



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS DE CAMINOS,
CANALES Y PUERTOS



Máster en Ingeniería Ambiental

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

*Estudio a escala piloto del efecto de diferentes
condiciones de operación sobre la eliminación de
nutrientes en un cultivo de microalgas*

Héctor Lores Subirats

Septiembre 2015

Tutor: Aurora Seco Torrecillas

Cotutor: Freddy Durán Pinzón

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 11 |
| RESUM..... | 13 |
| SUMMARY | 15 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 19 |
| 1.1 Legislación aplicable..... | 21 |
| 1.2 Efectos del vertido no controlado de aguas residuales | 21 |
| 1.3 Tratamientos convencionales de las aguas residuales urbanas | 22 |
| 1.4 Tratamientos alternativos de aguas residuales urbanas | 24 |
| 1.4.1 Procesos anaerobios | 24 |
| 1.4.2 Depuración natural..... | 25 |
| 1.5 Cultivos de microalgas..... | 26 |
| 1.5.1 Clasificación de las microalgas | 28 |
| 1.6 Aplicación de las microalgas..... | 32 |
| 1.6.1 Energía..... | 32 |
| 1.6.2 Industria alimentaria | 35 |
| 1.6.3 Depuración de aguas..... | 35 |
| 1.7 Factores que determinan el crecimiento de las microalgas | 37 |
| 1.7.1 Luz | 37 |
| 1.7.2 Temperatura..... | 39 |
| 1.7.3 pH | 40 |
| 1.7.4 Salinidad | 41 |
| 1.7.5 Agitación..... | 41 |
| 1.7.6 Nutrientes..... | 42 |
| 1.7.7 Oxígeno | 44 |
| 1.7.8 Competencia con otros organismos..... | 45 |
| 1.7.9 Modo de operación | 46 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.8 | Producción en masa de microalgas..... | 48 |
| 1.8.1 | Estanques o canales abiertos | 49 |
| 1.8.2 | Fotobioreactores | 51 |
| 1.8.3 | Criterios de diseño de los fotobioreactores | 55 |
| 1.9 | Separación y post-tratamiento de las algas producidas | 56 |
| 1.9.1 | Separación..... | 56 |
| 1.9.2 | Post-tratamiento | 57 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 63 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 67 |
| 3.1 | Planta piloto: Fotobioreactor de membranas..... | 67 |
| 3.2 | Operación y mantenimiento | 70 |
| 3.2.1 | Toma de muestra | 70 |
| 3.2.2 | Alimentación, purga y TRC | 70 |
| 3.2.3 | Limpieza y mantenimiento de los FBR | 71 |
| 3.2.4 | Inhibición del crecimiento de bacterias nitrificantes..... | 71 |
| 3.3 | Características del alimento: efluente de SANMBR y agua residual artificial | 72 |
| 3.4 | Medición de nutrientes..... | 73 |
| 3.5 | Seguimiento del crecimiento poblacional..... | 74 |
| 3.5.1 | Determinación de sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) | 74 |
| 3.5.2 | Recuento de las poblaciones fitoplanctónicas | 75 |
| 4. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 79 |
| 4.1 | Diseño experimental | 79 |
| 4.2 | Ensayo 1: Estudio de la eficacia de un alimento artificial sobre el crecimiento de las microalgas | 79 |
| 4.2.1 | Resultados y discusión del Ensayo 1 | 80 |
| 4.3 | Ensayo 2: Estudio de la influencia del tamaño de burbuja en el sistema de aireación sobre el crecimiento de las microalgas..... | 82 |
| 4.3.1 | Resultados y discusión del Ensayo 2 | 82 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.4 | Ensayo 3: Influencia de la variación de temperatura sobre el crecimiento de las microalgas | 93 |
| 4.4.1 | Resultados y discusión del Ensayo 3 | 93 |
| 4.5 | Ensayo 4: Influencia de la intensidad de luz artificial sobre el crecimiento de las microalgas | 100 |
| 4.5.1 | Resultados y discusión del Ensayo 4 | 101 |
| 5. | CONCLUSIONES | 111 |
| 5.1 | Trabajos futuros | 113 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 119 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Relación de legislación aplicable a las aguas residuales..... | 21 |
| Tabla 2. Composición química de diferentes especies de microalgas | 27 |
| Tabla 3. Porcentaje de macronutrientes (en peso seco) en diferentes grupos de algas | 28 |
| Tabla 4. Rendimientos de producción de biodiesel con diferentes materias primas..... | 33 |
| Tabla 5. Concentración de NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-} en el alimento durante los ensayos | 72 |
| Tabla 6. Métodos utilizados para la medición de nutrientes en el analizador automático..... | 73 |
| Tabla 7. Distribución de ensayos realizados durante todo el período experimental | 79 |
| Tabla 8. Concentraciones promedio de amonio en el Ensayo 2 | 85 |
| Tabla 9. Concentraciones promedio de fosfato en el Ensayo 2 | 86 |
| Tabla 10. Rendimientos de eliminación de amonio en el Ensayo 2..... | 87 |
| Tabla 11. Rendimientos de eliminación de fosfato en el Ensayo 2..... | 88 |
| Tabla 12. Concentración promedio de sólidos en suspensión en el Ensayo 2..... | 89 |
| Tabla 13. Valores del recuento de especies durante la segunda etapa del Ensayo 2..... | 92 |
| Tabla 14. Concentración promedio de nutrientes en el Ensayo 3 | 96 |
| Tabla 15. Rendimientos de eliminación en el Ensayo 3 | 97 |
| Tabla 16. Concentración promedio de sólidos en suspensión en el Ensayo 3..... | 98 |
| Tabla 17. Eliminación de nutrientes por unidad de biomasa durante el Ensayo 3..... | 100 |
| Tabla 18. Concentración promedio de nutrientes en el Ensayo 4 | 103 |
| Tabla 19. Rendimientos de eliminación en el Ensayo 4 | 104 |
| Tabla 20. Concentración de SST y %SSV durante el Ensayo 4 | 105 |
| Tabla 21. Resultados de los recuentos poblacionales realizados durante el Ensayo 4 | 107 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Evolución de la población mundial..... | 19 |
| Figura 2. Esquema de tratamiento de aguas en una planta convencional | 23 |
| Figura 3. Ejemplos de cianofíceas: <i>Anabaena</i> (1), <i>Espirulina</i> (2), <i>Nostoc</i> (3) y <i>Oscillatoria</i> (4)... | 29 |
| Figura 4. Ejemplos de rodofíceas | 29 |
| Figura 5. Ejemplos de diatomeas | 30 |
| Figura 6. Clorofíceas: <i>Pediastrum</i> (izquierda), <i>Chlorella</i> (centro), <i>Scenedesmus</i> (derecha)..... | 31 |
| Figura 7. Visualización de las diferentes formas de agrupación de <i>Scenedesmus</i> | 31 |
| Figura 8. Espectro de radiación..... | 38 |
| Figura 9. Efecto de la intensidad lumínica sobre la actividad fotosintética..... | 38 |
| Figura 10. Predicciones matemáticas para la eliminación de amonio en función de la temperatura: (a) modelo de Ratwosky, (b) modelo CMTI. | 40 |
| Figura 11. Representación gráfica de las fases de crecimiento en un cultivo en <i>batch</i> | 47 |
| Figura 12. Laguna natural utilizada por la tribu Kanembu para el cultivo de microalgas..... | 49 |
| Figura 13. Ejemplos de canales de cultivo de microalgas | 51 |
| Figura 14. Esquema y fotografía de un fotobioreactor tubular de disposición de serpentín..... | 52 |
| Figura 15. Sistema alveolar | 53 |
| Figura 16. Ejemplos de instalaciones de fotobioreactores planos..... | 53 |
| Figura 17. Fotobioreactores verticales, disposición de columna..... | 54 |
| Figura 18. Fotobioreactores cilíndricos verticales, disposición de mangas | 55 |
| Figura 19. Perspectiva de la planta en general y detalle de un FBR | 67 |
| Figura 20. Lámparas del sistema de iluminación y cinta métrica para el cálculo de volumen ... | 68 |
| Figura 21. Imagen del módulo de control de las sondas SC 1000 y DI..... | 69 |
| Figura 22. Fotografía y diagrama de flujo del reactor anaerobio de membranas SAnMBR | 70 |
| Figura 23. Evolución de la concentración de amonio durante el Ensayo 1 | 80 |
| Figura 24. Evolución de la concentración de fosfato durante el Ensayo 1 | 81 |
| Figura 25. Evolución de la temperatura en los FBR en el Ensayo 2 | 83 |
| Figura 26. Representación de pH, TRC, NO_2^- y NO_3^- en los FBR en el Ensayo 2..... | 84 |
| Figura 27. Evolución de la concentración de nutrientes en los FBR en el Ensayo 2 | 85 |
| Figura 28. Rendimientos de eliminación de amonio en el Ensayo 2..... | 86 |
| Figura 29. Rendimientos de eliminación de fosfato en el Ensayo 2 | 87 |
| Figura 30. Concentración de sólidos suspendidos en los FBR durante el Ensayo 2..... | 88 |
| Figura 31. Estado final del FBR-1 al final de la primera etapa del Ensayo 2 | 90 |
| Figura 32. FBR-1 en el microscopio óptico (día 66 de experimentación) | 91 |

| | |
|---|-----|
| Figura 33. FBR-2 en el microscopio óptico (día 66 de experimentación) | 91 |
| Figura 34. Parámetros de operación controlados durante el Ensayo 3 | 94 |
| Figura 35. Evolución de temperaturas durante el Ensayo 3 | 95 |
| Figura 36. Concentración de nutrientes en el Ensayo 3..... | 95 |
| Figura 37. Rendimientos de eliminación de amonio durante el Ensayo 3..... | 96 |
| Figura 38. Rendimientos de eliminación de fósforo durante el Ensayo 3 | 97 |
| Figura 39. Concentración de sólidos suspendidos y porcentaje de volátiles en el Ensayo 3..... | 98 |
| Figura 40. Eliminación de amonio por unidad de biomasa durante el Ensayo 3 | 99 |
| Figura 41. Eliminación de fosfato por unidad de biomasa durante el Ensayo 3..... | 99 |
| Figura 42. Parámetros de operación controlados durante el Ensayo 4..... | 101 |
| Figura 43. Evolución de la temperatura en los FBR durante el Ensayo 4..... | 102 |
| Figura 44. Concentración de nutrientes en el Ensayo 4..... | 103 |
| Figura 45. Rendimientos de eliminación de amonio en el Ensayo 4..... | 104 |
| Figura 46. Rendimientos de eliminación de fosfato durante el Ensayo 4..... | 105 |
| Figura 47. Concentración de sólidos suspendidos y porcentaje de volátiles en el Ensayo 4.... | 106 |

RESUMEN

El ritmo de crecimiento de la población en las últimas décadas, el desarrollo tecnológico y los cambios en el modo de vida de la sociedad están afectando negativamente a la calidad y la disponibilidad de los recursos naturales disponibles, entre ellos el agua. El modelo de gestión hídrica actual está obsoleto, por lo que es necesario un cambio generalizado en el que se tenga en cuenta la necesidad de tratamiento y recuperación las aguas contaminadas tras su utilización. A su vez, las técnicas a aplicar deben estar basadas en la sostenibilidad tanto económica como medioambiental, siendo una de estas opciones alternativas la utilización de cultivos de microalgas.

Las microalgas tienen la capacidad de eliminar tanto la materia orgánica como los nutrientes presentes en el agua. La utilización de este tipo de cultivo para el tratamiento de aguas residuales supone una reducción de las necesidades energéticas, y por tanto da como resultado un proceso más económicamente rentable que los convencionales fangos activos. Del mismo modo, la biomasa generada tiene aplicación industrial en otros ámbitos por lo que pasa a considerarse subproducto en lugar de residuo.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la determinación experimental de la influencia de las características del alimento, el tipo de aireación, la variación de temperatura y la intensidad lumínica en la eliminación de nutrientes de un efluente de un reactor anaerobio de membranas mediante un cultivo de microalgas en planta piloto. Durante el período de experimentación se han determinado los rendimientos de eliminación de nutrientes (amonio y fosfato), se ha estudiado el crecimiento del cultivo y se ha observado la evolución poblacional de las especies de microalgas presentes, todo ello con la finalidad de relacionar los resultados con las condiciones de operación presentes en cada ensayo.

Tras el período de experimentación los resultados mostraron que el uso de un alimento artificial permitía un desarrollo del cultivo similar al observado en condiciones normales. La reducción del tamaño de burbuja, promovió la proliferación de cianobacterias en el medio, desplazando así el equilibrio poblacional. La influencia de la variación de temperatura se comprobó que no fue significativa, planteando la hipótesis de que durante los ensayos los cultivos se mantenían en el rango de temperatura óptima de crecimiento. La reducción de la intensidad lumínica afectó negativamente al crecimiento de la biomasa en el cultivo, provocando una reducción de la actividad fotosintética que se tradujo en la disminución de los rendimientos de eliminación.

RESUM

El ritme de creixement de la població en les últimes dècades, el desenvolupament tecnològic i els canvis en el mode de vida de la societat estan afectant negativament a la qualitat i la disponibilitat dels recursos naturals disponibles, entre ells l'aigua. El model de gestió hídrica actual està obsolet, pel que és necessari un canvi generalitzat en el que es tingui en compte la necessitat de tractament i recuperació de les aigües contaminades després del seu ús. Al mateix temps, les tècniques a aplicar deuen d'estar basades en la sostenibilitat tant econòmica com ambiental, sent una d'aquestes opcions alternatives el ús de cultius de microalgues.

Les microalgues tenen la capacitat d'eliminar tant la matèria orgànica com els nutrients presents en l'aigua. La utilització d'aquest tipus de cultiu per al tractament d'aigües residuals suposa una reducció de les necessitats energètiques, i per tant esdevé un procés més econòmicament rentable que fangs actius convencionals. A més, la biomassa generada té aplicació industrial pel que passa a considerar-se subproducte en lloc de residu.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la determinació experimental de la influència de les característiques de l'aliment, el tipus de ventilació, la variació de temperatura i la intensitat lumínica en la eliminació de nutrients d'un efluent procedent d'un reactor anaerobi de membranes mitjançant un cultiu de microalgues en una planta pilot. Durant el període d'experimentació s'han determinat els rendiments d'eliminació de nutrients (amoni i fosfat), s'ha estudiat el creixement del cultiu i s'ha observat la evolució poblacional de les espècies de microalgues presents, tot amb la finalitat de relacionar els resultats amb les condicions d'operació presents en cada assaig.

Acabada la experimentació, els resultats van mostrar que el ús d'un aliment artificial permetia un desenvolupament del cultiu similar al observat en condicions normals. La reducció de la mida de bombolla va promoure la proliferació de cianobacteries en el medi, amb el desplaçament de l'equilibri poblacional com a conseqüència. La influència de la variació de temperatura es va comprovar que no va ser significativa, plantejant la hipòtesi de que durant els assajos els cultius es van mantenir dins del rang de temperatures òptimes de creixement. La reducció de la intensitat lumínica va afectar negativament al creixement de la biomassa en el cultiu, provocant una reducció de l'activitat fotosintètica que es va traduir en la disminució dels rendiments d'eliminació.

SUMMARY

The population growth rate during last decades, technological development and changes in the lifestyle of society are negatively affecting the quality and availability of natural resources, including water. Current management model of water is obsolete, so it is necessary a global change. The new model must take into account the treatment and recovery requirements for polluted water after its use. Moreover, applied technologies should be based on sustainability values. One of these new methods is the use of microalgae cultures.

Microalgae are able to remove organic matter and nutrients contained in water. The use of this kind of culture for wastewater treatment decreases energy needs. Therefore, microalgae cultures involve more cost-effective technology than conventional activated sludge process. In addition, generated biomass can be used in industry so then it can be regarded as by-product rather than waste.

The aim of this work was the experimental determination of the influence of food features, type of ventilation, temperature variability and light intensity in nutrient removal in effluent from AnMBR pilot plant. During experimental period, nutrient removal yields (ammonia and phosphate) were determined, growth rate was studied and microalgae species evolution was observed. The main target of these procedures was to relate the results with operational conditions in each test.

After experimental period, results showed that the use of an artificial feed allowed a similar development compared with harvests under normal conditions. The bubble size reduction promoted the proliferation of cyanobacteria. The influence of temperature variation was not significant, and it can be explained with the hypothetical statement that photobioreactors were operating under optimal temperature range. Light intensity reduction reported negative effects on microalgae growth, consequently photosynthetic activity reduced and elimination yield lowered.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente viven en la tierra más de 7500 millones de personas (U.S. Census Bureau). Esta cifra es la máxima registrada hasta el momento, lo que implica que el crecimiento de la población ha sido prácticamente siempre continuo. Sin embargo la continuidad no siempre implica constancia: el aumento reportado durante los últimos 50 años ha sido equivalente al sufrido en toda la historia (figura 1).

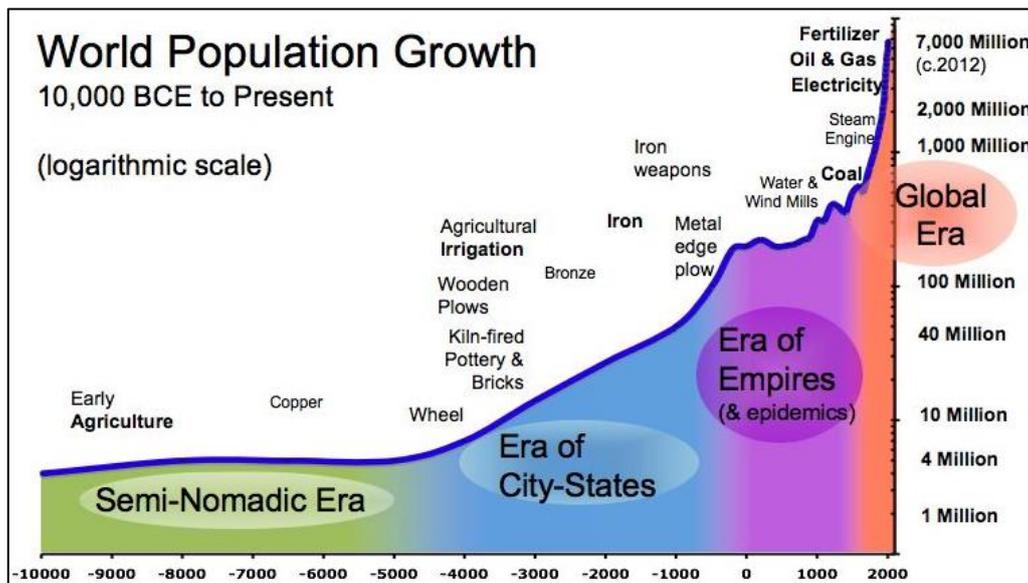


Figura 1. Evolución de la población mundial

Fuente: (Econosystemics. Recontextualizing Economics for Sustainability)

El alto ritmo de crecimiento de la población junto con el desarrollo tecnológico y los cambios en el modo de vida, especialmente de las sociedades desarrolladas, repercuten negativamente a nivel global. Cada vez se requiere un mayor consumo de recursos naturales para satisfacer las necesidades, habiendo llegado ya a ratios insostenibles. Los procesos de transformación y uso a los que son sometidos estos recursos generan subproductos y residuos que necesariamente deben recibir los tratamientos adecuados antes de retornar al medio natural, porque en último término la tierra es un sistema cerrado.

No obstante, no siempre se pone en práctica esta última directriz por lo que el grado de contaminación del medio ambiente en general, y de los recursos en particular está alcanzando magnitudes realmente alarmantes. El problema está favorecido tanto por la falta de interés de las administraciones en abordar la situación y tomar medidas, como por la falta de conocimiento y/o concienciación de la sociedad. Recientes encuestas del CIS muestran que el

medio ambiente únicamente supone el 0,2% de las preocupaciones de la población española (Centro de Investigaciones Sociológicas (CIS), 2015). Estas cifras auguran malas consecuencias teniendo en cuenta la acción local por la que debe empezar cualquier cambio de magnitud global.

La contaminación del medio ambiente puede dividirse en tres grandes vectores según se encuentre: agua, aire y tierra. El presente documento se centrará únicamente en la parte relativa al agua, especialmente en el tratamiento de la contaminación en las aguas procedentes del uso urbano.

El agua es uno de los recursos naturales imprescindibles para el desarrollo de la vida humana sobre la tierra. Se estima que aproximadamente la tierra contiene un total de 1400 km³, aunque el agua dulce solo constituya el 2,5 % del total. Ésta se puede encontrar distribuida en glaciares, aguas subterráneas o superficiales por lo que la cantidad fácilmente extraíble únicamente supone el 0,3 % del global. Siguiendo estas estimaciones el volumen total de agua dulce accesible sería de aproximadamente 100000 km³, lo que se podría traducir en 15000 m³ disponibles por persona (volumen que se asemeja al de 6 piscinas olímpicas) (Banco Mundial, 2013).

El enfoque actual de la gestión del agua, concretamente para uso doméstico, se conoce comúnmente como el modelo lineal *take, make, waste approach* (“extraer, transformar, tirar”), que resulta totalmente insostenible (Wallace, 2005). Esta filosofía aumenta las probabilidades de entrar en situación de estrés hídrico (la demanda de agua es mayor que la cantidad disponible). Tiene lugar como consecuencia del uso y consumo irresponsable (*take*), y por la contaminación por el vertido no adecuado del agua ya utilizada (*waste*) (Daigger, 2009). Relacionando este fenómeno con lo comentado anteriormente, el aumento rápido y continuo de la población potencia el estrés hídrico.

Las afirmaciones realizadas se pueden cuantificar a partir de los datos recogidos por el Instituto Nacional de Estadística (INE) en sus balances anuales sobre uso de agua a nivel doméstico y generación de aguas residuales. En el año 2012 el consumo de agua medio se situó en 137 L por habitante y día a nivel nacional, siendo de 160 L por habitante y día en la Comunidad Valenciana (Instituto Nacional de Estadística, 2014).

Prácticamente todo el volumen de agua consumido junto con los demás flujos procedentes de escorrentías, sobrantes de regadío y de otros usos formarán el volumen total de agua residual urbana (ARU), que será sometido a tratamiento antes de su devolución al medio natural. Todo

ello supone un volumen medio de 294 L de ARU tratada por habitante y día a nivel nacional, siendo de 246 L de ARU por habitante y día en la Comunidad Valenciana (Instituto Nacional de Estadística, 2012).

1.1 Legislación aplicable

El agua tratada debe cumplir unos requisitos de calidad antes de ser vertida al medio natural, con el objetivo de evitar la contaminación y la alteración del medio receptor. Alcanzar estos criterios de calidad es la tarea a desarrollar en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR). Los tratamientos llevados a cabo en estas instalaciones se verán desarrollados en apartados posteriores.

El agua a la salida de estas instalaciones es la que generalmente se devuelve al medio directamente, aunque puede ser destinada a otros usos como agricultura. En función del destino de la corriente de salida los límites a cumplir establecidos varían. Dichos límites están marcados por la legislación europea, nacional y autonómica. Para aguas residuales la documentación legislativa aplicable actualmente es la recogida en la tabla 1.

