivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales (como sería el caso de *Chlorella* sp.) puede ser debido al ratio N:P del agua residual influente. En este sentido, durante toda la fase de experimentación llevada a cabo en el **CAPÍTULO 4**, el valor medio del ratio N:P del agua residual fue de $8,1 \text{ g N} \cdot \text{g P}^{-1}$, el cual se encuentra dentro del rango $5\text{-}20 \text{ g N} \cdot \text{g P}^{-1}$ que reportaron Xin et al. (2010) como óptimo para *Scenedesmus* sp. Valores inferiores del ratio N:P (agua menos limitada en P) podrían haber favorecido el crecimiento de *Chlorella* sp. en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores como Silva et al. (2015).

Los resultados obtenidos en el **CAPÍTULO 4** muestran que una temperatura media cercana a los 25°C (que es la temperatura óptima normalmente reportada para el género *Scenedesmus* sp.) no resultó ser suficiente para mantener la estabilidad del cultivo de microalgas para un TRH de 8 d debido a los valores bajos de irradiación de luz solar que fueron registrados durante este mismo periodo (valores medios diarios en torno a los $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), lo cual favoreció el lavado de la biomasa en el FBR. Por otro lado, los experimentos realizados mostraron que un aumento del TRH no supone necesariamente un incremento de biomasa en el FBR si este aumento del TRH viene acompañado de un descenso brusco de temperaturas. De esta forma, durante el periodo de experimentación, se incrementó el TRH de 8 a 14 d coincidiendo con un descenso significativo en la temperatura del reactor (de 25 a 15°C), observándose una concentración de biomasa en el FBR más o menos constante en torno a los $200 \text{ mg SSV} \cdot \text{L}^{-1}$. Estos resultados evidencian lo importante que son las condiciones ambientales (luz y temperatura) en el rendimiento de los cultivos de microalgas *outdoor*.

Los mejores resultados de eliminación de nutrientes y producción de biomasa fueron alcanzados cuando las condiciones ambientales se acercaron a los valores óptimos para las microalgas, es decir, una temperatura media diaria en torno a los 25°C y una consecución de días soleados con altos valores de radiación fotosintéticamente activa (PAR), sin ser necesario que la carga de nutrientes en el influente estuviese más alta de lo normal. Bajo estas condiciones, operando a un TRH de 8 d, se alcanzaron unas eliminaciones de amonio y fosfato de $5,84 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y $0,85 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente, y una producción de biomasa de $52,3 \text{ mg SSV L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. También durante este periodo en el que el FBR fue operado a TRH de 8 d, fue posible alcanzar una concentración de nutrientes en el efluente por debajo de los límites de vertido que marca

la Directiva 98/15/CE ($10 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$) estando la concentración de nutrientes en el influente en $40\text{-}50 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ de amonio y $6\text{-}7 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato. Durante este periodo también se observó el mejor rendimiento de eliminación de nutrientes en el FBR, obteniendo un porcentaje de eliminación de 75,2% de N y 77,9% de P durante 24 días trabajando en régimen semi-continuo.

Operando los FBR con un TRH de 8 d, la adición de aliltiourea para conseguir una concentración de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ resultó ser suficiente para inhibir el proceso de nitrificación. Al cambiar las condiciones de operación, aumentando el TRH a 14 d, se observó que la concentración de aliltiourea de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ era insuficiente para el control de la nitrificación ya que se detectó un incremento de la concentración de nitrato en el efluente por la proliferación de bacterias AOB y NOB. Bajo estas condiciones de operación, la concentración de aliltiourea en los FBR tuvo que incrementarse hasta los $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para conseguir inhibir por completo el proceso de nitrificación. Otras alternativas a la adición de aliltiourea hubieran podido ser: (1) reducir la distancia de paso de luz en el FBR de 25 cm a 10 cm para maximizar el aprovechamiento de luz por parte de las microalgas (como llevaron a cabo González-Camejo et al. (2020) en experimentos posteriores con el mismo sistema de FBR); (2) intentar trabajar siempre a TRH inferiores que favorecen el crecimiento de las microalgas versus las bacterias AOB y NOB.

Otro resultado observado en la operación *outdoor* de los FBR fue que una temperatura media del cultivo inferior a los 20°C durante varios días consecutivos produce un descenso significativo en la recuperación de nutrientes. Este efecto negativo de la temperatura afectó de manera más notoria a la producción de biomasa que a la eliminación de nutrientes. El análisis estadístico llevado a cabo mediante regresión de mínimos cuadrados parciales de los datos de entrada (temperatura, luz solar, carga de nutrientes del influente) sobre las variables respuesta (tasas de eliminación de nutrientes y producción de biomasa) ha concluido que la producción de biomasa en los FBR se ve afectada directamente por la temperatura, mientras que la tasa de eliminación de N se ve afectada principalmente por la intensidad de luz que recibe el cultivo. Por otro lado, este análisis estadístico también ha mostrado que la tasa de eliminación de P es directamente proporcional a la carga de P en el agua influente.