Tabla 1. Relación de legislación aplicable a las aguas residuales

| LEGISLACIÓN EUROPEA | |
|---------------------------------|---|
| Directiva 91/271/CEE | Tratamiento de aguas residuales urbanas |
| Directiva 2000/60/CE | Directiva Marco, regula el marco de actuación comunitario |
| LEGISLACIÓN ESTATAL | |
| Real Decreto 509/1996 | Tratamiento de aguas residuales urbanas |
| Real Decreto Legislativo 1/2001 | Texto refundido de la Ley de Aguas |
| Real Decreto 1620/2007 | Régimen de reutilización de aguas depuradas |
| LEGISLACIÓN AUTONÓMICA | |
| Ley 2/1992 | Saneario de aguas en la comunidad valenciana |
| Orden de 30 de agosto de 2002 | Declaración de zonas sensibles en el ámbito de la CV |

Fuente: (Hispagua, 2015)

1.2 Efectos del vertido no controlado de aguas residuales

Como se ha indicado, la legislación tiene como objetivo marcar unas pautas de calidad en el agua antes de su vertido en el medio. El incumplimiento de estos requisitos está penado por ley, pero independientemente del carácter económico y administrativo que pueda suponer, sobre el medio los efectos pueden ser devastadores.

Uno de los efectos más relevantes es la alteración de la calidad del agua originaria de fuentes de suministro naturales, generalmente utilizadas para abastecer de agua a la población (Abdel-

Raouf *et al.*, 2012). Directamente se relaciona esta alteración con problemas en la salud de las personas, animales o cultivos sobre los que se aplique el agua.

El agua utilizada para riego en agricultura es obtenida normalmente de pozos naturales de los que se extrae el agua subterránea de cada zona. Una contaminación del acuífero y la aplicación del riego con el agua de mala calidad pueden afectar directamente al cultivo, e incluso pueden ser absorbidas sustancias nocivas que después serán consumidas por las personas.

En la actualidad se está dando importancia a otro tipo de contaminación, la provocada por los llamados contaminantes emergentes. Son compuestos de distinto origen y naturaleza química que están presentes en la naturaleza, de manera natural o antropogénica, de los que se conoce relativamente poco sobre sus efectos dañinos pero se sospecha que pueden ser significativos, por lo que necesitan ser investigados (Barceló *et al.*, 2008). Dentro de este gran grupo se engloban sustancias procedentes de productos farmacéuticos, drogas, plaguicidas o productos de higiene personal, entre muchos otros (Gil *et al.*, 2012).

La eutrofización constituye otra clara consecuencia del vertido no controlado de aguas sobre el medio natural durante largos períodos de tiempo. Este fenómeno consiste en el aumento de la biomasa acuática a causa del aumento de la disponibilidad de nutrientes en el medio, normalmente compuestos de nitrógeno y fósforo (Nyenje *et al.*, 2010). El aumento descontrolado de los organismos fotosintéticos provoca una desestabilización en la fauna y la flora del ecosistema acuático (Golterman y de Oude, 1991). Por esta razón en la legislación están contempladas las zonas más susceptibles a sufrir estos efectos, denominadas “zonas sensibles”, y sobre ellas se establece una mayor limitación en cuanto a parámetros de calidad del vertido de aguas residuales, especialmente en lo que se refiere a la cantidad de nutrientes.

1.3 Tratamientos convencionales de las aguas residuales urbanas

Los métodos de tratamiento en los que las fuerzas físicas predominan en su funcionamiento son conocidos como “operaciones unitarias”. Aquellos métodos en los que la eliminación de los contaminantes se desarrolla mediante procesos químicos y/o biológicos son conocidos como “procesos unitarios”. En el tratamiento de aguas ambos tipos de métodos se combinan para alcanzar el grado de descontaminación que se requiera. El esquema de tratamiento convencional para ARU consta de 4 etapas: pretratamiento, tratamiento primario, secundario (con o sin eliminación de nutrientes) y terciario (Metcalf and Eddy Inc., 2004) (figura 2).

En el pretratamiento se eliminan los sólidos más grandes y posibles residuos de gran tamaño con el objetivo de proteger los equipos que siguen en la línea de proceso.

El tratamiento primario está destinado a la sedimentación de los sólidos de menor tamaño así como a la eliminación de grasas y aceites, normalmente por flotación y arrastre en superficie o decantación. En algunos casos puede ser necesaria la adición de reactivos coagulantes para favorecer la sedimentación de los sólidos.

En el tratamiento secundario entra en juego el proceso biológico, en el que se utiliza el metabolismo de ciertos microorganismos para reducir la cantidad de materia orgánica presente en el afluente. Tras la eliminación de la materia orgánica la línea de agua vuelve a someterse a procesos de decantación donde debe reducirse hasta el máximo valor la concentración de sólidos suspendidos. En el caso de que la planta en cuestión esté diseñada para la eliminación de nutrientes es en esta fase del proceso donde tiene lugar.

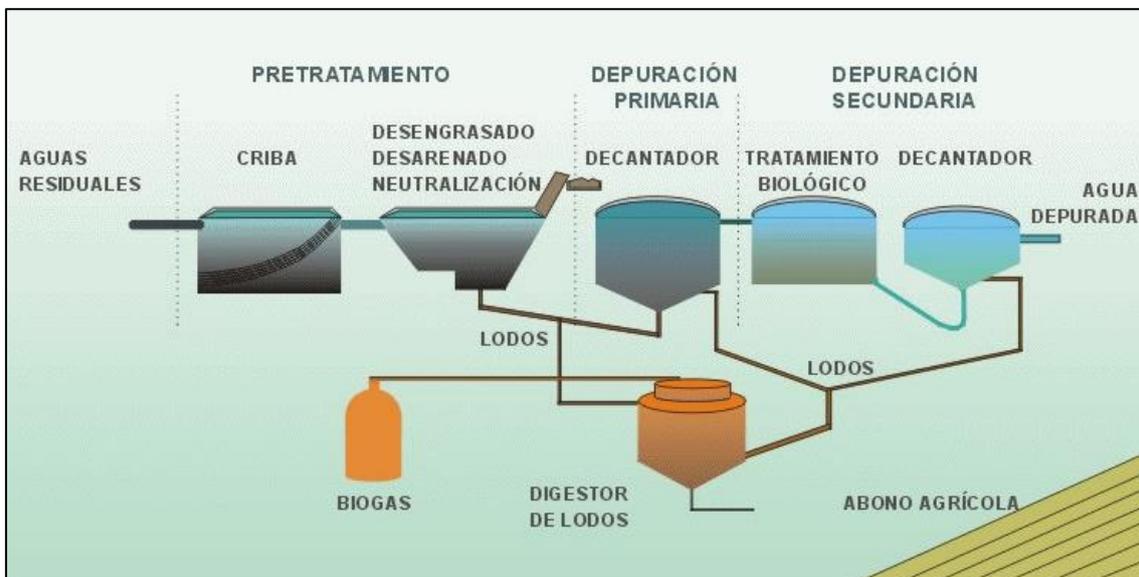


Figura 2. Esquema de tratamiento de aguas en una planta convencional

Los tratamientos terciarios o avanzados se aplican generalmente a plantas en las que las condiciones de calidad de salida son más estrictas que en los casos convencionales. Su propósito es el de reducir la cantidad de sólidos procedentes del tratamiento secundario, así como aplicar etapas de desinfección o precipitación de nutrientes, entre otros. Estas etapas consisten en la combinación de diferentes operaciones y procesos más complejos que están adaptados a cada planta en particular.

Respecto a la desinfección, es un tratamiento usado en ocasiones puntuales. Consiste en la eliminación de los microorganismos patógenos que puedan existir en el agua afluente, y que el resto de etapas convencionales no son capaces de eliminar. Por esta razón no está

permitido el uso del agua depurada para consumo humano, vertido en zonas donde esté permitido el baño de personas o para acuicultura (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Existe legislación para controlar el uso de regadío en agricultura, aunque únicamente está permitido en cierto tipo de cultivos y tras pasar por las etapas de desinfección correspondientes (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010).

En casos muy específicos pueden aplicarse etapas adicionales, conocidas como tratamientos cuaternarios, destinados a la eliminación de algún parámetro característico del agua en cuestión que no sea posible eliminar mediante los tratamientos convencionales. Es el caso de afluentes con alta presencia de metales pesados, compuestos orgánicos recalcitrantes o compuestos minerales entre otros. Este tipo de etapas tiene un coste económico elevado respecto a un tratamiento convencional, estimado aproximadamente entre 8 y 16 veces más caro que una etapa primaria (Oswald, 1998).

1.4 Tratamientos alternativos de aguas residuales urbanas

El tratamiento convencional presentado en el apartado anterior se caracteriza por el alto coste económico que conlleva su funcionamiento. También presenta como desventaja la generación de gran cantidad de residuos (fangos) que en primer lugar deben recibir tratamientos de estabilización y posteriormente ser gestionados (reutilización o eliminación), incrementando el coste aún más.

El cambio en la mentalidad de la sociedad actual impulsa al sector a la búsqueda de soluciones alternativas a los métodos convencionales, que consigan llegar a los mismos resultados con una mayor sostenibilidad y eficiencia del proceso.

1.4.1 Procesos anaerobios

Una de las grandes líneas alternativas de tratamiento que está cobrando protagonismo en tiempos recientes es la aplicación de procesos anaerobios a las ARU. Este tipo de sistemas representan una mejora tanto energética como económica respecto a los procesos aerobios. Como ventajas destacables, los sistemas anaerobios permiten una eficacia de eliminación de materia orgánica similar a la de los aerobios, pero sin necesidad de aporte de oxígeno al sistema (reducción importante del coste económico) y generación de biogás como subproducto, que puede ser valorizado energéticamente. No obstante, los inconvenientes principales son la alta sensibilidad a la temperatura y pH y la necesidad de altos tiempos de retención celular.

Como mejora del proceso se puede combinar el reactor anaerobio con una etapa de separación mediante membranas, pudiendo así aumentar el caudal de tratamiento al ser posible incrementar la concentración de sólidos en el interior del sistema. La separación y recirculación interna de fango permite la independencia entre tiempo de retención hidráulico (TRH) y tiempo de retención celular (TRC), que aporta una gran flexibilidad a la hora de modificar las condiciones de operación. Estos sistemas se conocen como Reactores Biológicos Anaerobios de Membranas (AnMBR). Con ellos se consigue un efluente libre de sólidos e incluso de patógenos y microorganismos, según el tamaño de poro de las membranas.

1.4.2 Depuración natural

Otra de las tendencias actuales se basa en la utilización de la vegetación acuática, el suelo y los microorganismos para la eliminación de los contaminantes. Son los conocidos como tratamientos de depuración natural. Su principal ventaja es la reducida producción de lodos y una mínima necesidad de energía. En contraposición requieren mayores superficies de terreno que los métodos convencionales, y únicamente presenta buenos resultados en afluentes donde prácticamente la totalidad de su materia orgánica sea biodegradable. De acuerdo con estas limitaciones, estos métodos son adecuados para su aplicación en zonas rurales para el tratamiento de caudales no excesivamente elevados. Las técnicas existentes pueden clasificarse en dos grupos: las basadas en la aplicación del agua sobre el terreno y los sistemas acuáticos.

- Métodos de aplicación directa sobre el terreno

En los métodos de aplicación directa sobre el terreno el suelo es el medio receptor de las aguas brutas y donde tiene lugar la eliminación.

Los **filtros verdes** son parcelas de terreno preparado con masa forestal o cultivos concretos, donde se vierte directamente el agua a tratar. La depuración tiene lugar en acción conjunta de las plantas y microorganismos.

La **infiltración rápida** consiste en la circulación del afluente por terrenos de diferentes permeabilidades.

En la **escorrentía superficial** la corriente de agua se fuerza a circular por suelos con diferente vegetación, alternando a la vez períodos de riego y secado de las diferentes zonas.

Los **lechos de turba** basan su funcionamiento en la acción biológica de la fauna microscópica que crece en la superficie, favorecida por la gran adsorción del material.

Los **filtros de arena** son el método más conocido y se utilizan en muchas depuradoras convencionales como métodos terciarios de afino por su alta eficacia en la reducción de sólidos y materia orgánica, aunque su principal problema es la alta facilidad de colmatación.

- Sistemas acuáticos

En los métodos acuáticos la depuración tiene lugar en el propio seno del fluido, desarrollada tanto por las plantas acuáticas como por la microfauna presente.

El **lagunaje** consiste en el flujo continuo del agua residual en lagunas superficiales (naturales o artificiales) variando el tiempo de residencia, donde los microorganismos presentes realizan la función depurativa. En función del tipo de microorganismos presentes y las condiciones de oxigenación se pueden diferenciar las lagunas en aerobias, facultativas o anaerobias.

Los **humedales** tienen un mecanismo de funcionamiento similar que las lagunas pero en ellos se utiliza la vegetación como elemento descontaminante, generalmente plantas emergentes del género *Typha*.

Como alternativa a los métodos de depuración natural introducidos se puede plantear el uso de las microalgas. Se conoce que este tipo de microorganismos tienen una gran capacidad de eliminación tanto de materia orgánica como de nutrientes, por lo que el cultivo masivo de microalgas puede suponer una opción viable en los nuevos métodos de descontaminación de aguas (Cai *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2015)

1.5 Cultivos de microalgas

Las microalgas son aquellos microorganismos unicelulares y fotosintéticos que pueden ser encontrados agrupados en cadenas, colonias o cenobios. Generalmente obtienen la energía fotosintéticamente a partir de la radiación solar y se desarrollan en base a materia inorgánica: son organismos fotoautótrofos. No obstante, hay especies capaces de crecer utilizando la materia orgánica como fuente de carbono. Por tanto en función de su metabolismo es posible establecer la siguiente clasificación:

- **Fotoautótrofos:** obtienen la energía de la luz solar y su fuente de carbono son compuestos inorgánicos.
- **Fotoheterótrofos:** Obtienen la energía del sol y utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- **Mixotróficas:** Utilizan independientemente fuentes de carbono orgánicas o inorgánicas para su desarrollo, pero su fuente de energía sigue siendo la luz.

- **Heterótrofos:** Son capaces de utilizar la materia orgánica tanto como fuente de energía como fuente de carbono, por lo que tienen la capacidad de desarrollarse en ausencia de luz.

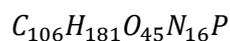
La composición química de las microalgas es variable según la especie considerada. Para medir la composición se cuantifica el porcentaje que contienen de los elementos esenciales como son proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Debe tenerse en cuenta que los valores son variables dentro de una misma especie en función de las condiciones medioambientales y del proceso durante el cultivo. La tabla 2 recoge una comparativa de la composición química de diferentes especies.

Tabla 2. Composición química de diferentes especies de microalgas

| Especie | Proteínas (% peso seco) | Carbohidratos (% peso seco) | Lípidos (% peso seco) | Ácidos nucleicos (% peso seco) |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 50-56 | 10-17 | 12-12 | 3-6 |
| <i>Scenedesmus dimorphus</i> | 8-18 | 21-52 | 16-40 | - |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51-58 | 12-17 | 14-22 | 4-5 |
| <i>Euglena gracilis</i> | 39-61 | 14-18 | 14-20 | - |
| <i>Prymnesium parvum</i> | 28-45 | 25-33 | 22-38 | 1-2 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> | 28-39 | 40-57 | 9-14 | - |
| <i>Spirulina platensis</i> | 46-63 | 8-14 | 4-9 | 2-5 |
| <i>Spirulina máxima</i> | 60-71 | 13-16 | 4-7 | 3-4.5 |

Fuente: (Becker, 1994)

Se propuso una fórmula molecular orientativa sobre la composición química de las microalgas (Grobelaar *et al.*, 1996), aunque como se ha comentado la relación entre los diferentes compuestos es variable en función de diversas circunstancias.



La tabla 3 presenta los porcentajes de los principales macronutrientes (C, N, P) en diferentes grupos de algas:

Tabla 3. Porcentaje de macronutrientes (en peso seco) en diferentes grupos de algas

| Grupo de algas | C (% peso seco) | N (% peso seco) | P (% peso seco) |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Fitoplancton total | 40 - 50 | 8 - 9 | 1,5 |
| Diatomeas | 40 | 7,2 | 1,0 |
| Algas verdes | 40 | 7,2 | 1,0 |
| Cianofíceas | 40 | 7,2 | 1,0 |
| Dinoflagelados | 37 - 47 | 3,3 - 5,0 | 0,6 - 1,1 |
| Flagelados | 40 | 7,2 | 1,0 |
| Crisofíceas | 35 - 45 | 7,8 - 9,0 | 1,2 - 3,0 |

Fuente: (Martín y Marzal, 1999)

1.5.1 Clasificación de las microalgas

Taxonómicamente la gran mayoría de especies de microalgas se encuentran dentro del dominio Eukarya, reino Plantae. Por esta razón las clases incorporan en su nombre el sufijo *-phyceae* o *-fícea* que significa alga. Tradicionalmente la clasificación ha venido dada por su coloración (pigmentación), aunque actualmente se añaden otros criterios como la morfología, la naturaleza química, características de la pared celular o los productos de almacenamiento intracelulares. A continuación se muestra la descripción de los principales grupos de algas conocidos actualmente (Graham *et al.*, 2000).

- Cianofita o cianobacterias:

Son algas procariotas, pertenecientes al reino de las eubacterias. Son organismos planctónicos sin motilidad y suelen desarrollarse en ambientes extremos, tanto en aguas dulces como salinas, pudiéndose encontrar solas o agrupadas en filamentos. Algunas especies pueden encontrarse en la superficie de los medios acuáticos debido a que poseen gas almacenado en sus vacuolas. Si el medio tiene una alta concentración de nutrientes puede favorecer un crecimiento rápido y acumulación de algas en el medio denominado *bloom*. Lagos en los que aparecen estos fenómenos se dice que están eutrofizados.

Este grupo de algas son conocidas tradicionalmente como “algas verde-azuladas” por su particular coloración. Esta característica viene dada por la presencia de ficocianina y ficoeritrina que junto a la clorofila proporciona dicha tonalidad (Tomaselli, 2004).

Sus características metabólicas les permiten el almacenamiento de glucógeno intracelularmente y en términos estructurales su pared celular está compuesta de peptidoglicano con una capa externa de liposacáridos (Tomaselli, 2004).

Algunos de los géneros más característicos de cianobacterias son *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina* o *Phormidium* (figura 3).

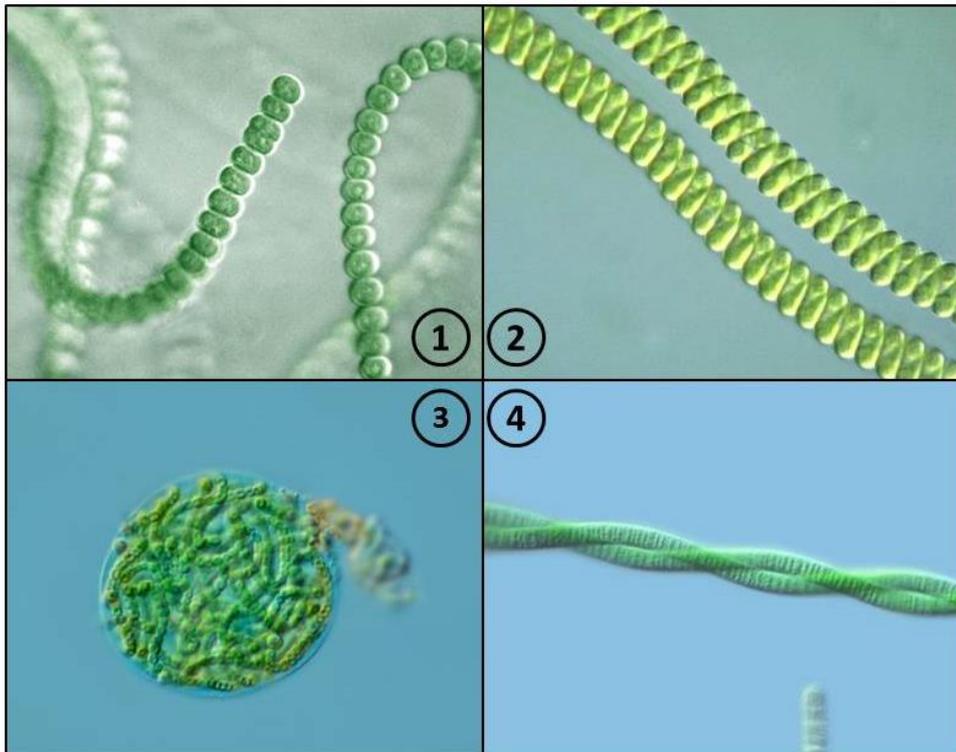


Figura 3. Ejemplos de cianofíceas: *Anabaena* (1), *Spirulina* (2), *Nostoc* (3) y *Oscillatoria* (4)

- Rodófitas

Conocidas como “algas rojas”. Son características de los medios marinos y de temperaturas moderadas, se encuentran normalmente en regiones templadas y tropicales (figura 4).

Morfológicamente no disponen de flagelos, y su pared celular está compuesta de una capa microfibrilar de celulosa o xilano y por mucílagos de polisacáridos (agar).



Figura 4. Ejemplos de rodofíceas

- Bacilariofíceas:

Son algas eucariotas de coloración marrónácea y/o dorada, consecuencia del enmascaramiento de la clorofila por la pigmentación de la fucoxantina y el β -caroteno. Su producto de almacenamiento es crisolaminarina y poseen cierta cantidad de lípidos en su composición.

Las diatomeas se encuentran en este grupo, y pueden dividirse en dos clasificaciones según su morfología: las que tienen simetría bilateral y las que poseen una simetría radial (figura 5). Estas últimas son características de aguas marinas, donde juegan un papel esencial en la cadena trófica del ecosistema.

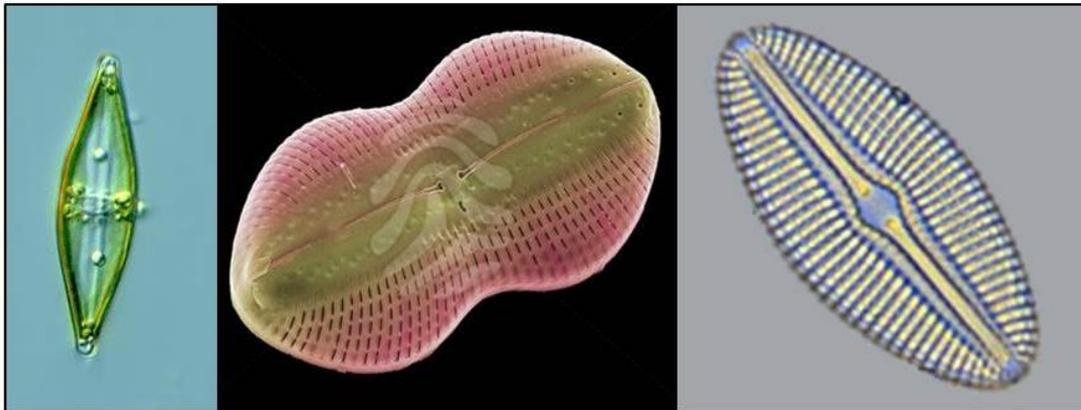


Figura 5. Ejemplos de diatomeas

- Clorófitas:

Conocidas como “algas verdes” por su coloración debida a la presencia de clorofila a y b y diferentes especies de carotenoides, aunque en condiciones de deficiencia de nitrógeno pueden adoptar una coloración rojiza o anaranjada. Constituye un extenso grupo dentro de las microalgas eucariotas con una gran variedad morfológica, tanto a nivel microscópico como macroscópico. Se incluyen en el grupo cocoides, flagelados coloniales o unicelulares y filamentos multicelulares o multinucleados.

Tienen su actividad generalmente en agua dulce, aunque pueden encontrarse también en medios marinos o incluso en ambientes subaéreos. En muchos casos son capaces de desarrollar relaciones simbióticas con otros organismos, mayoritariamente líquenes.

Algunas de las especies más estudiadas de este grupo son *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Pediastrum* (figura 6).



Figura 6. Ejemplos de clorófitas: Pediastrum (izquierda), Chlorella (centro), Scenedesmus (derecha)

Tanto *Chlorella* como *Scenedesmus* se han reportado como especies de alta capacidad de adaptación en aguas residuales y notable eliminación de los nutrientes disueltos en el medio (Su *et al.*, 2012). Sin embargo estudios más específicos indican que el género *Scenedesmus* representa una mejor opción frente a *Chlorella* al disponer de un mejor rendimiento de eliminación tanto de nitrógeno como de fósforo en aguas de composición esencialmente urbana (Ruiz-Marín y Mendoza-Espinosa, 2012).

Scenedesmus es un género de microalgas de agua dulce que se encuentra en diferentes tipos de agrupaciones según las condiciones del medio, especialmente la disponibilidad de nutrientes y el pH. Las formas más comunes son individualmente o formando cenobios de 4 u 8 unidades (figura 7). La disposición individual indicará que el medio presenta unas condiciones favorables para el crecimiento del organismo, mientras que la formación de cenobios será consecuencia de una baja concentración de nutrientes o de la presencia de depredadores. La formación agrupada confiere una medida de protección y supervivencia del organismo, con una menor relación superficie/volumen y por consiguiente menor consumo de nutrientes y una formación estructural más resistente (Pancha *et al.*, 2014).

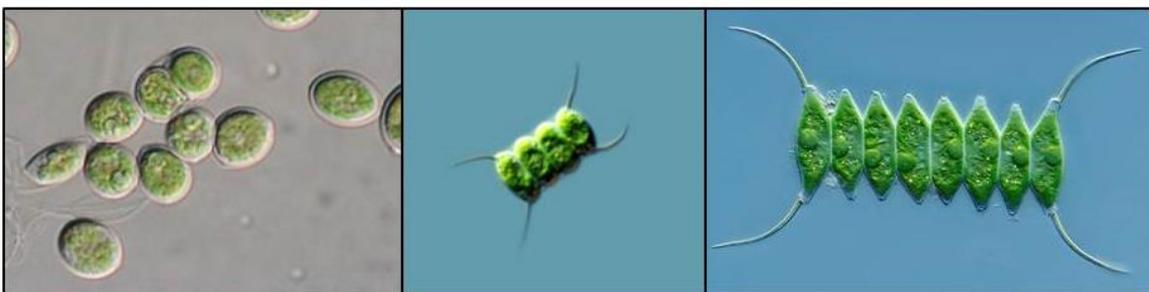


Figura 7. Visualización de las diferentes formas de agrupación de *Scenedesmus*

1.6 Aplicación de las microalgas

El interés suscitado por las microalgas en los últimos tiempos se debe a sus múltiples aplicaciones: materia prima para diferentes procesos industriales, fuente alternativa de energía para los combustibles fósiles, depuración de aguas, sumidero de dióxido de carbono atmosférico o fabricación de productos de valor añadido en química fina.

Su función fotosintética es uno de los factores que aumentan su viabilidad a ser cultivadas: al ser organismos acuáticos y por tanto con fácil acceso al agua y nutrientes, resultan organismos más eficientes que las plantas terrestres que realizan la misma función.

A continuación se describirán brevemente algunas de las aplicaciones más destacadas de las microalgas:

1.6.1 Energía

Actualmente uno de los principales objetivos de la ciencia es la búsqueda de alternativas viables que permitan sustituir el uso de los combustibles fósiles para la producción y abastecimiento de energía. El petróleo y el gas natural son los recursos más utilizados, y consecuentemente de los que se está detectando un agotamiento más crítico.

Existen tres grandes vías de obtención de energía a partir de las microalgas: por una parte mediante la producción de biodiesel obtenido a partir de los lípidos contenidos en las células. Por otra parte, a partir de la digestión anaerobia de las algas obteniendo biogás como producto valorizable energéticamente. La tercera alternativa es la aplicación de procesos de fermentación en los que se obtiene bioetanol.

- Biodiesel

Debido a la inminente escasez del petróleo y la consiguiente subida de precios se están considerando alternativas para sustituirlo por la utilización del biodiesel como combustible. El proceso industrial actual para la obtención de biodiesel se basa en la transesterificación de los triglicéridos contenidos en los aceites extraídos del maíz (Halim *et al.*, 2012). Sin embargo, no es un proceso viable a gran escala por diversos motivos. Técnicamente se necesitarían grandes áreas destinadas exclusivamente al cultivo de maíz para biodiesel para satisfacer la necesidad actual de combustible. Desde el punto de vista social y teniendo en cuenta que el maíz es un alimento básico, la implantación de estos procesos supondría el aumento de la especulación económica en el cultivo de maíz aumentando el desequilibrio actual en el reparto y acceso a

comida a nivel mundial. Se entra entonces en los grandes debates éticos sobre la soberanía alimentaria.

Las microalgas están consideradas actualmente como una de las alternativas más viables de fuentes de biodiesel. Su gran poder fotosintético añadido a la simplicidad de su estructura unicelular aporta una gran capacidad de acumulación de lípidos en su biomasa (hasta un 77%), añadiendo además la capacidad de fijación del carbono atmosférico. Diferentes estudios estiman que un cultivo de microalgas puede producir unas 10 veces más biodiesel por unidad de área que un cultivo de maíz convencional (Halim *et al.*, 2012).

El biodiesel producido a partir de microalgas no contiene formas de sulfuro en su composición, y el funcionamiento comparado con el diésel convencional obtenido a partir del petróleo es prácticamente idéntico, reduciendo además emisiones de partículas, monóxido de carbono, hidrocarburos y SO_x . Sin embargo, las emisiones de NO_x sí podrían ser superiores en algunos tipos de motores (Mata *et al.*, 2009).

Una de las ventajas de la utilización de las microalgas es que numerosas especies son aptas para el proceso por su alto contenido de lípidos. Tal y como se muestra en la tabla 4, en algas que contienen únicamente el 30% en peso seco de lípidos la producción sigue siendo muy superior a cualquier otro vegetal utilizado. De la misma manera, un cultivo de microalgas se puede mantener durante todo el año, lo que compensa la limitación por estacionalidad que podría tener otro tipo de cultivo como el maíz (Halim *et al.*, 2012).

Tabla 4. Rendimientos de producción de biodiesel con diferentes materias primas

| Cultivo | Producción aceite (L/ha) | Área necesaria (Mha)* | % equivalente a superficie de cultivo existente en EEUU* |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|--|
| Maíz | 172 | 1 540 | 846 |
| Soja | 446 | 594 | 326 |
| Colza | 1190 | 223 | 122 |
| Coco | 2689 | 99 | 54 |
| Aceite de palma | 5950 | 45 | 24 |
| Microalgas 30% lípidos (ps) | 58 700 | 4,5 | 2,5 |
| Microalgas 70% lípidos (ps) | 136 900 | 2 | 1,1 |

*Cantidades necesarias para satisfacer el 50% de la demanda de EEUU

Fuente: (Becker, 1994)

Sin embargo, actualmente mantener y desarrollar un cultivo suficientemente productivo para producir biodiesel no es económicamente viable, ya que requiere condiciones de luz, agua y nutrientes concretas difíciles de mantener (Mata *et al.*, 2009).

- Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso biológico llevado a cabo por bacterias y arqueas, donde a partir de ciertas rutas metabólicas se degrada la materia orgánica y se obtiene biogás como producto de las reacciones. El gas producido tiene aplicación energética ya que dispone de entre un 40% y un 60% de metano, siendo el resto dióxido de carbono, nitrógeno, hidrógeno y trazas de otros compuestos.

El proceso en sí consta de 3 etapas clave, cada una de ellas desarrollada por un tipo de microorganismo. El primer estadio es la **hidrólisis** de la materia orgánica compleja, y no directamente asimilable, a compuestos más sencillos de cadenas más cortas y fácilmente degradables. El segundo paso es la **fermentación**, donde los nuevos compuestos sencillos presentes en el medio son transformados en alcohol, ácido acético y otros ácidos grasos volátiles (AGV), hidrógeno y dióxido de carbono. La última etapa es la **metanogénesis**, donde los AGV acaban siendo transformados en metano (Ferrer y Seco, 2007).

Este proceso es comúnmente conocido en el campo del tratamiento de aguas convencional debido a su extendido uso en la estabilización de los fangos biológicos, con el reaprovechamiento del biogás para la generación de electricidad. El hecho de que pueda utilizarse biomasa con un alto contenido de humedad (80-90%) llevó a considerar la viabilidad del uso de microalgas. No obstante, para conseguir rendimientos óptimos en el proceso de digestión es importante mantener en un valor alto la relación C/N del alimento y las microalgas se encuentran por debajo de este valor. Por esta razón la mejor opción de digestión de algas es utilizarlas en la codigestión junto con fangos de depuradoras u otros compuestos con alto contenido de materia orgánica.

El producto obtenido tras la digestión debería ser filtrado mediante membranas, resultando un efluente líquido con una concentración de nutrientes que podría ser reutilizada. La producción de biogás se estima suficiente para obtener la energía necesaria para mantener el cultivo y satisfacer la posterior etapa de separación.

- Fermentación alcohólica

La fermentación es un proceso llevado a cabo por levaduras en el que los azúcares complejos (almidón o celulosa por ejemplo) son convertidos en alcohol etílico en condiciones de ausencia de oxígeno. Por esta razón, la materia prima del proceso debe contener un alto contenido en carbohidratos. Algunas especies de algas tienen la capacidad de almacenar intracelularmente glicógeno y almidón, por lo que resultan adecuadas para ser sometidas a procesos de

fermentación. El producto obtenido es el denominado bioetanol, considerado también una alternativa energética a los combustibles fósiles utilizados actualmente (Halim *et al.*, 2012).

La desventaja que presenta esta aplicación es que la biomasa algal necesita un pretratamiento previo a la fermentación, por lo que su viabilidad económica está actualmente siendo discutida.

1.6.2 Industria alimentaria

La producción de algas a escala industrial para uso no energético tuvo su cuna en Japón, donde comenzaron a comercializarse en los años sesenta preparados de *Chlorella* como aditivo en alimentación. Este producto se fue extendiendo por el resto de planeta a pesar de que existe un exhaustivo control sanitario sobre la producción y distribución de microalgas para consumo humano: únicamente está permitido el uso de ciertas especies concretas en alimentación, que suelen ser *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*.

Se presentan comercialmente en forma de comprimidos o en polvo y se presume de su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que reducen en los humanos el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Para alimentación animal se encuentran también suplementos preparados a base de microalgas para mejorar la respuesta inmunológica, la fertilidad, control de peso o mantener la calidad de la piel del ganado.

Sin ser consumidas directamente, en algunas especies como la *Dunaliella* se extrae el β -caroteno que se utiliza tanto como fuente de vitamina A en algunos suplementos o como colorante alimenticio. En algunas especies es posible extraer el pigmento C-ficocianina del que se destacan sus propiedades antioxidantes y puede aplicarse también como colorante.

Para el aprovechamiento de las microalgas en la industria alimentaria, no es posible utilizar para su cultivo aguas con presencia de patógenos.

1.6.3 Depuración de aguas

Tal y como se introdujo en el apartado anterior, las microalgas tienen buena capacidad de eliminación de nutrientes. Sin embargo, los métodos de depuración natural no resultan viables a gran escala sino únicamente presentan buenos resultados cuando son aplicados en instalaciones de tamaño reducido y están destinados al tratamiento de afluentes con características concretas.

A pesar de que en los años 40 se propuso por primera vez el uso de las microalgas para la purificación de agua, son Oswald y Gotaas (1957) los que a finales de los años 50 introducen el concepto de la producción masiva de algas para el tratamiento de las aguas residuales. En la década de los 60 se plantea en California el mayor sistema de cultivo de microalgas hasta el momento consiguiendo buenos resultados, y es a partir de este momento cuando realmente se extiende el interés a nivel mundial en las aplicaciones de las microalgas.

Se ha estudiado el proceso de depuración en diferentes configuraciones y condiciones de operación de las instalaciones, ya sea manteniendo las algas en suspensión, depositadas en medios fijos o mediante biofilms (Abdel-Raouf *et al.*, 2012). También se ha investigado sobre diferentes tipos de aguas, tanto reales como artificiales y sobre cuál es el rendimiento que presentan diferentes especies sobre ellas (Su *et al.*, 2012). Como conclusión común se establece que uno de los factores que determinan la viabilidad del proceso es la luz recibida por el cultivo, por lo que en diversos estudios se indica el uso de las microalgas en las etapas terciarias de los tratamientos de depuración de las aguas, para evitar así las posibles interferencias de las partículas sólidas presentes en el afluente que pudieran reducir la incidencia de la luz sobre los organismos.

Acerca de las especies utilizadas para el tratamiento de las ARU se encuentra en la bibliografía que algunas de las más indicadas son *Scenedesmus*, *Chlorella* o *Chlamydomonas* (Kong *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2012; Arbib *et al.*, 2013), por presentar alta tolerancia a los medios altamente concentrados en nutrientes y a la vez, ser capaces de alcanzar rendimientos elevados de eliminación, especialmente de nitrógeno amoniacal. En lo que respecta a la eliminación de fósforo los rendimientos son menores que en el amonio, pero se puede llegar a niveles equiparables en cuanto a descontaminación del afluente se refiere. Algunas especies pueden incluso eliminar patógenos, metales pesados y algunos compuestos tóxicos.

A la hora de comparar este tipo de tratamiento de descontaminación con otras alternativas y métodos convencionales, se establece que la utilización de cultivos masivos presenta una serie de ventajas:

- Supone un sistema más rentable en cuanto a la eliminación de nutrientes que los procesos de fangos activados.
- Implica una reducción de las necesidades energéticas respecto a los procesos convencionales.

- La capacidad de fijación de CO₂ de las microalgas confiere la reducción de emisión de gases de efecto invernadero, consiguiendo así una operación con menos impacto medioambiental.
- La acción fotosintética permite mantener el efluente en condiciones de oxigenación.
- La producción de biomasa no es un residuo sino un subproducto del que se puede extraer un beneficio, modificando de este modo el balance económico del proceso global.

A pesar de las diferentes ventajas, los cultivos a gran escala todavía no se encuentran totalmente desarrollados para poder operar en continuo. Los principales problemas que se encuentran son la dificultad de mantener constantemente unas condiciones ambientales adecuadas para el correcto desarrollo del cultivo, y la separación posterior de la biomasa y el agua tratada. Por esta razón se están planteando instalaciones en las que se combinan los cultivos con equipos de filtración de membranas (Gouvion *et al.*, 2014; Mo *et al.*, 2015).

1.7 Factores que determinan el crecimiento de las microalgas

Para poder desarrollar los procesos descritos en el apartado anterior es necesaria la producción de microalgas a gran escala. Para ello es necesario el desarrollo de los dispositivos necesarios donde los organismos deben crecer y aumentar la cantidad de biomasa. Sin embargo *a priori* deben conocerse las condiciones que deben proporcionarse al ecosistema algal para optimizar su producción.

Una de las características ya citadas de las microalgas es la gran velocidad de crecimiento. Hay estudios en los que se afirma que en promedio un cultivo puede doblar la cantidad de biomasa en 24 h, llegando a hacerlo en 3,5 h en el caso de encontrarse en la fase exponencial del crecimiento (Lee *et al.*, 2004).

A continuación se desarrollan brevemente los principales factores que deben tenerse en cuenta a la hora de plantear los sistemas de producción masivos de microalgas.

1.7.1 Luz

Como organismos fotosintéticos, las microalgas dependen completamente de la luz que reciban (Assemany *et al.*, 2015). La luz utilizada para la fotosíntesis es la que se corresponde con el espectro solar, es decir entre 350 nm y 700 nm (figura 8), y que supone aproximadamente un 40% de la radiación total emitida por el sol. A diferencia del resto de

organismos terrestres fotosintéticos que presentan una eficiencia de conversión luz-biomasa de un 1%, las microalgas consiguen llegar a un 4%.

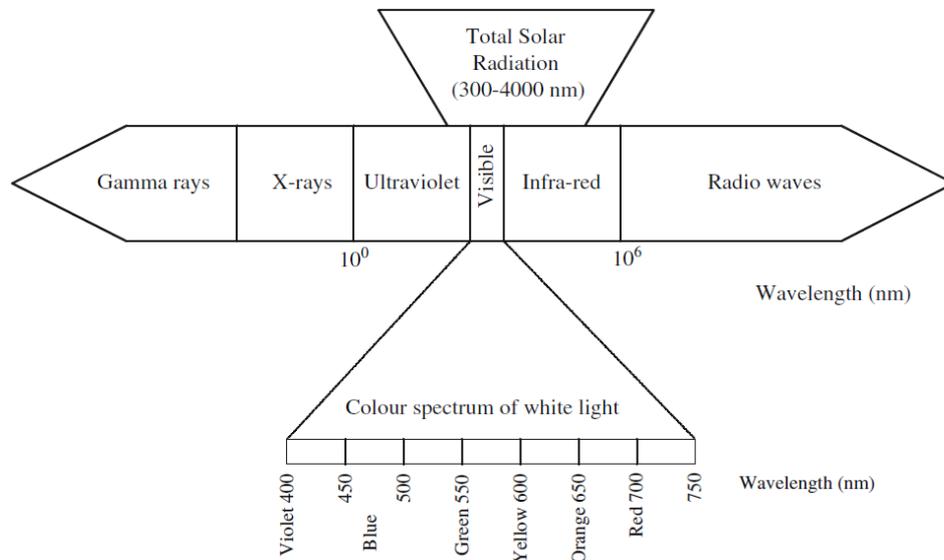


Figura 8. Espectro de radiación

El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de luz que recibe, siempre y cuando esta intensidad se sitúe por debajo de un valor límite conocido como intensidad óptima. Por encima de este valor los organismos se ven dañados y por tanto el proceso de fotosíntesis se inhibe, proceso conocido como fotoinhibición. La figura 9 muestra un gráfico P/I , es decir, la representación gráfica de la actividad fotosintética (P) frente a la intensidad de luz aplicada sobre el sistema (I).

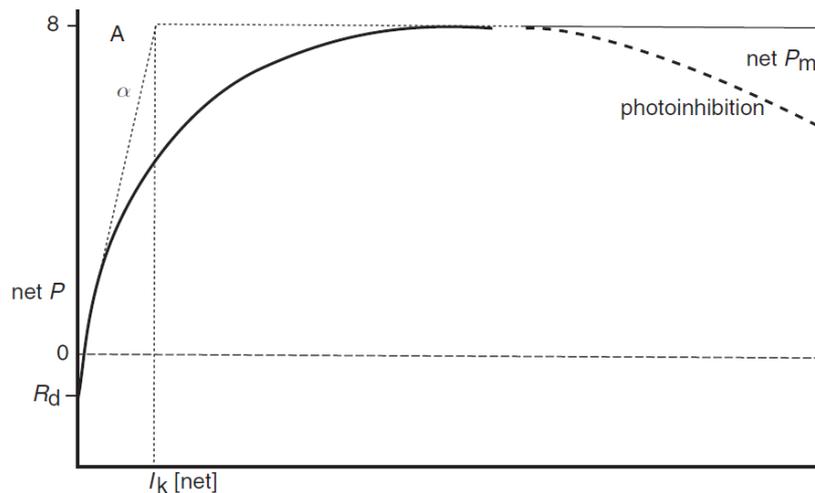


Figura 9. Efecto de la intensidad lumínica sobre la actividad fotosintética
Fuente: (Vonshak y Torcillo, 2004)

El aumento de luz puede estar relacionado a la vez con un aumento de la temperatura del medio, que tendrá efectos sobre el sistema como se verá en apartados posteriores.

El caso contrario en el que los microorganismos no disponen de suficiente luz para el correcto desarrollo recibe el nombre de fotolimitación. En la figura 9 correspondería este efecto a la zona que tiende a cero en el eje de intensidad lumínica, donde la respuesta fotosintética disminuye de manera brusca a medida que se reduce dicha intensidad. La actividad fotosintética está relacionada con el crecimiento, y por lo tanto el consumo de nutrientes del medio por parte de las microalgas. Por esta razón se relaciona directamente la intensidad lumínica del medio con la capacidad de almacenamiento de fósforo y nitrógeno (Powell *et al.*, 2009).

A la hora de diseñar los sistemas de cultivo, hay que tener en cuenta que la luz debe llegar a la mayor cantidad de células posibles por lo que es imprescindible tener en cuenta tanto la profundidad de los recipientes como la concentración a la que se trabajará. Una profundidad elevada permite el almacenamiento de un mayor volumen, pero la luz no será capaz de llegar a las zonas más interiores. Del mismo modo intentar retener una concentración elevada de biomasa en el reactor perjudicará la transferencia de la luz a través del medio líquido.

En operación existen diferentes métodos de aplicación de la luz en referencia al tiempo de iluminación. En el caso de cultivos en lagos naturales las horas diarias de luz variarán en función de la localización geográfica, las condiciones atmosféricas puntuales y la época del año. En instalaciones artificiales pueden utilizarse sistemas de iluminación que se mantengan en activo las 24 horas del día o que operen en ciclos de luz-oscuridad con diferentes relaciones de tiempo de cada etapa (Powell *et al.*, 2009). A partir de los resultados de diversos estudios en los que se compara el efecto de diferentes tiempos y ciclos de iluminación se reporta que diferentes especies tienen respuestas diferentes a estos cambios. En muchos de ellos se atribuyen las posibles mejoras de la utilización de ciclos respecto a la iluminación continua a que los tiempos de oscuridad potencian la actividad química que tiene lugar en la fase oscura de la fotosíntesis (Carvalho *et al.*, 2011).

1.7.2 Temperatura

El efecto de la temperatura en las reacciones bioquímicas es también uno de los factores más relevantes que influyen tanto en la composición como en la actividad de las microalgas. Se conoce que existe una temperatura óptima de crecimiento por encima de la cual la actividad se ve inhibida, aunque este valor varía en función de la especie concreta. Hasta llegar a esta temperatura óptima, la relación entre temperatura y velocidad de crecimiento es exponencial.