A nivel general, con los resultados de recuperación de nutrientes obtenidos en el **CAPÍTULO 4** puede concluirse que la eliminación de nutrientes y la producción de biomasa obtenidos en condiciones *outdoor* son inferiores a los reportados en bibliografía en experimentos a escala laboratorio para cultivos de microalgas de *Scenedesmus* sp. trabajando en condiciones controladas de luz, temperatura y nutrientes. Esto puede deberse a la alta variabilidad de luz solar y temperatura observada en el sistema de FBR operando *outdoor*, lo cual provoca el lavado de la biomasa trabajando en régimen semi-continuo. Sería necesario realizar más experimentos a largo plazo con diferentes condiciones para confirmar este punto.

En el **CAPÍTULO 5** se presenta la operación del mismo sistema cerrado de FBR de 550 L del **CAPÍTULO 4** acoplando tanques de membranas de filtración para conseguir desacoplar el TRC del TRH y conseguir retener la biomasa algal en el sistema. Esta planta piloto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) ha permitido llevar a cabo la operación en continuo del cultivo de microalgas con un aumento de la carga de nutrientes y manteniendo la biomasa en el sistema, lo cual se tradujo en un mejor rendimiento general del proceso.

La operación en continuo de la planta piloto MPBR en condiciones *outdoor* alimentada con el efluente de un sistema AnMBR permitió obtener resultados prometedores de recuperación de nutrientes del agua residual. Los valores máximos de eliminación de nutrientes y productividad de biomasa fueron $7,68 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $1,17 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y $66 \text{ mg SSV L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, los cuales se obtuvieron operando a TRC de 4,5 d y un TRH de entre 3 y 4 d para mantener una carga de nutrientes de $31,5 \text{ g N}\cdot\text{d}^{-1}$ y $4,1 \text{ g P}\cdot\text{d}^{-1}$ en los FBR. Estos valores son considerablemente superiores a los obtenidos durante la operación del sistema de FBR a TRH 8 d (**CAPÍTULO 4**) cuando no se disponía de los tanques de membranas que permiten trabajar a $\text{TRC} > \text{TRH}$.

Uno de los factores evaluados durante la operación en continuo de la planta piloto MPBR fue el sistema de recirculación de microalgas entre el sistema de FBR de 550 L y el tanque de membranas donde se produce la filtración del cultivo. Durante un experimento de 78 días se evaluaron dos tecnologías operando en paralelo: un sistema de bombeo mecánico versus un sistema *airlift*. Los resultados obtenidos muestran que el sistema de recirculación no afecta al rendimiento de los cultivos de microalgas en términos de

eliminación de nutrientes y producción de biomasa tal y como afirman otros autores (p.ej. Scarsella et al. (2012)), al menos para las condiciones testadas en este estudio ($v_{\text{rec}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$). El sistema de recirculación tampoco pareció afectar al género de las microalgas predominantes en el cultivo, ya que en ambas líneas (una con bombeo mecánico y otra con sistema *airlift*) el conteo celular y el análisis morfológico de las microalgas mostró siempre predominancia de *Scenedesmus* sp. (>99%), como ya se obtuvo en los resultados comentados en el **CAPÍTULO 4**. El análisis estadístico por regresión de mínimos cuadrados parciales de los datos obtenidos durante la operación en continuo de 78 días reafirmó el resultado ya comentado de que la producción de biomasa se ve afectada de manera muy significativa por la temperatura. Los resultados muestran que, cuanto mayor es la temperatura, menor es la producción de biomasa. Esto se debe a las altas temperaturas registradas en los FBR durante el periodo de estudio, casi siempre con medias por encima de 28°C, siendo este valor superior a la temperatura óptima para el crecimiento de las microalgas. En concreto, los datos obtenidos hacen indicar que temperaturas medias diarias por encima de los 25°C afectan de manera significativa a la productividad del cultivo. El análisis estadístico también mostró que la producción de biomasa es inversamente proporcional a la temperatura máxima diaria y a la luz solar incidente, lo cual se puede razonar del siguiente modo:

- **Productividad vs Temperatura máxima diaria.** De acuerdo con Tran et al. (2014), las bajas productividades de biomasa obtenidas están asociadas a la termo-inhibición de las células de las microalgas por la exposición a altas temperaturas. En este caso, valores de temperatura registrados en el cultivo durante el mediodía de hasta 38°C se tradujeron en descensos tanto de la eliminación de nutrientes como de producción de biomasa. No obstante, los resultados obtenidos también indican que las altas temperaturas son menos perjudiciales en condiciones de saturación de luz. Sería necesario en el futuro poder desarrollar más experimentos con cultivos de microalgas *outdoor* para analizar técnica y económicamente la viabilidad de esta tecnología en zonas de climas cálidos donde la temperatura en los meses de verano alcanza valores superiores a 30-35°C durante el mediodía. También sería interesante considerar un sistema de refrigeración que permita controlar la temperatura en los cultivos en valores cercanos a la temperatura óptima observada ($\approx 25^\circ\text{C}$).

- **Productividad vs PAR.** La relación inversa obtenida entre luz solar y productividad se asocia al efecto de fotoinhibición producido por los altos valores de luz solar registrados en el cultivo durante este periodo (medias de entre 250-350 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y valores máximos de 1.400 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Otro resultado obtenido del análisis estadístico fue que la tasa de eliminación de P es inversamente proporcional al valor del ratio N:P del agua influente, lo que indica que una mayor carga de P en el influente conseguiría mejorar el rendimiento de recuperación de P por parte de las microalgas.

En el **CAPÍTULO 5** también se analiza el efecto del TRC en el rendimiento de la planta piloto MPBR pues se trata de uno de los parámetros de operación clave en los cultivos de microalgas. Para ello se operó la planta piloto durante 16 días a un TRC de 4,5 d hasta alcanzar un estado pseudo-estacionario, para luego incrementar el TRC a 9 d. Operando a TRC 4,5 d, con valores de luz y temperatura medias más o menos estables con medias de 378 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 28,7°C, la biomasa en los FBR alcanzó los 370 mg SSV·L⁻¹, y la producción de biomasa media obtenida fue de 51,2 mg SSV L⁻¹·d⁻¹. Tras el cambio de TRC a 9d, que fue acompañado de un descenso de los parámetros ambientales hasta los 343 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (con mayor variabilidad que el periodo anterior) y 23,9°C de valores medios, se alcanzó una nueva concentración de sólidos de 471 mg SSV·L⁻¹ y la producción de biomasa media fue de 32,2 mg SSV L⁻¹·d⁻¹. A la vista de estos resultados, puede concluirse que en comparación con el TRC, la luz y la temperatura no tuvieron una influencia tan significativa en el descenso del 37% de la producción de biomasa. Esta reducción de la producción al doblar el TRC pudo deberse al peor aprovechamiento de la luz debido al efecto de auto-sombra (*self-shading*) que supuso el aumento de la concentración de microalgas en el reactor de 370 a 471 mg SSV·L⁻¹. Este mismo efecto también se notó en los valores de eliminación de N y P. Por otro lado, un resultado interesante que se aprecia al analizar la gráfica de la luz solar frente al rendimiento del cultivo de microalgas es que la luz parece tener un efecto a corto plazo sobre la eliminación de N y P, mientras que el efecto de este mismo parámetro ambiental sobre la producción de biomasa parece tener un efecto más dilatado en el tiempo. Una medida interesante para tratar de optimizar el rendimiento de los cultivos de microalgas podría

ser en un futuro desarrollar un control automatizado del TRC del sistema de manera que el valor de este parámetro pudiese variar en función de las condiciones ambientales *outdoor*.

Fue durante este periodo de experimentación descrito operando a TRC de 4,5 d cuando se registraron los valores más altos de eliminación de nutrientes ($7,68 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $1,17 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) y productividad de biomasa ($66 \text{ mg SSV L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Esta producción de biomasa, en términos de superficie de los FBR de placa plana que conforman la planta piloto, equivale a $15,78 \text{ g SSV m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$, siendo este valor superior a los obtenidos en otros estudios a escala piloto en sistemas abiertos tipo *raceway* (p.ej. Arbib et al., (2013); Van Den Hende et al., (2014)).

Por otro lado, en el **CAPÍTULO 5** también se presenta un experimento llevado a cabo en la planta piloto MPBR para estudiar el efecto que tiene el volumen de microalgas en zona oscura (es decir, aquel volumen sin luz y, por tanto, sin actividad fotosintética) sobre el rendimiento del cultivo de microalgas. El experimento consistió en el análisis de dos periodos en los que se operó la planta MPBR con dos volúmenes distintos de los tanques de membrana, que se corresponden con el volumen de zona oscura (V_O), frente al volumen en zona iluminada (V_I) que corresponde con los FBR. El primer periodo estudiado fue con un 27,2% del volumen total en zona oscura, mientras que el segundo fue con un 13,6%. Hay que remarcar que, en ambos periodos evaluados, el resto de condiciones de operación y ambientales no tuvieron un efecto significativo ya que permanecieron prácticamente constantes. Los resultados obtenidos mostraron que una reducción a la mitad del volumen en zona oscura supuso un incremento del 40% en la productividad de biomasa. Este resultado se encuentra alineado con Richmond (2000), quien reportó que el porcentaje de V_O óptimo para los cultivos de microalgas es del 15%.