Matemáticamente se puede modelar el efecto de la temperatura sobre la eliminación de los nutrientes. Existen diferentes modelos que permiten predecir estos efectos y que se ajustan correctamente a la realidad como el modelo de Ratkowsky o el modelo de temperaturas cardinales con inflexión (CTMI). En la figura 10 se muestra la comparación de resultados teóricos y experimentales para el género *Scenedesmus* (Ruiz-Martínez *et al.*, 2015)

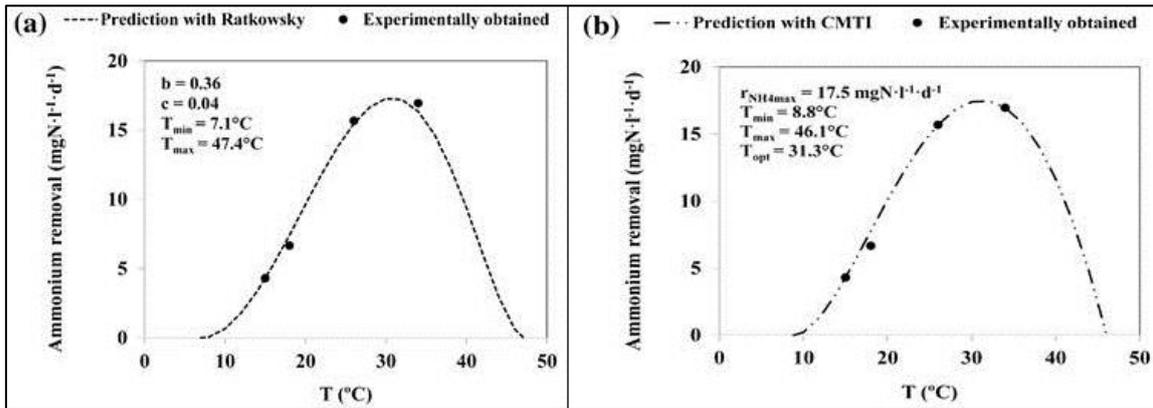


Figura 10. Predicciones matemáticas para la eliminación de amonio en función de la temperatura: (a) modelo de Ratkowsky, (b) modelo CMTI.

Fuente: (Ruiz-Martínez *et al.*, 2015)

1.7.3 pH

El pH es un parámetro que puede afectar a numerosos procesos, esencialmente porque marca la biodisponibilidad en el medio de compuestos como nutrientes o metales en función de sus constantes de equilibrio ácido-base. El caso más representativo de este equilibrio son los compuestos de carbono:



Las microalgas tienen su rango óptimo de desarrollo entre valores de pH de 7 y 9. Si el medio se aleja de estos límites se altera notablemente su capacidad de crecimiento.

Por su parte, el proceso de fotosíntesis provoca una reducción en la concentración de CO_2 disuelto en el medio, lo que provoca un aumento del valor de pH en el medio. Por esta razón es necesaria la adición de dióxido de carbono gas en las instalaciones de cultivo de microalgas, de lo contrario las condiciones de pH llegarían a valores de inhibición. De este modo, la adición del gas al medio para mantener el pH en los valores adecuados aporta un aumento de productividad al sistema.

Un sistema en el que no se contemple la adición de CO₂ y experimente el aumento del pH puede reducir la eficiencia de eliminación de nutrientes. Por una parte, el equilibrio amonio-amoniaco se desplaza hacia la producción de amoniaco gas, que podría escapar del sistema por procesos de *stripping*. En el caso del fósforo se observa que a valores de pH superiores a 9 puede precipitar químicamente con sales de calcio, que quedan en suspensión en el sistema afectando a la penetración de la luz en el medio acuático (Xu *et al.*, 2014). En ambos casos la reducción por procesos no biológicos reduce la biodisponibilidad de nutrientes en el sistema afectando de este modo al crecimiento de las microalgas.

1.7.4 Salinidad

La salinidad del medio afecta esencialmente a la capacidad de intercambio de sustancias a través de las pareces celulares de los microorganismos, que se rigen por procesos de ósmosis, y consiguientemente la producción de lípidos, la adquisición de nutrientes y la excreción de sustancias de rechazo (Tomaselli, 2004). Para cada especie los efectos se presentarán de manera diferente, afectando en última instancia a la capacidad de creación de biomasa y de eliminación de nutrientes.

1.7.5 Agitación

En los sistemas destinados al cultivo de microalgas la agitación es un parámetro mecánico a tener en cuenta. Tiene diversas funciones como facilitar la eficiencia del transporte de las sustancias dentro del medio líquido, impedir la sedimentación de las algas (se encuentran en suspensión), homogeneizar el medio y el pH en todo el volumen de reacción, y desplazar a las algas desde zonas oscuras a zonas con iluminación (AST Ingeniería S.L., 2013).

Una adecuada homogeneización es necesaria para el buen desarrollo del proceso porque evita la aparición de gradientes de temperatura y de pH, y una buena distribución del oxígeno, ya que concentraciones de este gas superiores al 400% de su valor de saturación se consideran inhibitoras del crecimiento (Vonshak y Torcillo, 2004).

No obstante, las microalgas en general son sensibles a esfuerzos mecánicos, por lo que la intensidad a la que se aplica la agitación debe estar controlada. El sistema convencional de aplicar la agitación es mediante el burbujeo de aire y CO₂. Por tanto, la adición de gas es conveniente que esté diseñada para que suponga una distribución homogénea de este en todo el medio líquido y a la vez que permita que el líquido se homogenice, todo ello sin llegar a dañar a los microorganismos por los consiguientes esfuerzos cortantes. Como en todos los casos, la velocidad de gas máxima que podrán soportar las microalgas dependerá de la especie a la que pertenezcan.

1.7.6 Nutrientes

Las algas pueden desarrollar metabolismos diferentes en función de la fuente de carbono que utilicen, pudiendo clasificarse en autótrofas, heterótrofas o mixotróficas. Como la gran mayoría de organismos los nutrientes mayoritarios que necesitarán serán nitrógeno y fósforo, independientemente de otros macronutrientes como azufre, calcio, magnesio y potasio o micronutrientes como hierro, níquel, cobre, zinc o manganeso (Tomaselli, 2004).

A continuación se describen por separado las características de los nutrientes indispensables para el crecimiento de las microalgas.

- Carbono

Es el elemento básico de la vida en la tierra, y obviamente también de las microalgas, donde constituye aproximadamente más del 50% de su biomasa. Normalmente utilizan el CO₂ como fuente de carbono, aunque pueden suplir la necesidad también con iones bicarbonato (HCO₃⁻).

En los sistemas de cultivo las microalgas adquieren los nutrientes disueltos en el medio. La relación normal de carbono-nutrientes en aguas residuales es 3.5:1 y 20:1 para C:N y C:P respectivamente, lo que representa un valor bajo comparado con las mismas relaciones en la composición de las microalgas, que se sitúan en 6:1 y 48:1 para nitrógeno y fósforo, respectivamente (Woertz *et al.*, 2009).

Como solución a este problema se observa necesaria la adición de CO₂ de manera externa al sistema, desplazando los equilibrios y acelerando la velocidad de consumo por parte de las microalgas. Al potenciar el consumo de dióxido de carbono se incrementa el desarrollo y por tanto la eficacia en el consumo del resto de nutrientes. Algunos estudios muestran que la especie *Scenedesmus* presenta un mayor crecimiento en un sistema con una concentración de CO₂ del 15 % frente a otros en el que la concentración es menor (Tripathi *et al.*, 2015). El control del suministro y pérdida de gas es junto con la disponibilidad de luz una de las cuestiones críticas a la hora de plantear el diseño de los fotobioreactores destinados al cultivo masivo.

Estequiométricamente las necesidades de CO₂ para un sistema de microalgas se estiman en 1,85 g CO₂/g biomasa. En un caso real hay que tener en cuenta que parte de la cantidad inyectada al sistema desaparecerá por *stripping*. Este problema es más fácil de solucionar en fotobiorreactores cerrados que en sistemas abiertos de cultivo (Ruiz-Martinez, 2011). El consumo normal de las microalgas se sitúa entre 200 y 600 mg/L·d de CO₂, aunque este valor puede variar notablemente dependiendo de las condiciones del sistema y de la especie

concreta. *Scenedesmus obliquus* tiene un consumo de alrededor de 600 mg/L-d, mientras que otra cepa de la misma especie (*Scenedesmus obliquus* CNW-N) utilizada intencionadamente para la fijación de CO₂ presenta rendimientos de hasta 1200 mg/L-d (Ho *et al.*, 2013). No obstante para la fijación de CO₂ otras especies como *Chlorella sp* presentan mejores resultados llegando cerca de los 1800 mg/L-d de CO₂.

- Fósforo

El fósforo es un componente esencial de los ácidos nucleicos, que gobiernan la síntesis de proteínas de los microorganismos, así como componente del adenosín-fosfato, responsable del correcto funcionamiento del transporte intracelular. En microalgas activas en fase de crecimiento se estima que el contenido en fósforo está en torno al 1% de la biomasa en peso seco (Reynolds, 2006). En condiciones normales tienen la capacidad de almacenar intracelularmente una cierta cantidad de fósforo denominada *minimum cell quota* (q_0) cuyo valor se sitúa entre el 0,2 % y el 0,4 % de su peso en seco. Sin embargo bajo ciertas condiciones las mismas microalgas pueden aumentar este porcentaje hasta llegar a más del 3 %, lo que supone que las microalgas son capaces de almacenar hasta 16 veces su q_0 . Este efecto es conocido como *luxury uptake*.

Las microalgas adquieren el fósforo que se encuentra disuelto en el medio en forma de ortofosfato (PO₄³⁻). El proceso de toma de fósforo puede verse sensiblemente afectado por ausencia en el medio de otros iones como potasio, sodio o magnesio, o incluso por valores de pH inadecuados, excesivamente altos o bajos. Tal y como se había comentado en el apartado correspondiente, un pH alto en el medio favorece la precipitación del fósforo disuelto reduciendo de este modo la biodisponibilidad para los microorganismos.

- Nitrógeno

El nitrógeno es el otro elemento esencial cuya escasez relativa en el medio afecta directamente y de manera negativa el crecimiento de las microalgas. Es el constituyente de aminoácidos y de todas las proteínas sintetizadas a partir de éstos. Su contenido en la biomasa depende del estado en que se encuentren los organismos: en células vivas representa alrededor del 3 % del peso seco de la biomasa, mientras que el valor puede aumentar hasta un 7 – 8,5 % en células en crecimiento, o incluso llegar a 10 – 12 % en condiciones en el que se estén almacenando proteínas condensadas intracelularmente (Reynolds, 2006). La cantidad relativa respecto al fósforo en células con correcto almacenamiento se sitúa en torno a 13 – 19

mol N/mol P; valores relativos superiores a 30 mol N/mol P indican una deficiencia de fósforo en el sistema.

Las microalgas obtienen el nitrógeno del medio principalmente en forma de amonio (NH_4^+) porque es más fácilmente asimilable, aunque en condiciones de deficiencia de amonio pueden incorporar el nitrógeno en forma de nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-). Las algas mixotróficas pueden utilizar el nitrógeno orgánico en condiciones de baja iluminación, ya que en esta situación suele predominar el metabolismo heterótrofo respecto al autótrofo. Este tipo de algas únicamente utilizan sus funciones heterótrofas en las condiciones excepcionales, sabiendo que cuando se reestablecen las condiciones favorables vuelven a nutrirse de manera autótrofa.

La presencia de nitrógeno en forma amoniacal en el medio depende del pH y la temperatura, que controlan su equilibrio con el amoníaco. Por otra parte se ha observado en algunos estudios que el amonio presenta función de inhibición para algunas especies de microalgas en concentraciones no demasiado elevadas (Tomaselli, 2004). Esto se debe a que afecta a etapas del proceso fotosintético, aunque la tolerancia a él dependerá de la especie en cuestión. Por ejemplo *Spirulina* muestra inhibiciones en concentraciones de amonio de 200 mg N/L mientras que *Scenedesmus* es capaz de desarrollarse en medios que superan los 400 mg N/L de amonio.

- Micronutrientes

En complementación a los macronutrientes, otros elementos están presentes en la estructura citológica o participan en funciones relacionadas con ella. Generalmente estos elementos se encuentran en abundancia en el medio por lo que no limitan la actividad celular por la reducida cantidad que se necesita de ellos, por este motivo son conocidos como “elementos traza” o “micronutrientes” (Reynolds, 2006). En este grupo se hallan el Na, K, Ca, Mg y Cl como más representativos.

1.7.7 Oxígeno

El nivel de oxígeno disuelto debe ser controlado en los sistemas de cultivo de microalgas. Los problemas pueden aparecer por un exceso de gas disuelto que puede provocar la inhibición de la fijación de carbono a partir del dióxido de carbono disuelto. Como gas en disolución, su presencia en el medio acuoso estará determinada principalmente por la temperatura que es la que fija la concentración de saturación.

El oxígeno es producto de la actividad fotosintética por lo que puede alcanzar valores de hasta 40 mg O_2 /L en sistemas de cultivo de alta densidad, que junto al efecto de la radiación

favorece la aparición de radicales de oxígeno (Ruiz-Martinez, 2011). Los radicales tienen gran capacidad de unión con otros compuestos y elementos del medio que pueden resultar tóxicos para las algas. Por esta razón debe disponerse de sistemas que permitan el control y la eliminación del oxígeno del líquido. Generalmente se desabsorbe (*stripping*) el gas como consecuencia de la turbulencia provocada por la agitación.

1.7.8 Competencia con otros organismos

Mantener condiciones suficientemente controladas para favorecer el crecimiento de una sola especie en un sistema de cultivo no es sencillo, y resulta mucho más complicado si el sistema está situado al aire libre. Por esta razón es probable el desarrollo de especies no buscadas y/o deseadas dentro del medio acuático. La aparición de los nuevos microorganismos puede afectar al cumplimiento de los objetivos del sistema tanto de forma simbiótica como inhibiendo el desarrollo de la especie principal.

Los cultivos de microalgas suelen ser propensos a la contaminación por organismos no deseados. El contenido en amonio del alimento propicia la proliferación de bacterias amonioxidantes (AOB), a la vez favorecidas por la riqueza del oxígeno disuelto. Generalmente, las bacterias AOB consumen el nitrógeno inorgánico más fácilmente que las microalgas y pueden llegar a eliminarlo del sistema (Meseck *et al.*, 2007). De este modo la velocidad de crecimiento de las microalgas disminuirá por la reducción de la cantidad de alimento disponible. Para inhibir el crecimiento de las bacterias nitrificantes puede plantearse la adición de reactivos como la *allyl-thiourea* (Ginestet *et al.*, 1998).

En algunos casos en los que el alimento utilizado en los cultivos presenta coloración y turbulencia, la luz que llega a las microalgas se verá reducida, limitando de este modo su actividad fotosintética en favor de otros organismos que no la necesiten en su metabolismo. Estudios realizados en situaciones parecidas indican que diferentes especies de microalgas pueden resultar competitivas entre ellas en estas condiciones: *Chlorella* presenta ventaja competitiva frente a *Scenedesmus* en condiciones de limitación de luz (Marchillac *et al.*, 2014).

Pueden aparecer también relaciones alelopáticas entre las diferentes especies, pudiendo ser positivas o negativas, favoreciendo o inhibiendo el crecimiento de las microalgas. Por ejemplo, se conoce que algunas cianobacterias segregan una serie de metabolitos que afectan negativamente a distintas cepas de organismos fotoautótrofos (Suikkanen *et al.*, 2004).

1.7.9 Modo de operación

La forma en que se mantiene y se opera un cultivo determina también su capacidad de crecimiento. Son dos los modos utilizados comúnmente:

- Cultivos en *batch* o por lotes:

Es uno de los métodos más comunes para el cultivo de microalgas. Consiste en mantener en un recipiente una cantidad limitada de medio de cultivo, añadir un inóculo de algas y mantener las condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento. En ellos es necesario aplicar aireación y agitación, así como tener en cuenta la adición necesaria de CO₂. En casos más concretos pueden aplicarse métodos de iluminación artificial o de control de la temperatura si es necesario.

Este tipo de cultivos es utilizado en aplicaciones comerciales por su simplicidad y facilidad de operación. No requiere unas condiciones tan estériles como otros procesos porque al ser discontinuo no hay entradas de materia externa durante el ciclo. Generalmente en este tipo de sistemas, una parte del cultivo se guarda para utilizarse como inóculo en el ciclo productivo posterior (Lee y Shen, 2004).

Un ciclo de operación en *batch* pasa por las cuatro fases esenciales del crecimiento de las microalgas (figura 11):

1. **Fase de retardo:** Es la fase inicial en las que la velocidad de crecimiento está en valores sub-máximos. Este período tiene lugar por la presencia de células no viables en el inóculo y/o por la necesidad de adaptación fisiológica del cultivo al nuevo medio y condiciones de crecimiento.
2. **Fase exponencial:** Cuando las células ya se han adaptado a las condiciones al final de la fase de retardo empiezan a crecer y multiplicarse provocando un aumento exponencial en función de la biomasa en el sistema durante este período de tiempo. Esta fase tiene lugar siempre y cuando en el medio la concentración de sustrato y luz sea suficiente para abastecer a toda la biomasa sin limitación.
3. **Fase de crecimiento lineal:** Tras la fase exponencial, la concentración de biomasa en el cultivo será alta, por lo que la luz incidente no llegará a todas las células suponiendo una limitación en el crecimiento de cierta parte de las microalgas. En esta situación, el cultivo ya no crece a su máxima velocidad

quedando entonces en un estado prácticamente estacionario en lo que se refiere a concentración de células.

4. **Fase de muerte:** Por definición, en los cultivos en *batch* no hay alimentación por lo que una vez consumidos los nutrientes que se encontraban en el medio inicial, el crecimiento tendrá entonces una limitación por alimento, que junto a la que ya existía por luz provocarán que la concentración de biomasa del sistema empiece a descender. En este punto se da por finalizado el ciclo operacional del cultivo en *batch*.

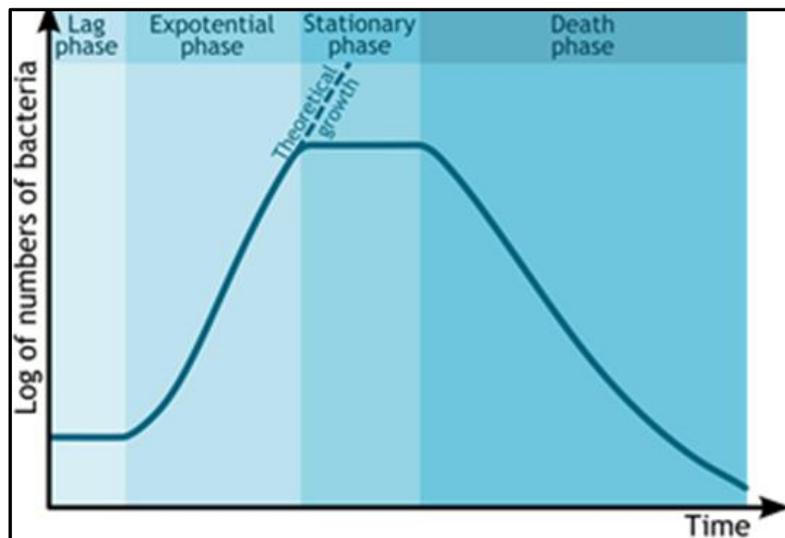


Figura 11. Representación gráfica de las fases de crecimiento en un cultivo en *batch*

- Cultivos en continuo:

En este tipo de cultivos la particularidad es que se suministra alimento fresco al medio, y a su vez una parte del cultivo se elimina del sistema mediante purgas. Las purgas deben ser una fracción de cultivo homogénea representativa de todo el volumen de reacción (aproximación a un tanque completamente agitado). Tanto las alimentaciones como las purgas pueden ser continuas o intermitentes (Lee y Shen, 2004).

El objetivo de este tipo de funcionamiento es extraer de manera continua un producto a partir de las purgas, y a la vez mantener el crecimiento de las microalgas en el interior del reactor. Para ello es importante un control sobre el estado en que se encuentra la concentración de nutrientes del medio para determinar la cantidad de alimento necesaria, antes de llegar a posibles inhibiciones por falta de nutrientes.

Generalmente los métodos continuos permiten una mayor producción de biomasa porque mantienen el cultivo en una fase exponencial constante, controlando la concentración mediante la purga, evitando así las limitaciones por luz ya comentadas. Sin embargo, el mantenimiento de un fotobioreactor en continuo para el cultivo de microalgas representa una mayor dificultad que un simple cultivo en *batch*, y un mayor riesgo de sufrir contaminaciones externas durante las constantes alimentaciones.

1.8 Producción en masa de microalgas

La utilización de las algas en aplicaciones a escala industrial requiere una gran cantidad de biomasa que debe ser obtenida a partir de los cultivos correspondientes. Como se ha comentado anteriormente, las algas pueden desarrollar su metabolismo de manera autótrofa, heterótrofa o mixotrófica. Sin embargo para la producción a gran escala únicamente resultará económica y técnicamente viable la aplicación de condiciones fotoautótrofas.

Para ello se utilizan fotobioreactores (FBR, *PBR* en inglés), que pueden ser definidos como el volumen de reacción usado para el crecimiento de organismos fotótrofos o para llevar a cabo reacciones fotobiológicas (Tredici, 2004). A pesar de la pragmática definición, el concepto de “fotobioreactor” suele asociarse a los sistemas cerrados de cultivo, quedando los sistemas abiertos definidos como estanques o canales.

Actualmente la producción comercial de microalgas se reduce a un limitado número de especies, cultivadas en sistemas abiertos con medios selectivos o en condiciones de alta velocidad de crecimiento (en inglés *high rate ponds*, HRP). Sin embargo, la mayoría de estos cultivos no pueden permanecer largos tiempos al aire libre debido al alto riesgo de contaminación por hongos, bacterias y protozoos, así como la competencia con otras microalgas. Los fotobioreactores ofrecen un entorno cerrado más protegido frente a invasiones y contaminaciones externas, pudiendo mantener en este caso las condiciones más adecuadas para el desarrollo de la especie deseada.

Las prospecciones futuras en cuanto al cultivo masivo de microalgas pasan por el desarrollo e investigación del diseño, optimización y operación de FBR, aunque no debe olvidarse que el coste técnico y económico aún está muy por encima del que presentan los sistemas abiertos. A continuación se describirán ambos sistemas de cultivo masivo por separado.

1.8.1 Estanques o canales abiertos

Como se ha indicado, la mayor parte de la producción actual de microalgas para uso comercial tiene lugar en sistemas abiertos. Las principales razones son la facilidad de construcción y operación, y el menor coste que representan frente a otros sistemas. La desventaja que presentan es el limitado número de especies que son capaces de desarrollarse satisfactoriamente en estas condiciones, inconveniente que trata de reducirse mediante la adaptación del sistema a cada situación y entorno particular, variando tamaño, profundidad, inclinación, forma, materiales de construcción o agitación entre otros parámetros.

Dependiendo de la forma de construcción y modo de operación los sistemas abiertos se pueden dividir en varios grupos.

- Lagunas o estanques naturales

Cuando las microalgas encuentran unas condiciones climáticas favorables y un medio suficientemente rico en nutrientes crecen rápidamente. Si el agua presenta características químicas que pueden resultar selectivas para la especie en cuestión como valores altos de pH y salinidad, el *bloom* formado podría llegar a ser incluso monoespecífico. Es entonces cuando el lago o estanque se dice que se encuentra en estado de eutrofización.

Estos sistemas son altamente productivos de forma natural. Las microalgas que crecen en ellos pueden ser recogidas directamente para su uso posterior. Un ejemplo se encuentra en ciertos lagos de la región del Chad (África) donde los integrantes de la tribu Kanembu cultivan y recogen las microalgas de sus lagunas con una finalidad nutricional (Tredici, 2004).

La figura 12 muestra en la imagen de la izquierda el proceso de recogida de las microalgas en un lago eutrofizado, y en la parte derecha el posterior tratamiento aplicado por las mujeres de la tribu antes de ser destinadas al consumo.



Figura 12. Ejemplo de laguna natural utilizada por la tribu Kanembu para el cultivo de microalgas

- Sistemas inclinados

La inclinación en su geometría genera turbulencia en el sistema provocada por el desplazamiento del cultivo en suspensión desde la parte superior hacia la inferior, usando la gravedad como fuerza impulsora. El cultivo debe ser impulsado mecánicamente a la parte superior posteriormente.

Estos sistemas han suscitado gran interés por la capacidad de disponer de dicha turbulencia a la vez que permiten gran delgadez en el recipiente (menor de 1 cm). Como resultado se permite obtener altas concentraciones de microorganismos y altos valores de la relación superficie-volumen, en comparación con sistemas planos.

No obstante, la configuración inclinada presenta inconvenientes como una mala distribución de la turbulencia en el sistema, que provoca problemas de sedimentación donde la agitación es baja o pérdidas de CO₂ por desabsorción en las zonas más turbulentas, o el alto coste energético requerido para impulsar el efluente desde la parte inferior hacia la superior.

- Estanques circulares

Esta disposición se muestra como una de las menos favorables para el cultivo comercial de microalgas debido a sus costes de obra civil y la energía requerida para la agitación necesaria. Sin embargo en países asiáticos como Japón, Taiwan o Indonesia están ampliamente extendidos para la producción de *Chlorella* (Tredici, 2004).

- Raceway ponds, canales

Son actualmente los sistemas más utilizados para el cultivo extensivo de microalgas. El ejemplo más sencillo consiste en una zanja poco profunda excavada en el suelo con un recubrimiento plástico en las paredes (figura 13). Su coste de construcción es relativamente bajo aunque debe tenerse en cuenta el tipo de terreno. El elemento más importante a cuidar en la construcción es la correcta fijación del recubrimiento plástico porque debe evitarse que el líquido lo sobrepase y puedan formarse acumulaciones de gas detrás de él.

A pesar de que puede proporcionar altos rendimientos en comparación con los demás sistemas abiertos presenta diversos inconvenientes. Por una parte no permite trabajar con profundidades de más de aproximadamente 15 cm para mantener la turbulencia adecuada en

el flujo. La gran superficie abierta propicia el ensuciamiento y contaminación exterior, así como grandes pérdidas por evaporación y un control prácticamente nulo de la temperatura.



Figura 13. Ejemplos de canales de cultivo de microalgas

Para un cultivo a gran escala la bibliografía únicamente admite como mínimamente viables el uso de los sistemas inclinados, los estanques circulares y los canales, aunque únicamente las dos últimas opciones son las que se utilizan comercialmente (Tredici, 2004).

1.8.2 Fotobioreactores

Los fotobioreactores pueden definirse como los sistemas de cultivo para organismos fotótrofos en los que la luz no incide directamente sobre el cultivo, sino que debe atravesar las paredes transparentes que lo cubre. De este modo los FBR no permiten un intercambio directo de gases y posibles contaminantes (polvo, otros microorganismos, esporas...) entre el cultivo y la atmósfera.

Existen numerosas alternativas de clasificación en función de los parámetros a los que se les preste más atención. Según el diseño los FBR pueden ser horizontales, inclinados, verticales, de tubo múltiple o en espiral, planos o tubulares. Una clasificación operacional diferencia entre los sistemas agitados mediante bombas o por aire, los que trabajan en fase única o multifásicos (aire-cultivo). Desde el punto de vista del material pueden ser de cristal o de plástico, rígidos o flexibles.

A continuación se describirán los tipos más comunes y que presentan las mejores características para los propósitos indicados.

- Fotobioreactores tubulares

En primer lugar se pueden citar los que adoptan forma de serpentín. Se trata de instalaciones con varios tubos largos y estrechos colocados en serie unidos por codos, que se disponen en horizontal o vertical (figura 14). El intercambio de gas y la adición de nutrientes tienen lugar en un depósito auxiliar, y la circulación del líquido se promueve mediante el uso de una bomba o un sistema de *airlift*.

Si los tubos en lugar de estar conectados en serie se disponen en paralelo y se conectan colectores en los extremos, uno para la distribución y el otro para la recogida del cultivo, entonces reciben el nombre de *manifold photobioreactors*. Esta geometría permite un ahorro de energía respecto a la distribución en serpentín porque reduce el número de pasos por los codos, evitando así la pérdida de carga que éstos aportan.

Otra disposición característica de los reactores tubulares es en forma helicoidal, construido con conducciones flexibles de diámetro reducido alrededor de estructuras verticales. Este diseño no es el más novedoso ya que se está utilizando desde los años 50 para el crecimiento de microalgas como *Chlorella*. Biotechna Ltd patentó un sistema comercial para el cultivo de microalgas denominado *biocoil*, que consistía en un FBR tubular de polietileno o PVC de entre 2,5 y 5 cm de diámetro soportado sobre un cilindro de 2 m de diámetro y 8 m de altura. Este sistema aporta un flujo más uniforme y una menor longitud de tubo minimizando la cantidad de oxígeno acumulado en el medio.

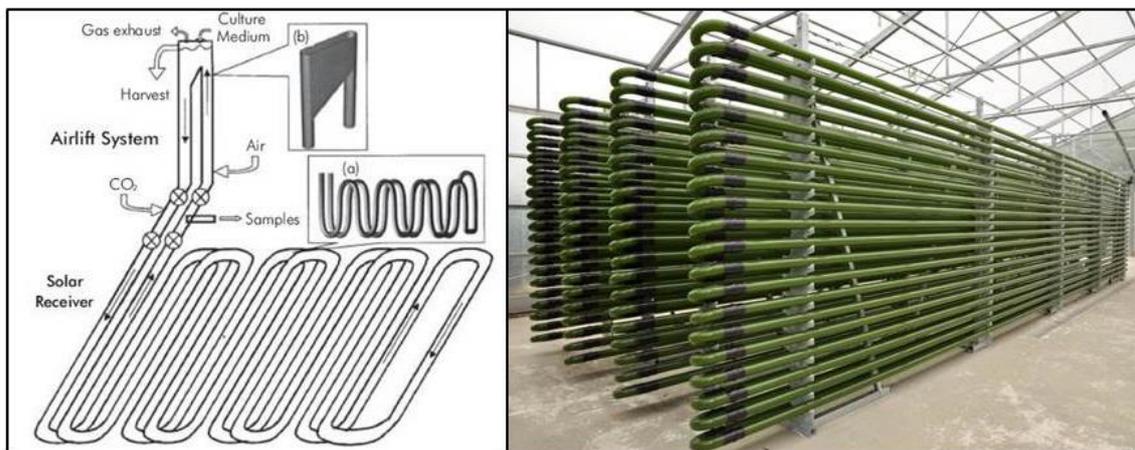


Figura 14. Esquema y fotografía real de un fotobioreactor tubular de disposición de serpentín

- Fotobioreactores planos

Los primeros FBR de diseño plano fueron utilizados en la década de los 50 por Milner para favorecer el crecimiento de *Chlorella* en una capa fina con turbulencia.

A finales de los 80 se introdujeron los paneles alveolares contruidos a partir de materiales comunes como PVC, policarbonato o metacrilato con el objetivo de construir sistemas económicamente viables. El diseño está basado en placas planas paralelas separadas internamente para formar estrechos canales por donde se dirige el flujo de cultivo (figura 15). Estas pequeñas conducciones son lo que confiere al sistema el adjetivo *alveolar*.



Figura 15. Sistema alveolar

La década siguiente apareció una nueva corriente en la que se eliminaban las finas paredes interiores en los extremos asegurando así la completa comunicación entre los canales y mejora la homogeneidad del cultivo en toda la superficie del panel (figura 16). En ellos se realizaron numerosos estudios sobre el efecto de las condiciones de operación como temperatura, inclinación, concentración de oxígeno o densidad de cultivo sobre el crecimiento de la biomasa. Entre los diferentes experimentos realizados uno de los resultados extraídos fue que en el momento que los reactores planos se disponían en posición prácticamente horizontal (5°), la productividad de biomasa era menor que en los reactores tubulares. La justificación fue que mayor superficie de recepción de luz del FBR plano llega a ser demasiado grande y provoca efectos de fotosaturación y fotoinhibición en el cultivo, mientras que los FBR tubulares permiten la dilución de la luz obteniendo valores más bajos pero óptimos a nivel de productividad.

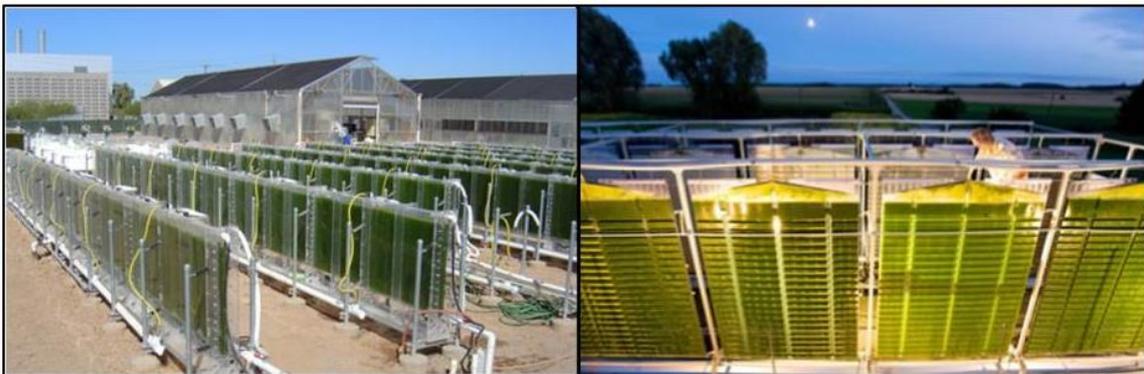


Figura 16. Ejemplos de instalaciones de fotobioreactores planos

- Fotobiorreactores cilíndricos o en mangas

Los FBR tubulares verticales (columna) son sistemas de alta simplicidad, en los que la agitación se consigue mediante la inyección de aire por la base del cilindro (figura 17). En los primeros estudios con esta disposición se observó que la productividad en un mismo reactor resultaba menor si se trabajaba en el exterior con luz solar, que en interior con luz artificial. La conclusión a la que se llegó fue que en el exterior el ángulo de incidencia de los rayos del sol es mucho mayor que en el otro caso, lo que puede suponer una gran parte de pérdida de radiación por el reflejo de las paredes del FBR.



Figura 17. Fotobiorreactores verticales, disposición de columna

Como alternativa a los sistemas cilíndricos verticales se propusieron alternativas de reactores desechables, contruidos a partir de tuberías transparentes de polietileno selladas en uno de sus extremos (figura 18). Se mantienen suspendidos en el aire mediante estructuras o soportados por la parte inferior, y la agitación también se aporta mediante el burbujeo de aire desde la base. Este modelo de FBR no cuenta con una larga vida útil debido a los problemas de ensuciamiento (*biofouling*) y la dificultad de limpieza dada su construcción, aunque tienen como principal ventaja su bajo coste y sencillez de operación. Son usados tanto en interiores aplicando luz artificial como en exteriores con la propia luz solar. La eficacia de estos sistemas es menor que otras disposiciones de FBR, pero su bajo coste y facilidad de operación llevan a realizar las comparaciones con los sistemas abiertos en cuanto a viabilidad técnica y económica, y es aquí donde sí presentan mejores resultados.



Figura 18. Fotobioreactores cilíndricos verticales, disposición de mangas

1.8.3 Criterios de diseño de los fotobioreactores

El objetivo en el diseño de un FBR es alcanzar la máxima producción de microalgas por unidad de volumen, buscando al mismo tiempo la estabilidad del proceso y la viabilidad económica. El factor principal a tener en cuenta es que un sistema no puede ser técnicamente diseñado sin un alto nivel de conocimiento de las especies de las que se quiere plantear el cultivo, ya que cada una tendrá sus características sobre las que deberá adaptarse el diseño. Los principales criterios de diseño a tener en cuenta son:

- **Relación superficie-volumen (S/V):** es la relación entre la superficie iluminada y el volumen del cultivo. Generalmente un valor alto de S/V se corresponde con alta concentración de células, y por tanto una mayor productividad. Las altas concentraciones de células reducen el coste y la dificultad de operación en los sistemas, por lo que se recomienda buscar valores altos de S/V. No obstante en los procesos de escalado se ha demostrado que no presentan los resultados esperados reportando una menor eficacia.
- **Orientación e inclinación:** la variación de la inclinación de los FBR permite modificar los valores de irradiación solar sobre la superficie. Los resultados destacables en estos parámetros se observan generalmente en zonas situadas a grandes latitudes, con los reactores en orientación este-oeste.
- **Acumulación de oxígeno:** la producción de oxígeno está directamente relacionada con la productividad volumétrica, y si se alcanzan valores entre cuatro o cinco veces la concentración de saturación puede resultar la inhibición del cultivo. Por esta razón hay

que tener en cuenta en el diseño la desgasificación constante. Este problema resulta más complicado de resolver en los sistemas de tubos de pequeño diámetro con disposición de serpentín.

- **Mezcla y agitación:** son parámetros totalmente necesarios para evitar la sedimentación de las microalgas, la estratificación en el medio líquido y la correcta homogeneización de los nutrientes y el oxígeno en todo el volumen. La elección del método y la intensidad de agitación vendrá dado por las características de la especie a cultivar. En algunos casos los microorganismos no pueden soportar el bombeo y debe favorecerse la mezcla mediante burbujeo.
- **Control de temperatura:** los sistemas abiertos muestran las mínimas temperaturas a primeras horas de la mañana, y horas después es necesario refrigerarlos por alcanzar las máximas en las horas centrales del día. Normalmente se usa agua pulverizada sobre las superficies para evitar un sobrecalentamiento que pueda afectar al cultivo. En algunos FBR se plantea la instalación de serpentines de refrigeración, en estos casos la temperatura es más constante durante toda la operación, evitando de este modo las fluctuaciones diarias de temperatura.
- **Suministro de dióxido de carbono:** el aporte de CO_2 es necesario tanto para el metabolismo del cultivo como para mantener el pH en los valores adecuados, aunque no siempre resulta sencillo hacerlo. La inyección debe controlarse esencialmente con el tiempo de residencia de las burbujas de gas inyectado en el sistema, ya que si este tiempo es insuficiente existen grandes pérdidas de CO_2 , lo que supone un aumento en el coste económico.
- **Materiales:** los materiales escogidos no deben aportar toxicidad al sistema (estabilidad química), tienen que caracterizarse por una alta transparencia y poseer durabilidad y resistencia para aguantar las condiciones de intemperie a las que serán sometidas.

1.9 Separación y post-tratamiento de las algas producidas

1.9.1 Separación

En el cultivo masivo de microalgas hay que tener en cuenta la separación de éstas al final de proceso, que supone entre el 20-30% del coste total, por lo que se requiere también un diseño optimizado para que el balance económico final sea viable.

El pequeño tamaño de las microalgas conlleva problemas a la hora de separarlas directamente del medio líquido, aunque se ha observado que algunas especies tienen capacidad de sedimentación, en otros casos se forman agregados que permiten también la decantación e incluso existen microalgas en las que su densidad relativa les permite flotar.

Un cultivo general no tiene un método específico de separación, sino que deberá adaptarse a cada situación siendo necesarios en algunos casos la aplicación de varias etapas. La técnica a utilizar depende de la especie con la que se esté trabajando, la densidad del cultivo y la calidad de producto final requerida dependiendo de su destino. A continuación se listan las técnicas más comúnmente aplicadas:

- Flotación: no requiere de la adición de reactivos, aunque sólo es aplicable a las especies que son capaces de flotar de manera natural.
- Floculación: adición de reactivos con el objetivo de neutralizar las cargas superficiales que poseen las membranas celulares, permitiendo de este modo la agregación de las microalgas.
- Decantación: sólo aplicable en algunos casos concretos ya que depende del tamaño y densidad de las microalgas. Puede ser mejorado mediante la aplicación de ultrasonidos.
- Centrifugación: es la técnica más utilizada actualmente y la que presenta los mejores resultados, aunque tiene como inconveniente un alto coste económico. Por esta razón sólo se aplica en los productos de alto valor añadido.
- Filtración: se basa en el uso de membranas de microfiltración, ultrafiltración o filtración al vacío entre otras. Es una técnica en competencia con la centrifugación si se aplica a caudales bajos, pero su rentabilidad disminuye notoriamente cuando se aumentan los caudales de tratamiento.

La selección del método a aplicar vendrá determinada por el balance general de costes del proceso, teniendo en cuenta el valor y calidad del producto que se quiere obtener. En los casos de bajo valor se utilizará la sedimentación por gravedad, reforzada con floculación si es necesario. Los productos de alto valor añadido se obtendrán mediante procesos de centrifugación o filtración.

1.9.2 Post-tratamiento

Tras la separación de la biomasa del cultivo, el producto debe ser procesado rápidamente porque puede dañarse y perder sus propiedades en cortos períodos de tiempo. Generalmente se aplica la deshidratación para evitar posibles reacciones de descomposición. Sin embargo, el

grado de sequedad depende de la aplicación final de las microalgas. Para la producción de biodiesel las microalgas deben disponer de unos valores de sequedad establecidos de los que dependerá en gran parte la rentabilidad del proceso.

Otros productos se basan en la extracción de material intracelular de las células. En estos casos el objetivo es la ruptura de las paredes celulares y los métodos utilizados son el prensado, aplicación de disolventes, autoclavado, uso de enzimas o aplicación de altas presiones.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es la determinación experimental de la influencia de las características del alimento, el tipo de aireación, la variación de temperatura y la intensidad lumínica en la eliminación de nutrientes de un efluente de un reactor anaerobio de membranas mediante un cultivo de microalgas en planta piloto.

Para la consecución de dicho objetivo principal, se plantean una serie de objetivos específicos citados a continuación:

- Utilizar dos fotobiorreactores a escala de demostración para el cultivo de las microalgas.
- Determinar el rendimiento de eliminación de nutrientes: amonio y fosfato.
- Relacionar los rendimientos obtenidos con las diferentes condiciones de operación.
- Estudiar la evolución poblacional de las especies de microalgas presentes en el cultivo.
- Determinar el crecimiento del cultivo a partir de medidas de sólidos suspendidos y de densidad óptica.
- Optimizar las condiciones de operación en función de los resultados obtenidos para los parámetros de operación estudiados.
- Controlar las condiciones de operación para evitar la aparición de bacterias amonioxidantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Planta piloto: Fotobioreactor de membranas

En la EDAR de la Cuenca del Carraixet (Alboraya, Valencia) está situada la planta a escala de demostración para la depuración de aguas residuales a partir de fotobioreactores de membranas (MPBR). El objetivo de esta planta es la eliminación de los nutrientes del efluente de un sistema AnMBR (Gimenez *et al.*, 2011) mediante la utilización de cultivos masivos de microalgas autóctonas.

La planta MPBR está compuesta por 4 FBR (figura 19), dispuestos de manera que 2 quedan frente a los otros 2. Cada uno de estos reactores tiene 1,2 m de altura, 2 m de ancho y 0,25 m de profundidad, lo que supone un volumen total unitario máximo de 600 L, aunque el volumen de trabajo normal se mantiene en torno a los 550 L. El volumen de operación en los FBR se conoce a partir de una cinta métrica dispuesta en las paredes, donde conocida la altura de nivel de líquido se puede calcular el volumen (figura 20).



Figura 19. Perspectiva de la planta en general y detalle de un FBR

Los reactores cuentan con un sistema de aireación basado en dos conducciones perforadas situadas en la parte inferior de los tanques, en los laterales de los FBR. Esta disposición tiene como objetivo que la generación de burbujas incida directamente sobre las paredes para evitar su ensuciamiento. El mismo sistema de aireación proporciona la agitación necesaria para mantener la homogeneidad y evitar la decantación de las microalgas.

Cada uno de los reactores cuenta con un sistema de refrigeración consistente en un serpentín de acero inoxidable sumergido en el cultivo, por el que se fuerza la circulación de una corriente

de agua. El agua de refrigeración circula por un circuito cerrado, y la refrigeración de ésta se lleva a cabo en un dispositivo acondicionador de la marca DAIKIN (modelo Zandvoordestraat 300 B-8400).

La planta cuenta también con un sistema de control de pH. Las medidas de pH se recogen en tiempo real mediante sondas instaladas en cada FBR, a partir de los valores medidos se abre o cierra automáticamente una electroválvula que permite el paso de CO₂. La adición del gas se realiza en las mismas conducciones de aireación del sistema.

En lo que respecta a la iluminación, la planta está orientada hacia el sur para contar con la máxima irradiación diaria. Paralelamente, todos los FBR disponen de un sistema de iluminación artificial formado por 12 lámparas de 45 W situadas en la cara opuesta a la que reciben la luz solar (figura 20). Las lámparas están conectadas de tal modo que pueden estar encendidas todas, la mitad o ninguna.



Figura 20. Detalle de las lámparas del sistema de iluminación artificial y de la cinta métrica para el cálculo de volumen

Los datos operaciones de la planta están monitorizados mediante un sistema SCADA diseñado específicamente para la instalación. Este sistema de adquisición de datos obtiene la información a través de un PLC donde llegan las señales de las diferentes sondas y elementos de control. Todos los FBR cuentan con sondas de oxígeno disuelto, nutrientes, pH, temperatura y sólidos en suspensión. Las mediciones de las sondas están centralizadas en un módulo de control de la marca Hach Lange, modelo SC 1000 (figura 21). El SCADA muestra otra información del proceso como por ejemplo la frecuencia de trabajo de las soplantes, grado de

apertura de válvulas o tiempos de ciclos de alimentación, entre otros. A su vez permite modificar parámetros del proceso.

La planta MPBR inicia su funcionamiento con la entrada del alimento a los FBR, procedente de un depósito intermedio (DI, figura 21) en el que se airea el efluente de la planta SAnMBR. El objetivo de la aireación previa al proceso es evitar la entrada de sulfuros procedentes del proceso anaerobio. En los FBR se inyecta aire enriquecido en CO_2 tal y como ya se ha comentado a partir del sistema de aireación instalado. En los FBR las microalgas desarrollan su crecimiento a partir de la luz que reciben a través de las paredes transparentes de los tanques.