En el **CAPÍTULO 6** se presenta un modelo matemático para simular el crecimiento de microalgas junto con los procesos de toma de N y P asociados a dicho crecimiento. El modelo se desarrolló utilizando la notación y terminología habitualmente utilizadas en los modelos de fangos activados ASM (Activated Sludge Models) de Henze et al. (2000).

El modelo considera un total de 14 componentes (10 solubles y 4 suspendidos). Los componentes solubles en cuestión son: oxígeno disuelto (S_{O_2}), nitrógeno amoniacal

(S_{NHx}), nitrato (S_{NO3}), fosfato (S_{PO4}), carbono inorgánico ($S_{Ig,C}$), protones (S_H), magnesio (S_{Mg}), potasio (S_K), materia orgánica rápidamente biodegradable (S_S) y materia orgánica inerte (S_I). Por otro lado, los componentes particulados que considera el modelo son: microalgas (X_{ALG}), polifosfato almacenado intracelularmente por las microalgas (X_{PP-ALG}), materia orgánica inerte (X_I) y sólidos suspendidos no volátiles del influente (X_{NVSS}). Las asunciones sobre las que se basa la elección de componentes son:

- El modelo se centra en las microalgas, por lo que no se han considerado ni las bacterias heterótrofas, ni las bacterias nitrificantes (AOB y NOB).
- El modelo considera como fuentes de N para el crecimiento de las microalgas el amonio y el nitrato, despreciando el crecimiento a partir de nitrito.
- El modelo no considera la materia orgánica suspendida biodegradable, asumiendo que se produce la hidrólisis inmediata de la misma.
- El modelo incluye los componentes carbono inorgánico y protones para poder estimar las variaciones de pH en el medio de cultivo. Tal y como se comentó en el **CAPÍTULO 1** de Introducción, el consumo de CO_2 por parte de las microalgas provoca importantes variaciones de pH en el medio. En muchas ocasiones, como en la experimentación desarrollada en esta tesis, se inyecta una corriente de CO_2 en el sistema para fomentar el crecimiento de las microalgas y controlar el pH del medio de cultivo. La metodología utilizada para el cálculo del pH en modelos biológicos fue propuesta por Serralta et al. (2004).
- El modelo considera que todo el N que toman las microalgas se encuentra formando parte del tejido celular. Por lo que respecta al P, este nutriente forma parte del tejido celular pero también es almacenado por las microalgas en forma de polifosfato ($K_{0,34}Mg_{0,33}PO_3$).
- Aunque los sólidos suspendidos no volátiles no participan en ningún proceso biológico, el modelo los incluye porque deben ser considerados en los procesos de sedimentación o cosechado de las microalgas y para estimar la concentración de sólidos suspendidos en el sistema que afecta a la intensidad de luz disponible (*self-shading*).

- El modelo permite calcular las concentraciones de sólidos suspendidos totales (X_{TSS}) y sólidos suspendidos volátiles (X_{VSS}) a partir de las concentraciones de todos los componentes suspendidos y sus respectivos factores de conversión:

$$X_{TSS} = X_{PP-ALG} \cdot i_{TSS,XPP-ALG} + X_{ALG} \cdot i_{TSS,ALG} + X_I \cdot i_{TSS,XI} + X_{NVSS} \quad (\text{Ec. 7.1})$$

$$X_{VSS} = X_{ALG} \cdot i_{TSS,ALG} + X_I \cdot i_{TSS,XI} \quad (\text{Ec. 7.2})$$

- La composición de las algas se asume constante según la fórmula molecular ($C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$) propuesta por Oswald (1988).

El modelo considera dos tipos de procesos: los procesos gobernados por la cinética que tienen lugar a una velocidad determinada (procesos bioquímicos y físicos) y los procesos gobernados por el equilibrio que tienen lugar de forma instantánea (reacciones ácido-base). El modelo considera 11 procesos gobernados por la cinética que son: crecimiento de microalgas a partir de nitrógeno amoniacal y ortofosfato presentes en el medio, crecimiento de microalgas a partir de nitrato y ortofosfato presente en el medio, crecimiento de microalgas a partir de nitrógeno amoniacal y polifosfato almacenado intracelularmente, crecimiento de microalgas a partir de nitrato y polifosfato almacenado intracelularmente, almacenamiento de polifosfato, respiración endógena, lisis de las microalgas, lisis del polifosfato y tres procesos de desabsorción de los gases considerados (CO_2 , O_2 y NH_3). Los procesos gobernados por el equilibrio son las reacciones ácido-base correspondientes a los equilibrios del amonio, bicarbonato y ortofosfato. Las principales asunciones sobre las que se basan los procesos considerados son:

- El modelo se centra en el metabolismo fotoautótrofo de las microalgas, por lo que no considera que puedan crecer a partir de compuestos orgánicos presentes en el agua.
- El modelo considera cuatro procesos de crecimiento de microalgas en función de la fuente de N (amonio o nitrato) y la fuente de P (ortofosfato presente en el medio o polifosfato almacenado intracelularmente). La preferencia que tienen las microalgas por el amonio frente al nitrato se refleja en la cinética de los procesos de crecimiento con nitrato, que están inhibidos por el amonio. La cinética de estos

procesos también incluye un factor de reducción velocidad porque el nitrato debe ser reducido intracelularmente a amonio. De forma análoga, los procesos de crecimiento de microalgas utilizando las reservas de polifosfato están inhibidos por la concentración de ortofosfato presente en el medio.

- La lisis de las microalgas produce materia orgánica suspendida no biodegradable (X_I), materia orgánica soluble no biodegradable (S_I) y materia orgánica soluble biodegradable (S_S) asumiendo la hidrólisis inmediata. Además de esta lisis, el modelo considera un proceso de respiración endógena que reduce X_{ALG} . En este proceso, las microalgas oxidan su tejido celular consumiendo O_2 .

El efecto de los distintos factores ambientales se refleja en las expresiones cinéticas de la siguiente forma:

- **Luz.** La luz desempeña un papel muy importante en la actividad de las microalgas. El modelo desarrollado utiliza la ecuación de Steele (Ec. 7.3) para simular el efecto de este parámetro. Para modelar la dispersión de la luz en el agua, se considera la Ley de Beer-Lambert (Ec. 7.4):

$$f_L = \frac{I_{av}}{I_{opt}} \cdot e^{\left(1 - \frac{I_{av}}{I_{opt}}\right)} \quad (\text{Ec. 7.3})$$

$$I_{av} = \frac{I_{0,s} \cdot (1 - e^{-(k_w + k_b \cdot X_{TSS}) \cdot d})}{(k_w + k_b \cdot X_{TSS}) \cdot d} \quad (\text{Ec. 7.4})$$

- **pH.** Para el cálculo del pH, el modelo propone el cálculo del equilibrio químico utilizando el software MINTQA2. El efecto del pH sobre la velocidad de los procesos biológicos se modela mediante la combinación de la cinética de Monod y de la inhibición no competitiva (Ec. 7.5):

$$f_{pH} = \frac{\frac{S_H}{S_H + K_{S,H}} \cdot \frac{K_{I,H}}{S_H + K_{I,H}}}{\frac{S_{H,opt}}{S_{H,opt} + K_{S,H}} \cdot \frac{K_{I,H}}{S_{H,opt} + K_{I,H}}} \quad (\text{Ec. 7.5})$$

- **Temperatura.** La dependencia de la velocidad de los procesos con la temperatura se modela mediante la ecuación propuesta por Ratkowsky (Ec. 7.6):

$$f_T = (b \cdot (T_0 - T_{\text{MIN}}))^2 \cdot (1 - e^{c \cdot (T_0 - T_{\text{MAX}})}) \quad (\text{Ec. 7.6})$$

Para la calibración y validación del modelo, éste se introdujo en MATLAB donde se modificó el código del software MINTEQA2 compilándolo en forma de subrutina (DLL) para poder ser ejecutado desde MATLAB. En esta calibración se utilizaron parte de los resultados obtenidos en el **CAPÍTULO 5**.

El modelo matemático desarrollado en esta tesis consta de un total de 32 parámetros. Inicialmente, para determinar los parámetros del modelo de mayor influencia, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad mediante el método de Morris. Este análisis concluyó que los parámetros que mayor influencia tienen en las variables respuesta del modelo son: la velocidad máxima de crecimiento de las microalgas (μ_{ALG}), la velocidad máxima de muerte ($b_{\text{ALG},2}$), la velocidad máxima de almacenamiento polifosfato (q_{XPP}), las constantes de semisaturación del nitrógeno amoniacal tanto en condiciones de abundancia (K_{NHX}) como ausencia ($K_{\text{NHX-}q_{\text{XPP}}}$) de P en el medio, la constante de semisaturación del fosfato (K_{PO4}), la constante de inhibición para la toma de polifosfato en condiciones de abundancia de P ($K_{\text{I,PO4}}$), la temperatura máxima (T_{MAX}) y mínima (T_{MIN}) para el crecimiento de las microalgas (fórmula de Ratkowsky), la intensidad de luz óptima para el crecimiento (I_{OPT}), el coeficiente de atenuación de los sólidos suspendidos (K_{I}), y los coeficientes de transferencia de masa para el O_2 , CO_2 y NH_3 ($K_{\text{La,O}_2}$, $K_{\text{La,CO}_2}$ y $K_{\text{La,NH}_3}$, respectivamente). A continuación, se llevó cabo una calibración dinámica de 19 de parámetros utilizando datos experimentales obtenidos en la planta piloto MPBR. El resto de los parámetros (13) fueron fijados a partir de valores extraídos de la bibliografía.