Figura 21. Imagen del módulo de control de las sondas SC 1000 y DI

La planta SAnMBR de la que proviene el alimento para los FBR está situada también en la misma EDAR. La alimentación de SAnMBR es agua residual procedente de la salida del pretratamiento de la EDAR industrial.

Como características generales del reactor anaerobio se puede comentar que dispone de un caudal máximo de diseño de 1200 L/h, de los que se puede asumir un flujo neto de $20 \text{ L/m}^2 \cdot \text{h}$ pudiendo alcanzar así un TRH mínimo de 2 h. El volumen total del reactor es de $1,3 \text{ m}^3$, del que 400 L se mantienen como espacio de cabeza para el almacenamiento del biogás producido. Cuenta con dos módulos de membranas conectados al reactor, cada uno con un volumen total de 800 L, de los cuales 200 L corresponden al espacio de cabeza. La superficie total de las membranas es de 60 m^2 y el tamaño de poro es de $0,05 \mu\text{m}$ (Gimenez *et al.*, 2011). En la figura 22 se muestra una fotografía y el diagrama de flujo de la instalación.

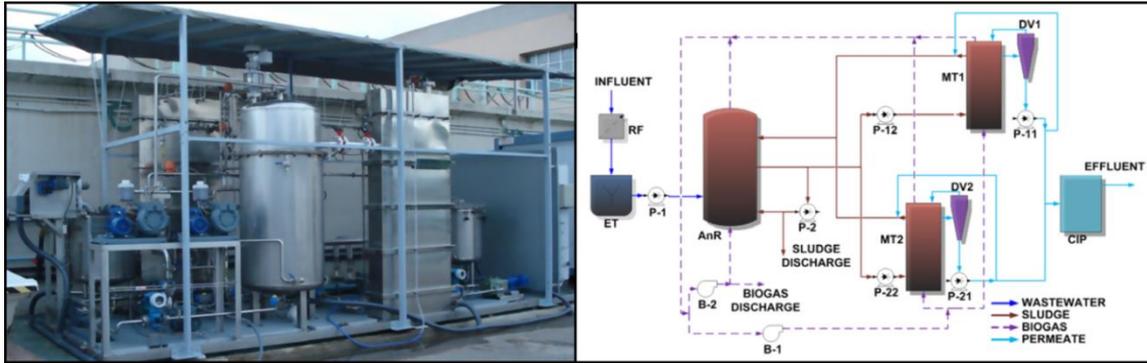


Figura 22. Fotografía y diagrama de flujo del reactor anaerobio de membranas SAnMBR

3.2 Operación y mantenimiento

Para que los resultados obtenidos sean comparables entre ellos deben establecerse unas condiciones de operación concretas y unos protocolos de trabajo a mantener durante toda la experimentación.

A continuación se indican las directrices seguidas durante los ensayos realizados.

3.2.1 Toma de muestra

Las muestras se tomaban directamente de los FBR con la aireación activa y a primera hora de la mañana, como paso previo a cualquier otra acción realizada. Se usaba una botella de 500 mL de capacidad para garantizar la representatividad de la muestra y de cristal color topacio para evitar la incidencia de la luz solar.

La periodicidad de la toma de muestra se estableció en tres veces por semana y el almacenamiento se realizaba en nevera, usando un recipiente isoterma para el transporte.

3.2.2 Alimentación, purga y TRC

Uno de los parámetros de operación fijados es el tiempo de retención celular. Representa el tiempo medio que permanece la biomasa dentro del sistema, y como en el caso de estudio no existen recirculaciones ni purgas internas, el parámetro es igual al tiempo de retención hidráulico. Para mantener el volumen constante de los FBR el volumen purgado era exactamente el mismo que el alimentado, por lo que el valor del TRC se determinó según la expresión siguiente:

$$TRC = TRH = \frac{V_{FBR}}{Q_{alim}} = \frac{V_{FBR}}{Q_{purgado}}$$

Como parámetro inicial a mantener durante toda la experimentación (excepto en el Ensayo 1 que se describirá más adelante) se estableció un TRC de 8 días. Asumiendo un volumen de 550 L en cada FBR el volumen purgado y posteriormente alimentado es de aproximadamente 70 L diarios. Al final de cada semana el volumen purgado y alimentado debía encontrarse en torno a 490 L en cada reactor.

Las purgas se realizaban por conducciones situadas en el fondo de los recipientes, y se mantenía la aireación para evitar la sedimentación de la biomasa asegurando así que el volumen extraído era una muestra representativa del resto de sistema.

3.2.3 Limpieza y mantenimiento de los FBR

Los cultivos de microalgas tienen como inconveniente la facilidad de las algas para adherirse sobre las superficies. En los FBR utilizados se observaba este fenómeno en forma de película viscosa de apariencia verdosa depositada en los reactores.

Estas formaciones deben ser eliminadas lo antes posible para evitar la aparición de zonas que puedan favorecer el crecimiento de bacterias, y a la vez porque disminuyen la transparencia de las paredes y por tanto la intensidad de luz que llega al cultivo. Por esta razón, las tareas de limpieza se realizaban dos veces por semana, y en ellas se rascaban las paredes hasta eliminar esta biopelícula.

3.2.4 Inhibición del crecimiento de bacterias nitrificantes

La alta concentración de nutrientes en el medio fomenta el desarrollo de bacterias amonioxidantes debido a que se ven favorecidas por el medio rico en oxígeno, dióxido de carbono y con la elevada concentración de amonio. El desarrollo de estas bacterias supone una relación competitiva con las algas.

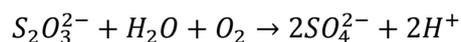
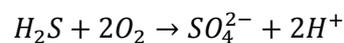
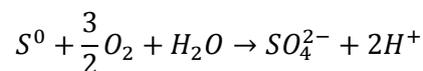
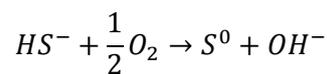
Al tratarse de un estudio de investigación sobre la actividad de las microalgas, se ha evitado su crecimiento utilizando un reactivo que actúa como inhibidor metabólico: alyl-thiourea (Ginestet *et al.*, 1998; Risgaard-Petersen *et al.*, 2004). Con este fin, se ha mantenido una concentración de 5 ppm de este compuesto en los reactores.

El control del crecimiento de las bacterias se realiza a partir de la concentración de nitratos y nitritos en el medio, que indicarán que existen reacciones de nitrificación. Se consideran aceptables valores máximos de 1,5 ppm de NO_3 , y en el caso de ser superados se aumenta puntualmente la dosis de inhibidor hasta volver valores bajos.

3.3 Características del alimento: efluente de SAnMBR y agua residual artificial

De acuerdo con lo comentado, los FBR con los que se realiza el estudio se alimentaron con el efluente de la planta piloto SAnMBR. La concentración de nutrientes se mantiene alta por lo que es un medio favorable para el crecimiento de las microalgas.

El inconveniente es el alto contenido en sulfuros producto del metabolismo de las bacterias sulfatoreductoras (SRB) en las condiciones anaerobias del reactor. Este compuesto puede resultar tóxico para las algas, por lo que es necesario eliminarlo del alimento antes de ser aplicado a los cultivos. Para ello el efluente del reactor anaerobio se almacena en un depósito intermedio que se encuentra situado entre el tanque CIP (Clean-In-Place) de la planta SAnMBR y la entrada de la planta MPBR. El DI tiene una capacidad de aproximadamente 1 m³ y cuenta con un difusor de membrana que permite introducir aire comprimido para eliminar los sulfuros del agua. La aplicación de oxígeno permite la oxidación del sulfuro a azufre elemental y/o sulfato, que son inocuos para las microalgas. Las reacciones químicas que describen el proceso son las siguientes (Ramos *et al.*, 2014a; Ramos *et al.*, 2014b):



Durante todo el período experimental se realizaron analíticas de nutrientes en el alimento cada vez que se tomaba muestra de los propios reactores. La tabla 5 muestra los promedios de las concentraciones de amonio, nitrato, nitrito y fosfato del alimento en los diferentes ensayos.

Tabla 5. Concentración de NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ y PO₄³⁻ en el alimento durante los ensayos

| PROMEDIO | NH ₄ ⁺ (mg N/L) | SD | NO ₂ ⁻ (mg N/L) | SD | NO ₃ ⁻ (mg N/L) | SD | PO ₄ ³⁻ (mg P/L) | SD |
|----------|--|-----|--|-----|--|-----|---|-----|
| Ensayo 1 | 53,4 | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 7,2 | 0,2 |
| Ensayo 2 | 56,0 | 4,2 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,1 | 6,2 | 0,9 |
| Ensayo 3 | 57,7 | 3,3 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 5,7 | 0,6 |
| Ensayo 4 | 53,0 | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 6,1 | 1,1 |

Otra de las características del alimento es que no posee una concentración de sólidos apreciable, teniendo en cuenta que la corriente proviene de un tratamiento de filtración por membranas en las que el tamaño de poro es de 0,05 μm . La única aportación de sólidos que puede aparecer es la debida a la formación del azufre elemental como producto de la eliminación del sulfuro, pero que como se ha comentado no afecta al proceso porque la cantidad no es significativa. La concentración de sólidos es importante reducirla al máximo en las corrientes que entren a los FBR para evitar el posible obstáculo a la luz que reducirá la cantidad recibida por las microalgas.

En uno de los ensayos el objetivo del estudio era comprobar el funcionamiento del sistema con un alimento artificial. Dicho alimento se preparó en el laboratorio a partir de una dilución de nutrientes a una concentración determinada. En el presente trabajo se estableció que la concentración del alimento artificial debía representar el caso real de operación, es decir, que la concentración de nutrientes debería asemejarse a la que poseía el efluente de SANMBR. De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 5, el alimento se elaboró de modo que la relación entre nitrógeno y fósforo fuera 10:1.

3.4 Medición de nutrientes

Las analíticas de concentración de nutrientes se realizaron mediante un analizador automático de la marca *Westco Scientific Instruments*, modelo Smartchem 200 (Analyzer Medical System). En él se midieron nitrógeno amoniacal (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}). Los métodos de medida utilizados (tabla 6) están normalizados por la *American Public Health Association* y *American Water Works Association* (APHA-AWWA, 2005).

Tabla 6. Métodos utilizados para la medición de nutrientes en el analizador automático

| Parámetro | Unidades | Rango de medida | Normalización US EPA | Normalización <i>Standard Methods</i> |
|-----------|----------|-----------------|----------------------|---------------------------------------|
| Amonio | mg N/L | 1 – 7,76 | US EPA 350.1 | 4500-NH ₃ -G |
| Nitrito | mg N/L | 0 – 6,0 | US EPA 354.1 | 4500-NO ₂ -B |
| Nitrato | mg N/L | 0 – 15,5 | US EPA 353.2 | 4500-NO ₃ -H |
| Fosfato | mg P/L | 0 – 3,2 | US EPA 365.1 | 4500-P-F |

Fuente: (APHA-AWWA, 2005)

Debe tenerse en cuenta que la medición de nitrato representa realmente la concentración de $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ por lo que el valor real de nitrato se obtendrá por diferencia entre los valores de nitrato y nitrito proporcionados por el equipo.

3.5 Seguimiento del crecimiento poblacional

El seguimiento poblacional se basa en la observación, tanto cuantitativa como cualitativa, de la evolución de la concentración de biomasa presente en el sistema. Para ello se han utilizado dos métodos diferentes: la medición gravimétrica de sólidos suspendidos (totales y volátiles) y el recuento de especies en el microscopio óptico.

3.5.1 Determinación de sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV)

La determinación de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) se realizó utilizando dos métodos diferentes. Por una parte se utilizó el método tradicional indicado por el manual *Standard Methods*, y por otra parte mediante el ajuste de mediciones de densidad óptica.

- Método indicado por *Standard Methods*

Según el método normalizado de referencia 2540-D propuesto por *Standard Methods* (APHA-AWWA, 2005), el procedimiento consiste en filtrar un volumen conocido (durante el caso de estudio se usó siempre 50 mL) a través de un filtro de policarbonato de 0,47 µm y someter los sólidos retenidos en el filtro en una estufa a 105°C, con el objetivo de eliminar la humedad residual. La cantidad de SST se obtiene por diferencia entre el peso del filtro antes y después de secado, dividido por el volumen filtrado.

$$SST = \frac{P_2 - P_1}{V}$$

dónde:

P_1 Peso filtro
 P_2 Peso después de la estufa (105°C)
 V Volumen de muestra

La concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinó mediante la metodología indicada en *Standard Methods* (2540-E). Consiste en utilizar el mismo filtro con la muestra ya deshidratada (ver pasos de determinación de SST) y aplicarle una temperatura de 550°C en un horno mufla. La concentración de SSV se obtiene por diferencia de pesos entre el filtro antes y después de pasar por la mufla.

$$SSV = \frac{P_2 - P_3}{V}$$

dónde:

P_3 Peso después de la mufla (550°C)

- Método a partir de mediciones de densidad óptica

El procedimiento consistió en la utilización de valores de densidad óptica medidas *in situ* en la planta para poder obtener valores de concentración de sólidos suspendidos.

La densidad óptica (OD) se define como $OD = -\log(I/I_0)$, donde I_0 es la irradiación medida a través de la cubeta con agua destilada, e I es la irradiación medida a través de la cubeta con la muestra. La irradiación puede medirse a diferentes valores de longitud de onda, pero en el caso de estudio se utilizará la calibración a 680 nm. La densidad óptica a 680 nm (OD680) representa la dispersión de la luz y la absorción de ésta por parte de la clorofila. Estos valores podrán relacionarse linealmente con la concentración de sólidos suspendidos a partir de las calibraciones previas correspondientes (Photon Systems instruments (PSI), 2014).

Para realizar estas mediciones se utiliza un fluorómetro, marca PSI (Photon Systems Instruments), modelo AquaPen-C AP-C 100. Este equipo está destinado a la medición de parámetros fotosintéticos en suspensiones acuosas de algas y cianobacterias.

3.5.2 Recuento de las poblaciones fitoplanctónicas

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

- La muestra se fija con glutaraldehído hasta una concentración final del 2%.
- Se filtra un volumen conocido a través de un filtro de policarbonato de 0,2 μm de tamaño de poro.
- Se eliminan las sales con agua destilada.
- Se lava la muestra filtrada con etanol acuoso al 50, 80, 90 y 100 % sucesivamente.
- Se seca el filtro y se prepara con aceite de inmersión para su observación microscópica.
- Con los conteos se calcula la densidad celular (cel/L) de cada grupo taxonómico y su porcentaje en abundancia.

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

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Diseño experimental

Conforme con el objetivo principal del presente trabajo final de máster de estudiar la influencia de diferentes condiciones de operación sobre el rendimiento de eliminación de nutrientes en un cultivo de microalgas en una planta piloto, se han utilizado dos de los FBR de la planta piloto MPBR (FBR-1 y FBR-2). Uno de los FBR se mantendrá como unidad de control y en el otro se variarán las condiciones para evaluar el efecto.

El experimento se ha llevado a cabo durante 113 días. La tabla 7 recoge los diferentes ensayos realizados.

Tabla 7. Distribución de ensayos realizados durante todo el período experimental

| Identificación | Inicio | Final | Duración | Parámetro |
|----------------|--------|---------|----------|---------------------|
| Ensayo 1 | día 1 | día 16 | 16 días | Alimento artificial |
| Ensayo 2 | día 24 | día 66 | 43 días | Tamaño de burbuja |
| Ensayo 3 | día 68 | día 94 | 27 días | Temperatura libre |
| Ensayo 4 | día 94 | día 113 | 19 días | Luz |

En todos los ensayos se han mantenido los parámetros de operación iguales en ambos FBR, excepto el parámetro a estudiar. Dichos parámetros de operación son pH, temperatura, aireación y agitación, condiciones de iluminación y TRC. La duración de cada ensayo se ha establecido en función de la respuesta del sistema, es decir, se ha decidido marcar el punto final una vez alcanzado un estado estacionario en los FBR.

4.2 Ensayo 1: Estudio de la eficacia de un alimento artificial sobre el crecimiento de las microalgas

Tiene como objetivo comprobar la viabilidad del uso de un alimento preparado artificialmente para el crecimiento de los cultivos de la planta piloto, que en condiciones normales son alimentados con el efluente del reactor SANMBR.

Se inició con la aplicación de 1 L de alimento artificial (NH_4^+ : 10 g N/L y PO_4^{3-} : 1 g P/L) diluido en 225 L de agua de servicio de la EDAR de Carraixet, resultando una alimentación con 44 mg N/L de NH_4^+ y 4 mg P/L de PO_4^{3-} aproximadamente. El fotobioreactor con las nuevas condiciones fue el FBR-1, utilizando como unidades de control los FBR-3 y FBR-4 que eran los que estaban en funcionamiento en ese momento en la planta MPBR.

El ensayo se inició el día 1 de experimentación a partir del cultivo existente en el reactor, y se prolongó durante 16 días.

4.2.1 Resultados y discusión del Ensayo 1

La discusión del Ensayo 1 se realizará a partir de las analíticas de nutrientes en los tres fotobioreactores empleados. En la figuras 23 y 24 se representa la evolución de las concentraciones de amonio y fosfato, respectivamente.

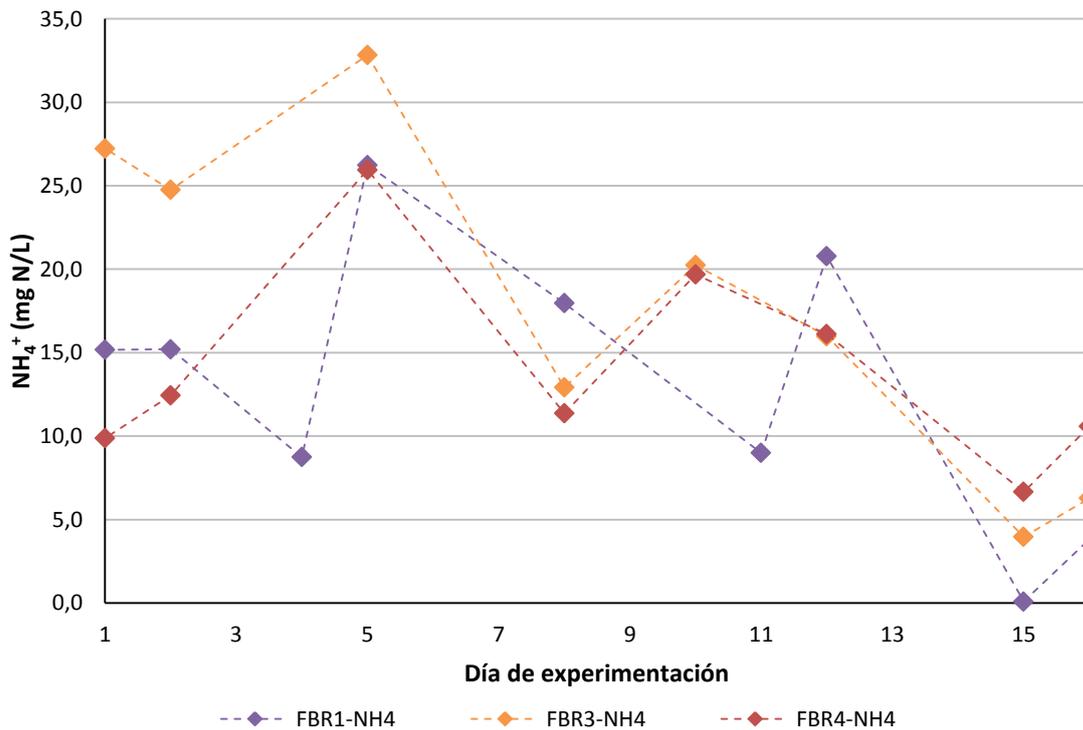


Figura 23. Evolución de la concentración de amonio durante el Ensayo 1

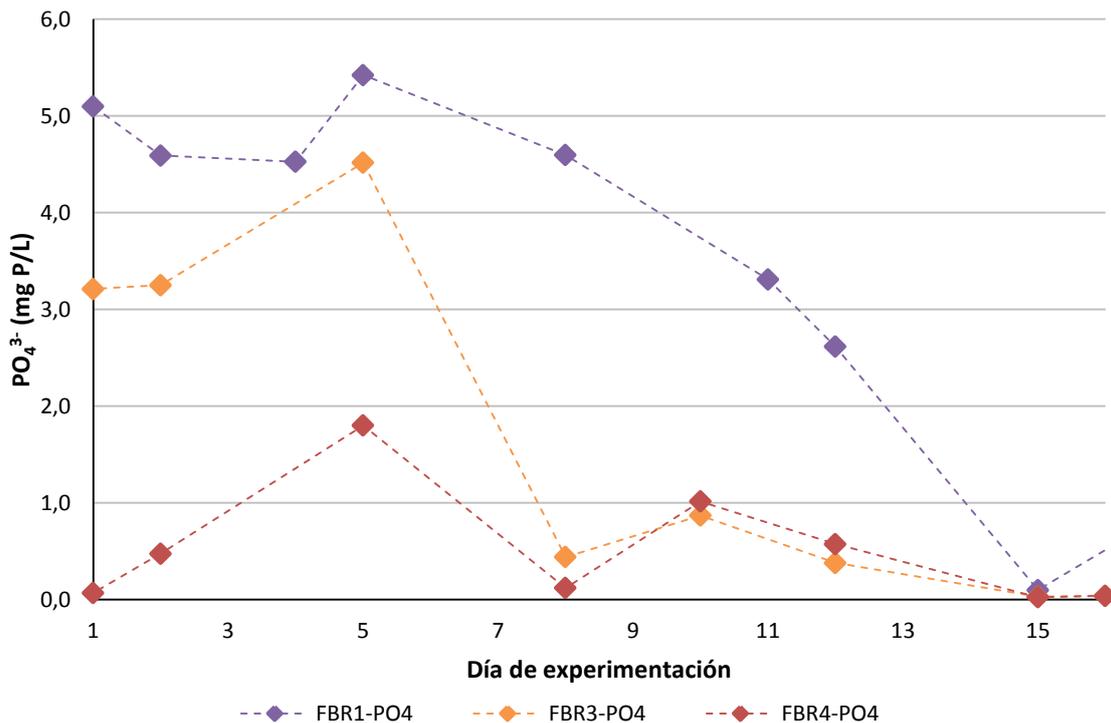


Figura 24. Evolución de la concentración de fosfato durante el Ensayo 1

La concentración de amonio en el FBR-1 (alimento artificial) durante los primeros días fue similar a la que se encontraba en el FBR-4, manteniéndose el FBR-3 en valores superiores. A partir del día 5 los valores en los 3 reactores se aproximaron y las tendencias que siguieron fueron similares hasta el final del experimento.

Respecto a la concentración de fosfatos, tras la primera alimentación quedó más alta la concentración de este nutriente en el FBR-1, y fueron notablemente diferentes las concentraciones entre los tres FBR. A partir del día 5, las concentraciones experimentaron una disminución importante, aunque en el FBR-1 fue notablemente menos brusca que en los FBR-3 y FBR-4. Sin embargo, la tendencia de disminución que siguen los tres reactores se puede considerar similar.