Los valores calibrados de las velocidades μ_{ALG} , $b_{\text{ALG},2}$ y q_{XPP} fueron $1,8 \text{ d}^{-1}$, $0,15 \text{ d}^{-1}$ y $0,01 \text{ d}^{-1}$, los cuales se encuentran dentro de los rangos reportados en bibliografía por otros autores. El valor obtenido para la constante de semisaturación K_{PO4} fue de $0,05 \text{ g P} \cdot \text{m}^{-3}$, también se encuentra en consonancia con los valores consultados en la bibliografía. Los valores calibrados para las constantes de semisaturación del nitrógeno amoniacal fueron K_{NHX} de $0,1 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-3}$ y $K_{\text{NHX-}q_{\text{XPP}}}$ de $3 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-3}$, lo cual sugiere que el crecimiento bajo

condiciones de ausencia de P en el medio tiene una constante $K_{\text{NHX-qXPP}}$ mayor que cuando el crecimiento sucede en condiciones de abundancia de P (K_{NHX}) tal y como observaron Ruiz-Martínez et al. (2014) en sus experimentos de laboratorio. Por último, los parámetros de las funciones de temperatura y luz introducidas en el modelo que se calibraron fueron T_{MAX} de 40°C, T_{MIN} de 0°C, I_{OPT} de 230 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y k_b de 0,025 $\text{m}^2\cdot\text{SST}^{-1}$.

Para comprobar la validez del modelo desarrollado y la metodología de calibración utilizada, así como su capacidad de predicción del rendimiento de cultivos de microalgas, se ha simulado el funcionamiento de la planta MPBR descrita anteriormente utilizando cuatro periodos de funcionamiento en continuo bajo condiciones de operación y ambientales distintas a las utilizadas para la calibración del modelo. Las condiciones de operación de estos cuatro periodos se diferencian entre ellos porque varían algunos de los parámetros como son: la concentración de amonio, la concentración de fosfato (se evaluaron condiciones distintas de abundancia y ausencia de P), la concentración de P suspendido y la concentración de sólidos suspendidos totales (SST). Las condiciones ambientales (luz solar y temperatura) permanecieron variables de acuerdo con la naturaleza *outdoor* de la planta piloto, donde además hubo un apoyo de luz artificial constante iluminando los FBR de 300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Además de las condiciones de operación y ambientales, la validación se llevó a cabo utilizando dos anchuras (o distancias del paso de luz) de los FBR de 25 cm y 10 cm para comprobar la capacidad del modelo de predecir la concentración de sólidos suspendidos y el efecto de este parámetro en la disponibilidad de la luz del cultivo. Estas simulaciones se realizaron utilizando los valores de los parámetros obtenidos anteriormente en la calibración del modelo.

Los resultados obtenidos demuestran que el modelo calibrado fue capaz de predecir adecuadamente el funcionamiento de la planta MPBR en los distintos periodos, independientemente de las condiciones de operación y la variabilidad ambiental registrada en la planta. El modelo consigue representar adecuadamente los procesos de toma de P, reproduciendo fielmente los valores observados tanto de las concentraciones de este compuesto en el efluente como de las concentraciones de polifosfato almacenado. La capacidad del modelo de simular la cantidad de polifosfato almacenado intracelularmente por parte de las microalgas es una de las aportaciones más interesantes

de este modelo que no se ha encontrado en otros modelos de crecimiento de microalgas consultados en la bibliografía. Este buen ajuste para el P se consiguió tanto en periodos con elevados rendimientos de eliminación ($\text{PO}_4^{3-} < 0,1 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$) como en periodos con significativas variaciones del rendimiento ($1 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1} < \text{PO}_4^{3-} < 5 \text{ mg P}\cdot\text{L}^{-1}$). La concentración de amonio en el efluente osciló entre 0 y 50 $\text{mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ y sus variaciones fueron reproducidas también fielmente por el modelo desarrollado. Además de la eliminación de nutrientes, el modelo simuló perfectamente las variaciones observadas en la concentración de SST y sólidos suspendidos volátiles (SSV), que son variables muy importantes para poder predecir la productividad de biomasa del cultivo y el aprovechamiento de la biomasa algal en un teórico post-tratamiento de esta biomasa (p.ej. producción de biogás mediante digestión anaerobia). Además, la concentración de SST de un cultivo es un parámetro que es importante controlar ya que tiene gran influencia en el aprovechamiento de la luz puesto que interviene en el efecto de auto-sombra (*self-shading*) de las microalgas.

Al comparar gráficamente y de forma global más de 400 pares de datos (resultados experimentales vs predicción del modelo), se obtuvo un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9954$, lo que resalta la enorme capacidad de predicción que posee el modelo matemático desarrollado y la bondad de la calibración realizada.

Disponer de un modelo matemático de crecimiento de microalgas fiable y calibrado es de vital importancia para el diseño y optimización de los sistemas de cultivo de microalgas y poder predecir su capacidad de recuperación de nutrientes de las aguas residuales. El modelo desarrollado en esta tesis pretende ser una herramienta para facilitar la implementación futura de esta tecnología en una EDAR a escala industrial, de manera que sea más fácil determinar la combinación de los parámetros operacionales y ambientales que permiten maximizar la producción de biomasa y cumplir los requisitos de N y P de los vertidos a áreas sensibles.

REFERENCIAS

- 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. *Ecol. Eng.* 52, 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.089>
- González-Camejo, J., Aparicio, S., Jiménez-Benítez, A., Pachés, M., Ruano, M.V., Borrás, L., Barat, R., Seco, A., 2020. Improving membrane photobioreactor performance by reducing light path: operating conditions and key performance indicators. *Water Res.* 172, 115518. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115518>
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M., 2000. Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780402369>
- Oswald, W.J., 1988. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge Univ. Press, pp. 305–328. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573387448948115968>
- Richmond, A., 2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. *Journal of Applied Phycology* 12, 441–451. <https://doi.org/10.1023/A:1008123131307>
- Ruiz-Martínez, A., Martín García, N., Romero, I., Seco, A., Ferrer, J., 2012. Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour. Technol.* 126, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Pachés, M., Seco, A., Ferrer, J., 2014. Mixed microalgae culture for ammonium removal in the absence of phosphorus: Effect of phosphorus supplementation and process modeling. *Process Biochem.* 49, 2249–2257. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.002>
- Scarsella, M., Torzillo, G., Ciccì, A., Belotti, G., De Filippis, P., Bravi, M., 2012. Mechanical stress tolerance of two microalgae. *Process Biochem.* 47, 1603-1611. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.002>
- Serralta, J., Ferrer, J., Borrás, L., Seco, A., 2004. An extension of ASM2d including pH calculation. *Water Res.* 38, 4029–4038. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.009>
- Silva, N.F.P., Gonçalves, A.L., Moreira, F.C., Silva, T.F.C.V., Martins, F.G., Alvim-Ferraz, M.C.M., Boaventura, R.A.R., Vilar, V.J.P., Pires, J.C.M., 2015. Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. *Algal Res.* 11, 350-358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.014>

- Tran, K.C., Mendoza Martin, J.L., Heaven, S., Banks, C.J., Acien-Fernández, F.G., Molina-Grima, E., 2014. Cultivation and anaerobic digestion of *Scenedesmus* spp. grown in a pilot-scale open raceway. *Algal Res.* 5, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.06.001>
- Van Den Hende, S., Beelen, V., Bore, G., Boon, N., Vervaeren, H., 2014. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresour. Technol.* 159, 342-354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.113>
- Xin, L., Hong-Ying, H. Ke, G., Ying-xue, Z., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 5494-5500. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES

A continuación se detallan las principales conclusiones obtenidas en esta tesis doctoral que trata sobre la operación y modelación de una planta piloto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) para el tratamiento de agua residual, en concreto el efluente de un sistema AnMBR para el tratamiento de agua residual doméstica real. Las conclusiones se han clasificado en tres grupos que se corresponden con los capítulos de resultados presentados en la tesis.

Operación en semi-continuo de una planta piloto de fotobiorreactores (FBR) de placa plana en condiciones *outdoor*:

- El género de microalgas *Scenedesmus* sp. fue el género predominante durante todos los experimentos (> 99%).
- Los mejores resultados de eliminación de nutrientes y producción de biomasa se alcanzaron para un TRH de 8 d cuando las condiciones ambientales se acercaron a los valores óptimos para las microalgas, esto es, una temperatura media diaria en torno a los 25°C y una consecución de días soleados con altos valores de radiación fotosintéticamente activa (PAR). La eliminación de nutrientes en estas condiciones alcanzó valores máximos de 5,84 mg N·L⁻¹·d⁻¹ y 0,85 mg P·L⁻¹·d⁻¹, y una producción de biomasa de 52,3 mg SSV L⁻¹·d⁻¹.
- Operando el sistema de FBR con un TRH de 8 d y en condiciones ambientales favorables fue posible alcanzar una concentración de nutrientes en el efluente por debajo de los límites de vertido que marca la Directiva 98/15/CE (10 mg N·L⁻¹ y 1 mg P·L⁻¹), obteniéndose rendimientos de eliminación de nutrientes de 75,2% de N y 77,9% de P.
- Operando el sistema de FBR con un TRH de 8 d fue necesario mantener una concentración de alitiourea de 5 mg·L⁻¹ en el cultivo para inhibir el crecimiento de las bacterias AOB y NOB, evitando así que se produjera el proceso de nitrificación. No obstante, para un TRH de 14 d la concentración de alitiourea necesaria tuvo que ser incrementada hasta los 10 mg·L⁻¹ para el control de la nitrificación.