De acuerdo con este estudio semi-cualitativo se puede afirmar que el uso del alimento artificial preparado puede ser usado como sustitutivo del efluente de SAnMBR. Durante los 16 días de experimentación del Ensayo 1, el cultivo se ha mantenido activo y el funcionamiento de las microalgas del FBR-1 ha seguido las mismas tendencias que en los otros FBR, que estaban siendo alimentados y operados en las condiciones normales de la planta MPBR.

4.3 Ensayo 2: Estudio de la influencia del tamaño de burbuja en el sistema de aireación sobre el crecimiento de las microalgas

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto sobre los cultivos de un nuevo sistema de aireación que permite suministrar el aire comprimido con un tamaño de burbuja menor. Para ello se instaló en el FBR-1 un difusor de neopreno microperforado, manteniendo en el FBR-2 el sistema de conducción perforada original (mencionado en el apartado 3.1).

Durante este experimento se mantuvo el control de pH y temperatura, y la misma cantidad de luces encendidas. Las alimentaciones y purgas periódicas tenían la finalidad de mantener los valores de TRC en torno a 8 días.

El Ensayo 2 se inició el día 24 de experimentación y tuvo una duración total de 43 días, dividido en dos etapas (debido a la necesidad de realizar una resiembra del cultivo). La primera etapa se desarrolló entre los días 24 y 42 (19 días de duración) y la segunda etapa entre los días 43 y 66 (24 días de duración).

4.3.1 Resultados y discusión del Ensayo 2

Según lo planteado en el diseño experimental, las condiciones de pH, temperatura y TRC se mantuvieron controladas. Las figuras 25 y 26 muestran la evolución de dichos parámetros durante el ensayo, separadas las dos etapas por una línea vertical.

En la figura 25 se muestra la evolución de la temperatura medida en el interior de los FBR. La temperatura promedio registrada durante el ensayo fue de $22,3 \pm 2,3$ °C en el FBR-1 y $21,7 \pm 2,6$ °C en el FBR-2. El sistema de regulación de temperatura permitió reducir considerablemente las oscilaciones en los reactores respecto las observadas en la temperatura ambiente. La variabilidad de la temperatura es alta a lo largo de la experimentación pero los valores entre los FBR se mantienen prácticamente iguales, por lo que a efectos de comparación de resultados ambos fotobioreactores han estado sometidos a las mismas condiciones.

El control de pH (figura 26) permitió obtener unos valores promedio de $7,32 \pm 0,16$ y $7,38 \pm 0,18$ en el FBR-1 y FBR-2, respectivamente. El crecimiento de las bacterias amonioxidantes se mantuvo también controlado con la adición del inhibidor, lo que se demuestra con el hecho de que no se sobrepasó en ningún momento una concentración de 1 ppm de nitrato y la concentración de nitrito fue de 0 ppm en durante todo el ensayo.

En el caso del TRC, al inicio del ensayo fue algo más bajo debido a la variabilidad de las primeras alimentaciones y purgas hasta estabilizar el proceso. Al inicio de la segunda etapa presentó valores más altos porque tras la resiembra se operó en *batch* durante la primera semana. La intención era favorecer un aumento rápido de la concentración de biomasa en el sistema. Tras esta semana inicial, se volvieron a restablecer las condiciones de alimentación y purga. Sin embargo, a pesar de las pequeñas oscilaciones el TRC medio del Ensayo 2 se mantuvo en torno a 8 días.

Estos resultados muestran que las condiciones durante las dos etapas del Ensayo 2 fueron similares, por lo que las dos partes que constituyen el ensayo serán comparables a efectos de discusión de resultados.

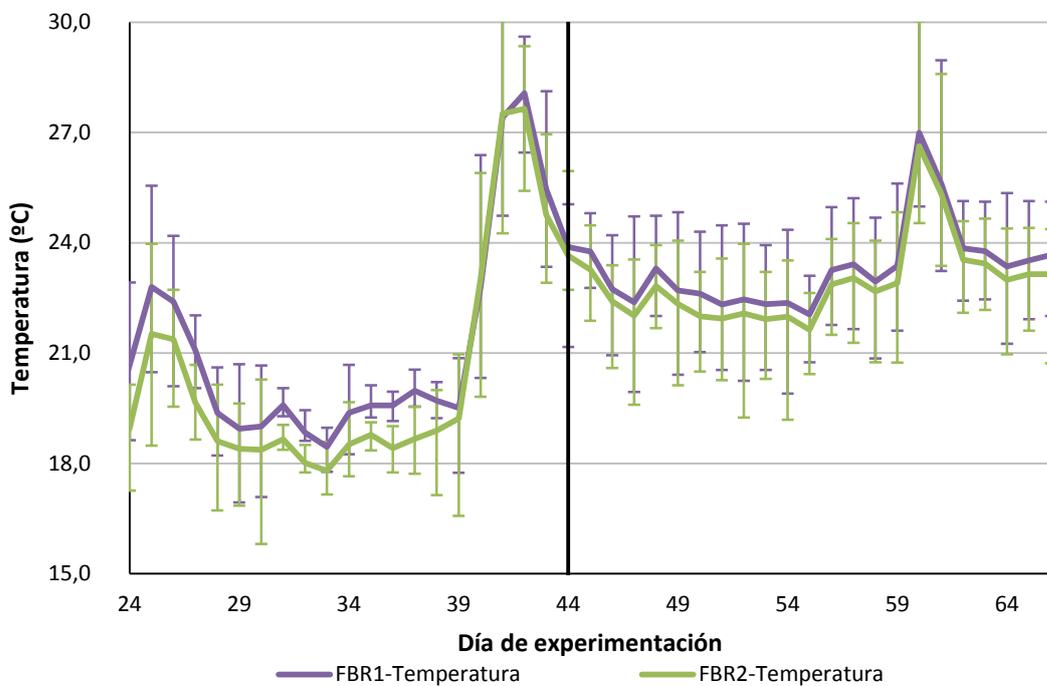


Figura 25. Evolución de la temperatura en los FBR en el Ensayo 2

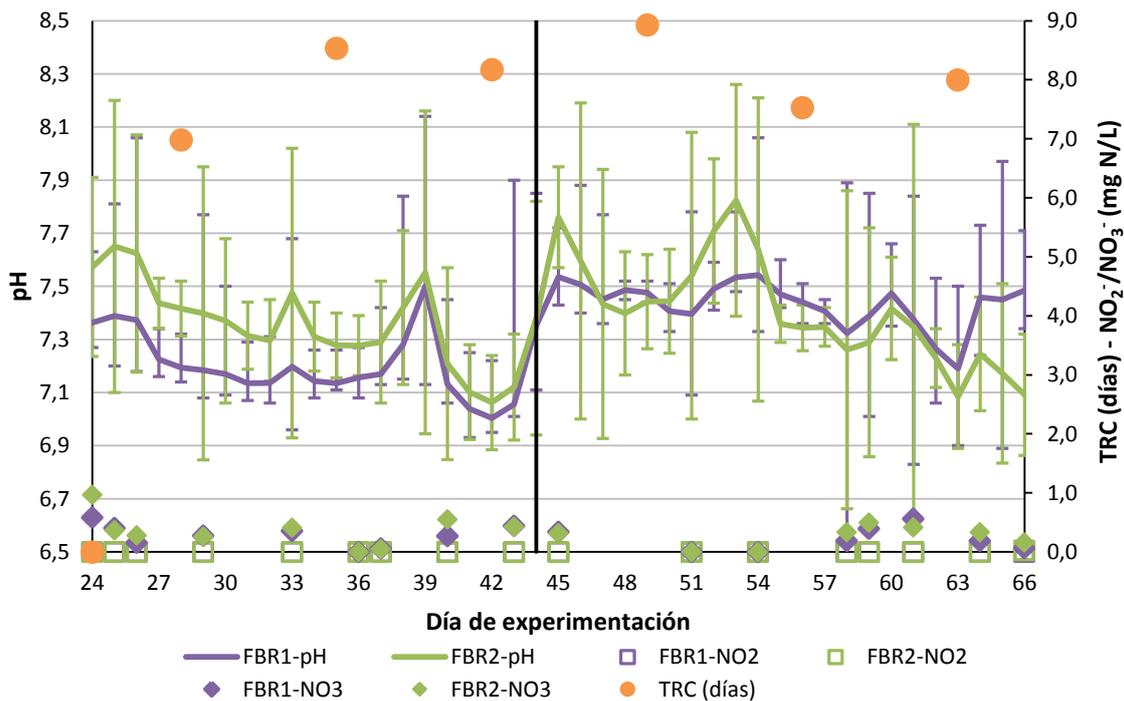


Figura 26. Representación de pH, TRC, concentración de NO₂⁻ y NO₃⁻ en los FBR en el Ensayo 2

En la figura 27 se muestra la concentración de nutrientes en el medio y la concentración del alimento utilizado. Respecto del alimento se observa que la concentración durante todo el ensayo se mantuvo constante con pequeñas desviaciones en momentos puntuales. Los valores promedio durante el ensayo fueron $56,0 \pm 4,2$ mg N/L para el amonio y $6,2 \pm 0,9$ mg P/L para el fosfato. De estos valores resulta una relación N:P de 9,1, que se mantiene alrededor del ratio adecuado reportado por la bibliografía (Woertz *et al.*, 2009).

En los fotobioreactores la concentración de amonio siguió la misma tendencia en ambas etapas. Al inicio los valores fueron más elevados y a medida que avanzó el tiempo de experimentación fueron disminuyendo, lo que indica un aumento de la eliminación de este nutriente en el sistema. Las concentraciones promedio se muestran en la tabla 8, y se observa que los valores fueron prácticamente equivalentes en ambas etapas. Las diferencias entre los reactores no son suficientemente significativas para poder afirmar que uno de los FBR funcionó mejor que el otro.

Respecto a las concentraciones de fosfato se observó que la evolución general fue similar a la que presentaba el amonio: al inicio de ambas etapas las concentraciones eran altas pero iban disminuyendo a medida que aumentaba el tiempo de experimentación. No obstante, en este

caso la variabilidad fue notablemente mayor, lo que aumenta la desviación de los resultados promedio especialmente en la segunda etapa. Dichos resultados se muestran en la tabla 9, y en ellos se observa que hay una considerable diferencia entre las dos etapas. En la primera etapa del ensayo los resultados fueron mayores, lo que implica que tras la resiembra la eliminación de fósforo del sistema funcionó mejor. En este caso, las diferencias entre los FBR son mayores que en los resultados del amonio pero de diferente tendencia entre ambas etapas, es decir, en la primera etapa el FBR-1 consiguió una mayor eliminación de fosfato mientras que en la segunda etapa fue el FBR-2 el que contenía una menor concentración del nutriente, lo que implica una mayor eliminación.

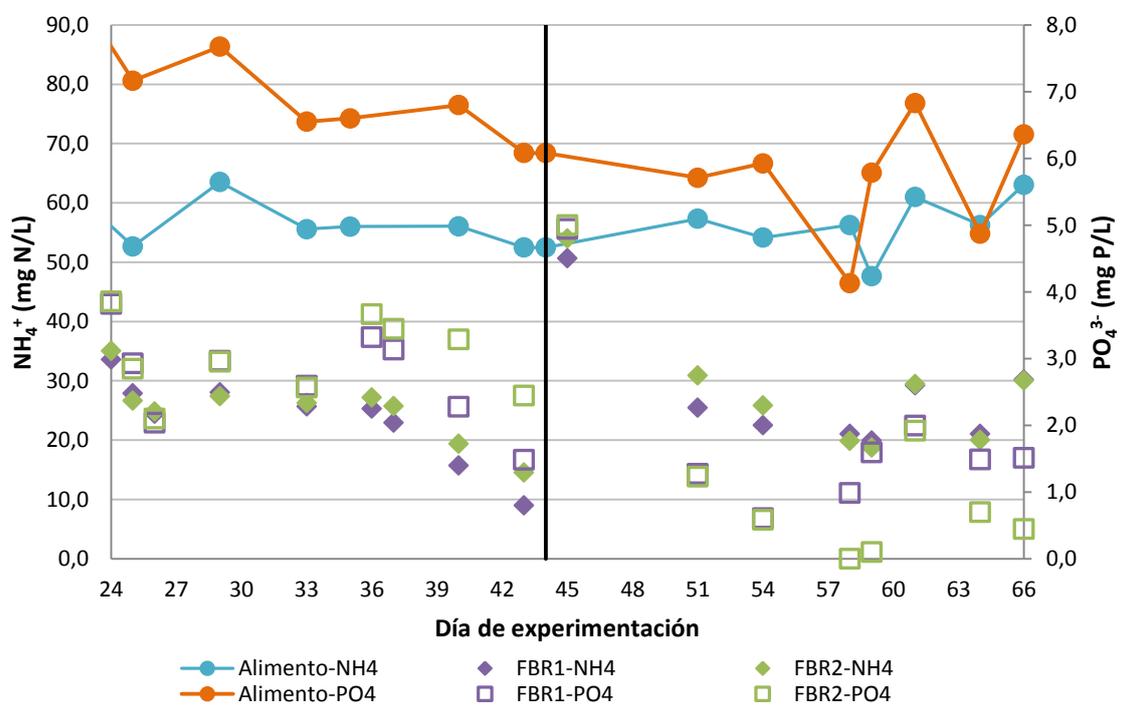


Figura 27. Evolución de la concentración de nutrientes en los FBR en el Ensayo 2

Tabla 8. Concentraciones promedio de amonio en el Ensayo 2

| | NH_4^+ (mg N/L) | | | |
|-------|-------------------|-----|----------|------|
| | Etapa 1 | | Etapa 2 | |
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 23,6 | 6,8 | 25,4 | 10,6 |
| FBR-2 | 25,2 | 5,4 | 27,0 | 11,0 |

Tabla 9. Concentraciones promedio de fosfato en el Ensayo 2

| | PO ₄ ³⁻ (mg P/L) | | | |
|-------|--|-----|----------|-----|
| | Etapa 1 | | Etapa 2 | |
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 2,7 | 0,7 | 1,8 | 1,2 |
| FBR-2 | 3,0 | 0,6 | 1,4 | 1,5 |

En las figuras 28 y 29 se presentan los rendimientos de eliminación para ambos nutrientes. Durante la primera etapa, los valores de los rendimientos de eliminación de amonio experimentaron menos oscilaciones que durante la segunda etapa. Los valores promedio para ambas etapas y las desviaciones se muestran en la tabla 10, y en ella se observa que las diferencias entre ambos reactores no fueron significativas en ninguno de los dos períodos del ensayo. No obstante, en la segunda etapa el valor promedio del rendimiento de eliminación de amonio fue en torno a un 25% mayor que en la primera etapa.

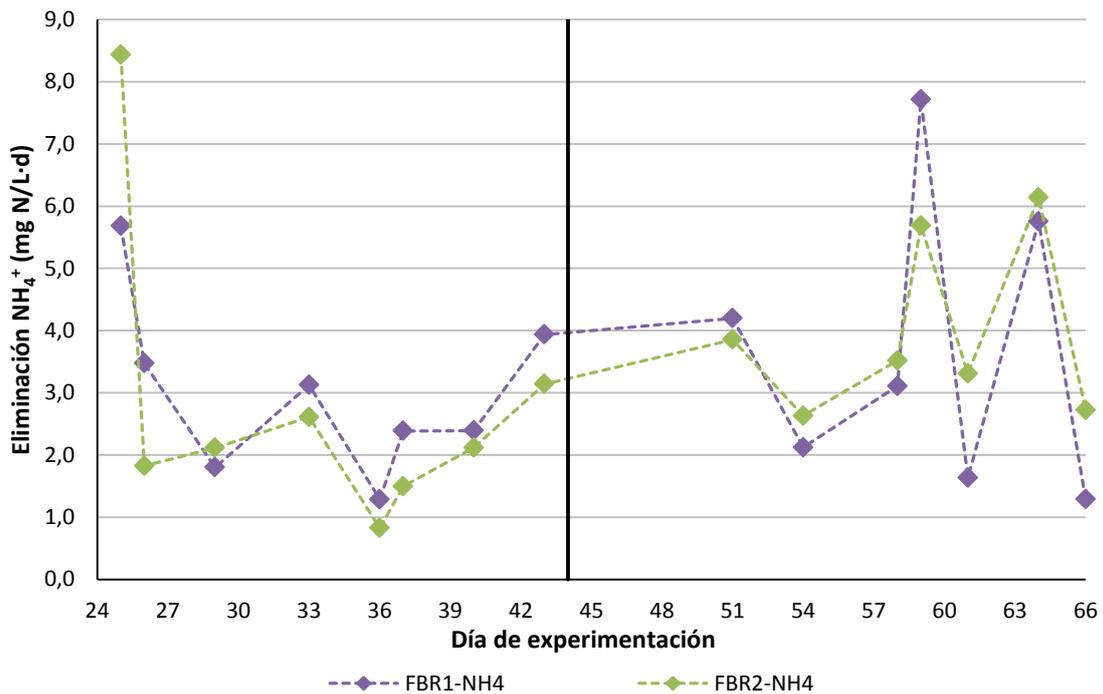


Figura 28. Rendimientos de eliminación de amonio en el Ensayo 2

Tabla 10. Rendimientos de eliminación de amonio en el Ensayo 2

| | Rendimiento de eliminación de NH_4^+ (mg N/L·d) | | | |
|-------|--|-----|----------|-----|
| | Etapa 1 | | Etapa 2 | |
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 3,0 | 1,3 | 3,7 | 2,0 |
| FBR-2 | 2,8 | 2,2 | 3,9 | 1,2 |

En cuanto a los rendimientos de eliminación de fósforo, en la figura 29 se observa que durante la primera etapa ambos reactores siguieron prácticamente la misma tendencia con valores casi idénticos (tabla 11). Al inicio de la segunda etapa ambos reactores evolucionaron prácticamente igual, pero a partir del día 55, aproximadamente, se observó una separación entre las series de valores. Los dos FBR siguieron la misma tendencia pero el FBR-2 reportó una mayor eliminación que el FBR-1. Los promedios de la segunda etapa muestran que las diferencias en este caso sí son significativas, por lo que puede asignarse un mejor funcionamiento al reactor FBR-2 (sistema de aireación mediante conducción perforada) en lo que concierne a la eliminación de fósforo.

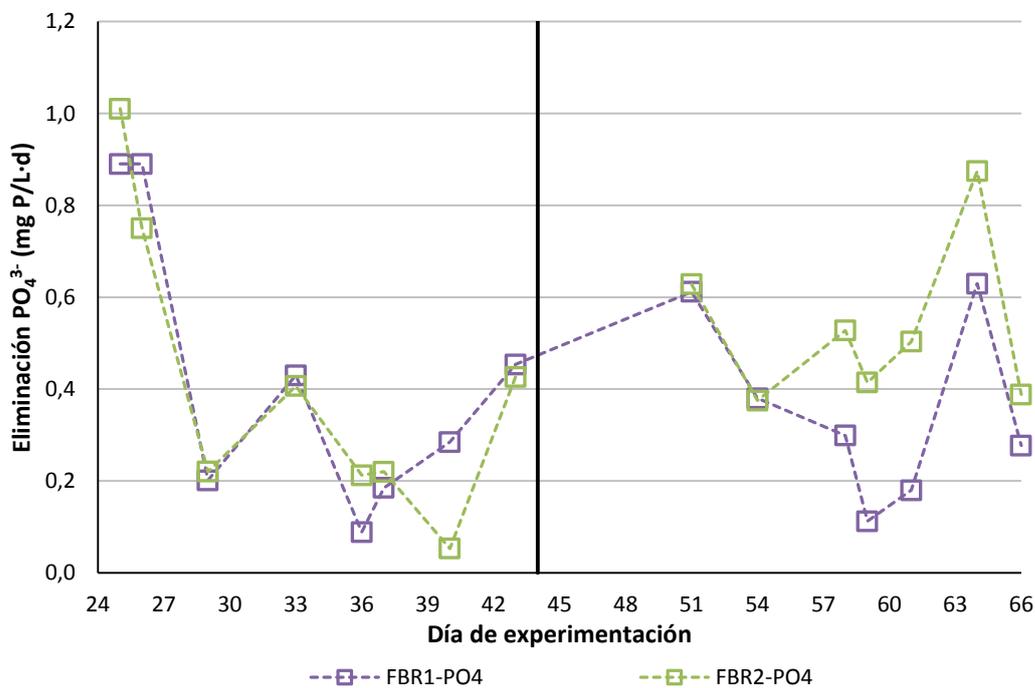


Figura 29. Rendimientos de eliminación de fosfato en el Ensayo 2

Tabla 11. Rendimientos de eliminación de fosfato en el Ensayo 2

| | Rendimiento de eliminación de PO_4^{3-} (mg P/L-d) | | | |
|-------|---|-----|----------|-----|
| | Etapa 1 | | Etapa 2 | |
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,2 |
| FBR-2 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,1 |

Las mediciones de concentración de sólidos suspendidos se realizaron en este ensayo a partir de la calibración de los datos de densidad óptica a 680 nm, utilizando el dispositivo Aquapen. En la figura 30 se muestra la representación gráfica de estas mediciones, y en la tabla 12 los valores promedio de cada etapa.

Durante la primera etapa los valores de sólidos fueron bastante variables, siendo el FBR-2 el que dispuso de una mayor concentración en la parte final del ensayo. Según los valores de la tabla 12 las diferencias podrían ser significativas, aunque hay que tener en cuenta la alta desviación que poseen las mediciones realizadas en esta etapa. En la segunda etapa la evolución de los sólidos fue similar en ambos reactores, mostrándose en la figura 30 cómo tiene lugar el aumento de SST a medida que avanzan los días iniciales tras la resiembra, y estabilizándose los valores a partir del día 57, aproximadamente. En esta etapa, sí puede afirmarse que la concentración de sólidos fue equivalente en ambos fotobioreactores.