- El análisis global de los datos de la operación *outdoor* pone de manifiesto la importancia de las condiciones ambientales (luz y temperatura) en el rendimiento de los cultivos de microalgas. La temperatura resultó ser un parámetro que tiene un efecto significativo a largo plazo en la producción de biomasa, mientras que la luz solar mostró un efecto significativo a corto plazo en la eliminación de nutrientes.

Operación en continuo de una planta piloto de fotobiorreactores de membrana (MPBR) en condiciones *outdoor*:

- El género de microalgas *Scenedesmus* sp. continuó siendo el predominante durante toda la fase de experimentación de la planta MPBR (> 99%).
- Los sistemas de recirculación del cultivo de microalgas que se compararon durante los experimentos (bombeo mecánico vs sistema *airlift*) no afectaron significativamente al rendimiento de los cultivos de microalgas en términos de eliminación de nutrientes y producción de biomasa.
- Introduciendo los tanques de membranas de filtración al sistema de FBR se consiguió desacoplar el TRC del TRH, lo que resultó en una mejora general del rendimiento del cultivo de microalgas. En condiciones ambientales favorables, los valores máximos de eliminación de nutrientes y producción de biomasa fueron $7,68 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $1,17 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ y $66 \text{ mg SSV L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, trabajando con TRC de 4,5 d y un TRH de entre 3 y 4 d para mantener una carga de nutrientes de $31,5 \text{ g N} \cdot \text{d}^{-1}$ y $4,1 \text{ g P} \cdot \text{d}^{-1}$ en los FBR.
- La temperatura resultó ser un parámetro que afecta significativamente a la producción de biomasa. Los resultados obtenidos indican que temperaturas medias diarias por encima de los 25°C afectan negativamente a la productividad del cultivo.
- Una reducción a la mitad del volumen en zona oscura del cultivo de microalgas (del 27,2% al 13,6% sobre el volumen total del cultivo) resultó en un incremento del 40% en la productividad de biomasa.

- El efluente de la planta MPBR resultó ser un agua con bajo contenido de nutrientes, libre de SS y patógenos, con un gran potencial de reutilización.

Desarrollo de un modelo matemático de crecimiento de microalgas para la recuperación de nutrientes de las aguas residuales:

- Se ha desarrollado un modelo para simular el crecimiento de microalgas utilizando la notación y terminología de los modelos ASM (Activated Sludge Models). El modelo considera un total de 14 componentes (10 solubles y 4 suspendidos) y un total de 11 procesos gobernados por la cinética. Además, el modelo incluye un cálculo del equilibrio ácido-base para predecir el C inorgánico disuelto y el pH.
- Como novedad interesante respecto a otros modelos de crecimiento de microalgas ya publicados, este modelo matemático contempla el crecimiento de las microalgas a partir del almacenamiento interno de polifosfato en condiciones de ausencia de P en el medio de cultivo.
- El análisis de sensibilidad (Método de Morris) de los 32 parámetros del modelo concluyó que los parámetros de mayor influencia son: la velocidad máxima de crecimiento de las microalgas, la velocidad máxima de muerte, la velocidad máxima de almacenamiento polifosfato, las constantes de semisaturación del nitrógeno amoniacal tanto en condiciones de abundancia como ausencia de P en el medio, la constante de semisaturación del fosfato, la constante de inhibición para la toma de polifosfato en condiciones de abundancia de P, la temperatura máxima y mínima para el crecimiento de las microalgas, la intensidad de luz óptima para el crecimiento, el coeficiente de atenuación de los sólidos suspendidos, y los coeficientes de transferencia de masa para el O₂, CO₂ y NH₃.
- Los resultados obtenidos demuestran que el modelo calibrado fue capaz de predecir adecuadamente el funcionamiento de la planta MPBR (concentraciones de N, P, SS, polifosfato almacenado intracelularmente, etc.) en los distintos

periodos, independientemente de las condiciones de operación aplicadas y la variabilidad ambiental registrada en la planta.

- La recta de regresión de los 400 pares de datos obtenidos (experimentales vs predicción del modelo) presentó un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,9954$, lo que resalta la enorme capacidad de predicción que posee el modelo matemático desarrollado y la bondad de la calibración realizada.