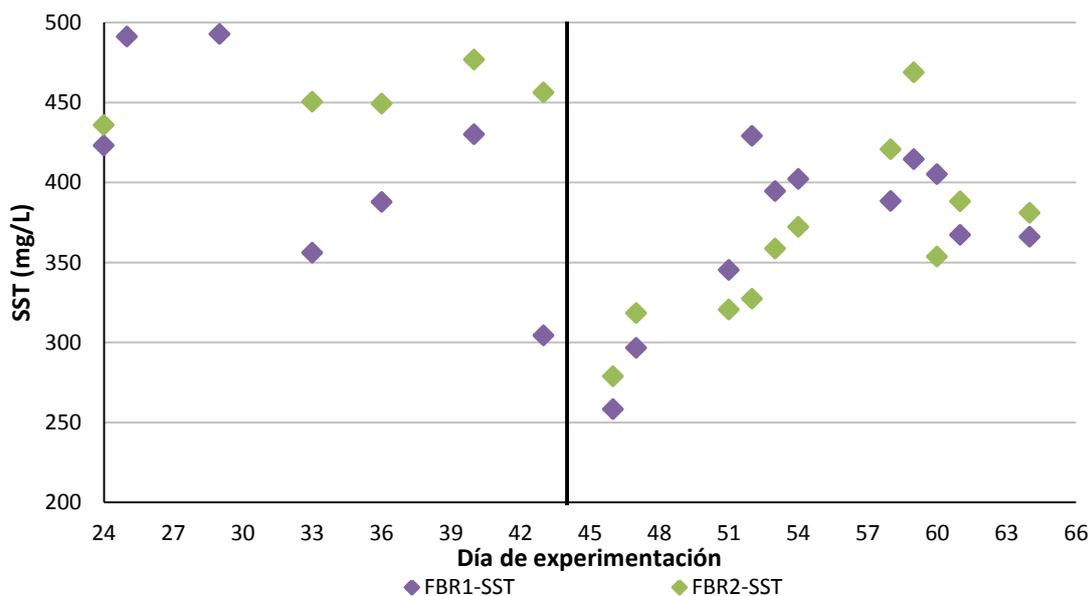


Figura 30. Evolución de la concentración de sólidos suspendidos en los FBR durante el Ensayo 2

Tabla 12. Concentración promedio de sólidos en suspensión en el Ensayo 2

| | Sólidos Suspendidos Totales (mg/L) | | | |
|--------------|------------------------------------|------|----------|------|
| | Etapa 1 | | Etapa 2 | |
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 430,8 | 77,5 | 364,3 | 50,9 |
| FBR-2 | 484,7 | 44,6 | 370,3 | 54,7 |

Como se ha comentado anteriormente, la primera etapa del ensayo se dio por finalizada el día 42, y el motivo fue un aumento repentino de materia orgánica suspendida que tuvo lugar durante los días 41 y 42 en el FBR-1. Este aumento provocó un importante ensuciamiento de las paredes de los fotobioreactores y la aparición de gran cantidad de flóculos en suspensión. En la figura 31 se muestran imágenes tomadas antes de proceder a la limpieza y posterior resiembra, donde se muestra el estado en que se encontraba el FBR-1. Los cambios descritos fueron debidos probablemente a una contaminación por cianobacterias en el reactor. Este hecho podría afectar directamente a los rendimientos de eliminación calculados en esta primera etapa. Según lo comentado, la eliminación era prácticamente la misma, pero en el FBR-1 la concentración de sólidos fue menor por lo que posiblemente las nuevas especies contaminantes estuvieran contribuyendo a la eliminación de nutrientes.

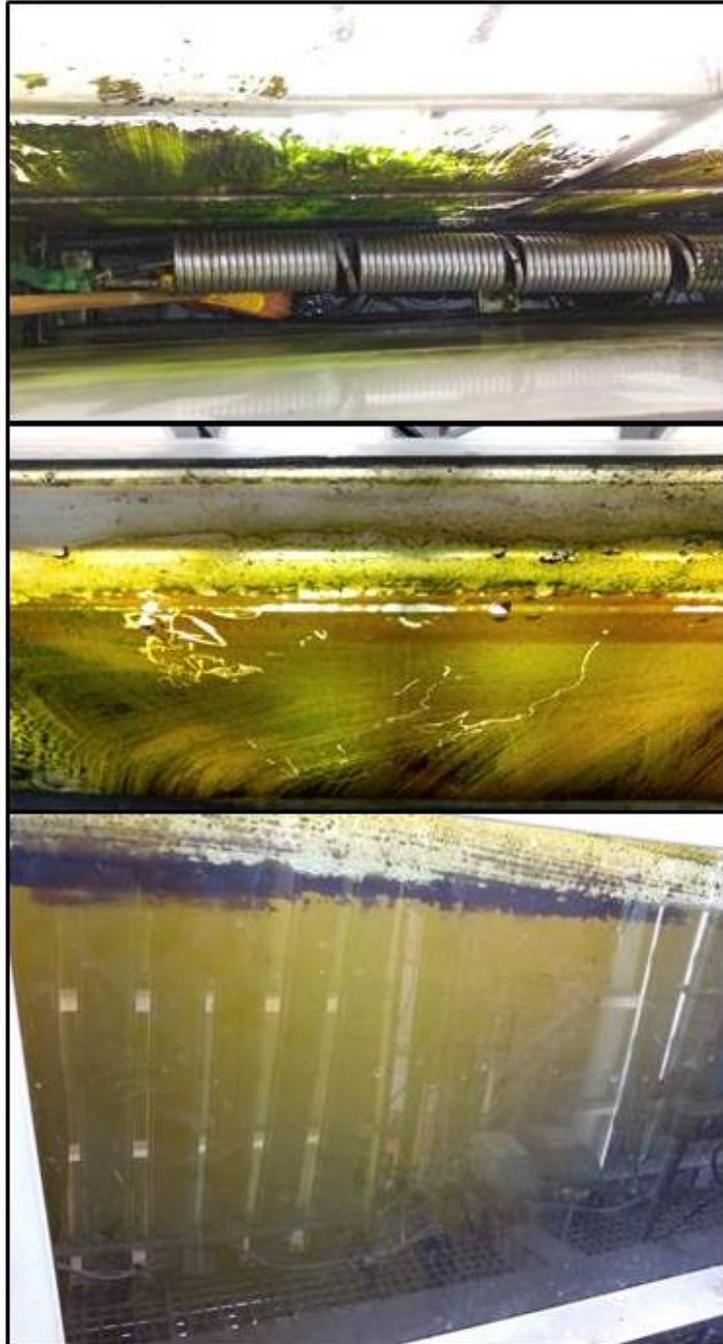


Figura 31. Estado final del FBR-1 al final de la primera etapa del Ensayo 2

El desarrollo de esta nueva población externa no deseada podría haber estado favorecido por la falta de agitación que proporcionaba el nuevo dispositivo. Una parte del cultivo decantaba y quedaba depositado en el fondo donde no llegaban las corrientes de mezcla proporcionadas por el sistema de aireación, formando acumulaciones de biomasa con déficits de alimento y oxígeno que favorecerían la muerte de las microalgas.

Al final de la segunda etapa del Ensayo 2, el cultivo del FBR-1 no se encontraba en tan mal estado como en la primera, pero se decidió examinar una muestra al microscopio para poder realizar una observación poblacional cualitativa y comparar el resultado con el FBR-2. En las figuras 32 y 33 se muestran las imágenes obtenidas en el microscopio óptico. Se observa que el estado de ambos reactores es similar, con una gran concentración de organismos filamentosos (cianobacterias) y poca presencia de microalgas. Estas imágenes demuestran que aunque externamente no parezca que el cultivo se encuentra en mal estado, la población de microalgas puede estar contaminada con otras especies. Esta contaminación es uno de los principales problemas de este tipo de cultivos al aire libre.

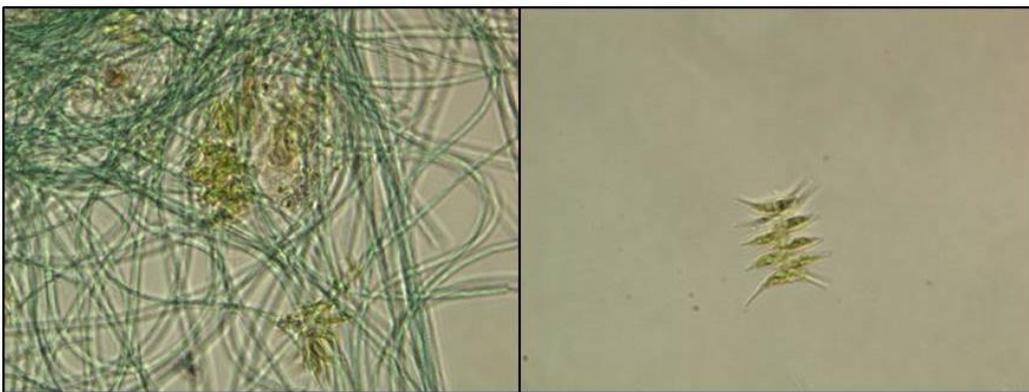


Figura 32. Visualización del cultivo del FBR-1 en el microscopio óptico (día 66 de experimentación)

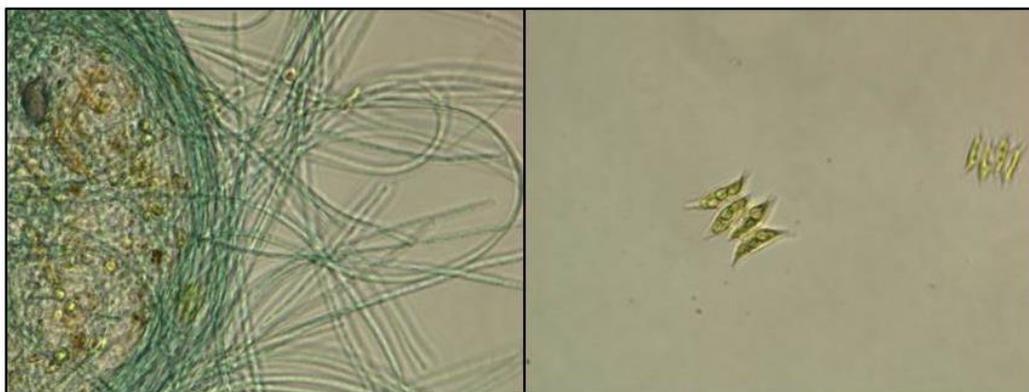


Figura 33. Visualización del cultivo del FBR-2 en el microscopio óptico (día 66 de experimentación)

Tras estas observaciones y los problemas acontecidos en la primera etapa del ensayo, se decidió realizar recuentos periódicos de las especies presentes en los cultivos para controlar de este modo la evolución del sistema a nivel microscópico y de un modo cuantitativo. Los datos referentes a la segunda etapa del Ensayo 2 se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Valores del recuento de especies durante la segunda etapa del Ensayo 2

| | Eucariotas Totales (cel/L) | % Scenedesmus |
|--|----------------------------|---------------|
| Muestra del día 51 de experimentación | | |
| FBR-1 | 7,38 E+09 | 27,0 % |
| FBR-2 | 1,45 E+10 | 62,1 % |
| Muestra del día 54 de experimentación | | |
| FBR-1 | 4,23 E+09 | 21,4 % |
| FBR-2 | 9,83 E+08 | 92,8 % |
| Muestra del día 59 de experimentación | | |
| FBR-1 | 1,63 E+09 | 78,6 % |
| FBR-2 | 1,09 E+09 | 95,3 % |

Los resultados de los tres recuentos realizados en dicho período muestran que la cantidad de biomasa fue aproximadamente la misma en ambos reactores. La diferencia radica en el porcentaje de microalgas *Scenedesmus*, que resultó ser notablemente mayor en el FBR-2 que en el FBR-1. Esto indica que de la cantidad de células existentes en el cultivo del FBR-1, la mayor parte no eran *Scenedesmus* tal y como se hubiera esperado. Los comentarios del personal que realizó el recuento fueron que en la observación visual la concentración de cianobacterias filamentosas era considerablemente alta.

Algunos autores han comprobado que la reducción del tamaño de burbuja puede incrementar el ratio de crecimiento de las cianobacterias hasta el doble en las condiciones apropiadas (Kin *et al*, 2014). Otros autores afirman también que en medios donde coexisten cianobacterias y algas verdes, éstas últimas son más sensibles a posibles cambios o condiciones que afecten negativamente al desarrollo de las poblaciones (Lürling y Roessink, 2006).

Por esta razón puede plantearse la hipótesis de que la reducción del tamaño de burbuja en la aireación del FBR-1 favoreció el crecimiento de las cianobacterias, y junto a algún factor externo no identificado que afectaba negativamente a las microalgas que potenció a las cianobacterias frente a las algas verdes.

De acuerdo con estos resultados puede afirmarse que el nuevo sistema de aireación instalado con un menor tamaño de burbuja no es adecuado en el sistema estudiado, ya que favorece el crecimiento de especies diferentes en detrimento de la población de microalgas.

4.4 Ensayo 3: Influencia de la variación de temperatura sobre el crecimiento de las microalgas

Este ensayo tenía la finalidad de estudiar el efecto de la variación de temperatura sobre el cultivo de microalgas. Por tanto, durante la experimentación se mantuvo activada la regulación de temperatura en el FBR-1 (unidad de control) mientras que en el FBR-2 la temperatura permaneció libre.

Respecto al resto de condiciones de operación, se mantuvo activo el control de pH. Ambos reactores disponían del mismo sistema de aireación y el número de luces encendidas también fue equivalente. Las alimentaciones y purgas se realizaron de modo que se mantuvieran en torno a 8 días los valores de TRC.

Como paso previo al inicio del ensayo se vació uno de los FBR procedentes del ensayo anterior y se sembró de nuevo con la mitad de volumen del FBR de control, completando el volumen restante con alimento. Se recirculó el contenido de los reactores entre ellos durante un día para asegurar la homogeneidad del cultivo de partida.

El inicio del Ensayo 3 tuvo lugar el día 67 de experimentación, con una duración total de 27 días.

4.4.1 Resultados y discusión del Ensayo 3

La evolución y resumen de las condiciones de operación establecidas se muestra en la figura 34. El TRC se mantuvo ligeramente por encima de 8 días, manteniendo el mismo sistema de alimentación y purga que en los ensayos anteriores. El control del crecimiento de las bacterias nitrificantes con adición de alitiourea funcionó correctamente, por lo que la concentración máxima de nitrato detectada fue de 1,1 ppm. La concentración de nitritos se mantuvo en 0 ppm durante todo el ensayo.

Los valores de pH fueron variables en algunos momentos del ensayo, siendo los promedios de $7,47 \pm 0,07$ y $7,01 \pm 0,21$ para el FBR-1 y FBR-2, respectivamente.

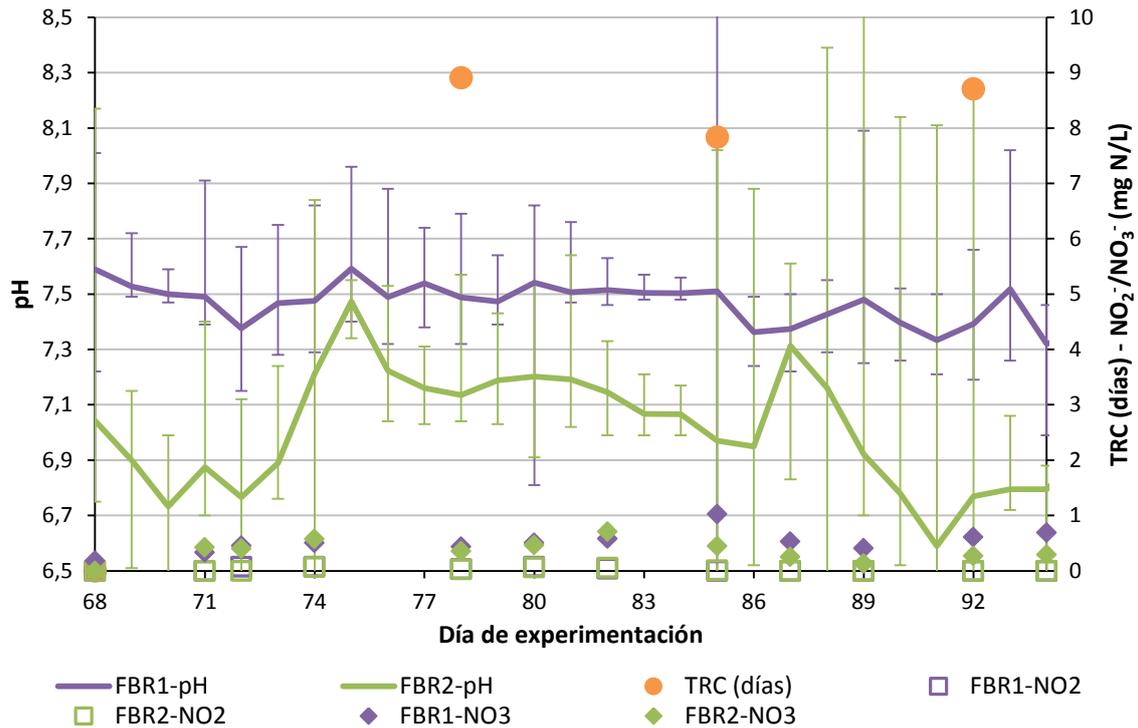


Figura 34. Parámetros de operación controlados durante el Ensayo 3

La temperatura es el parámetro operacional a estudiar en dicho ensayo, únicamente se encontraba controlada en el FBR-1. El valor promedio en el FBR-1 fue de $24,3 \pm 0,6$ °C mientras que en el FBR-2 fue de $27,6 \pm 2,8$ °C. Cabe destacar que las variaciones del reactor con temperatura libre (FBR-2) tuvieron en promedio prácticamente el doble de magnitud que con temperatura controlada (FBR-1), aun así representaron la mitad de las sufridas por la temperatura ambiente (desviación típica de la temperatura ambiente de $5,1$ °C). La figura 35 muestra cómo el FBR-2 sigue una tendencia similar a la temperatura ambiente pero con las oscilaciones más amortiguadas, y en el FBR-1 la temperatura se mantiene prácticamente constante.

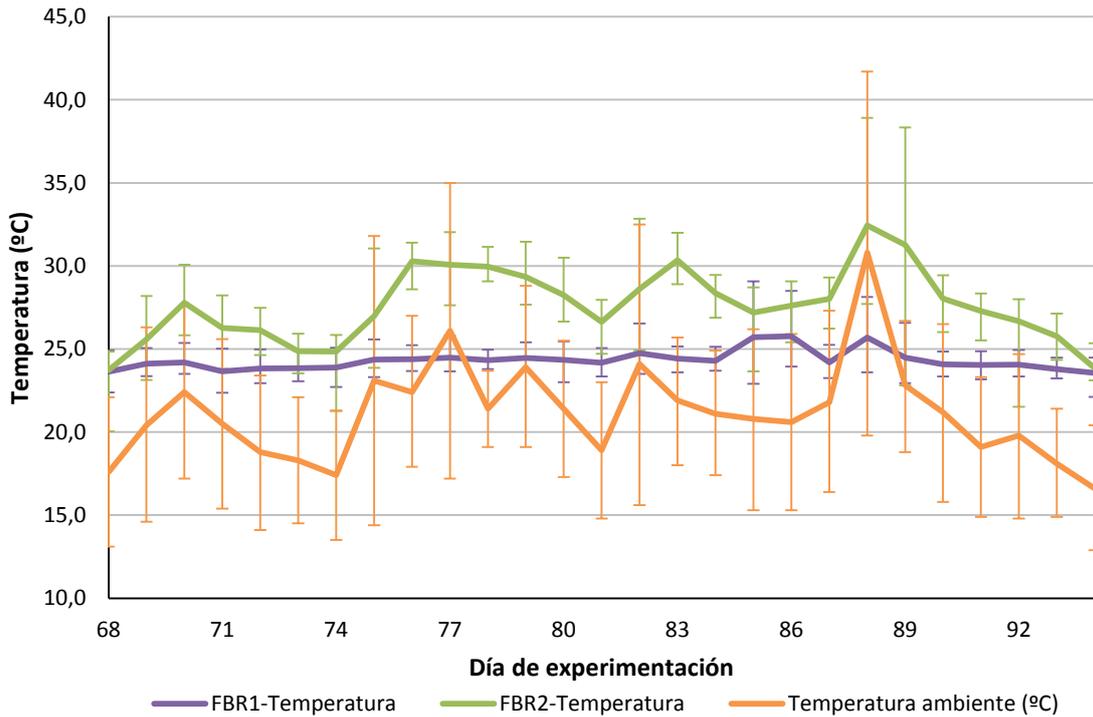


Figura 35. Evolución de temperaturas durante el Ensayo 3

Siguiendo el mismo razonamiento que en los ensayos anteriores la concentración de nutrientes en el medio se representa en la figura 36. Los valores promedio calculados para este ensayo se recogen en la tabla 14, y de ellos se extrae que no aparecieron diferencias de funcionamiento entre ambos reactores.

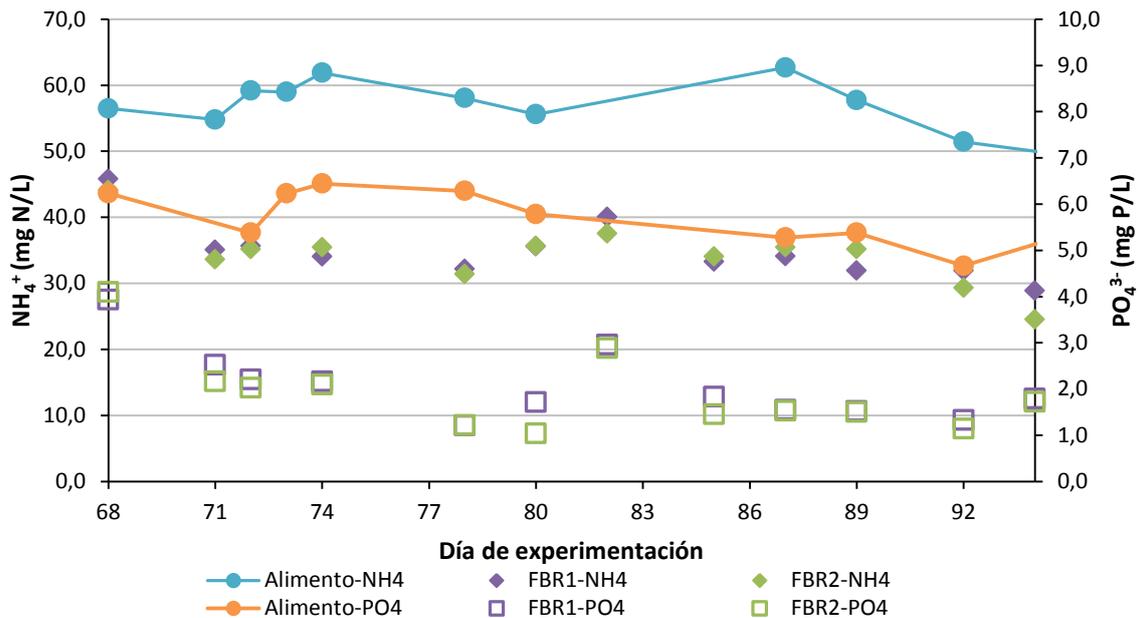


Figura 36. Concentración de nutrientes en el Ensayo 3

Tabla 14. Concentración promedio de nutrientes en el Ensayo 3

| | Ensayo 3 | | | |
|-------|---------------------------------------|-----|--|-----|
| | NH ₄ ⁺ (mg N/L) | | PO ₄ ³⁻ (mg P/L) | |
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 35,4 | 4,2 | 2,1 | 0,7 |
| FBR-2 | 35,2 | 3,5 | 1,9 | 0,9 |

Los resultados de los rendimientos de eliminación se muestran en las figuras 37 y 38 y en tabla 15. En los dos casos se observaron las variaciones típicas provocadas por las oscilaciones en la calidad del alimento. Sin embargo las diferencias globales entre ambos reactores tampoco fueron significativas tal y como muestran los valores promedio. En ellos se observa que los rendimientos de eliminación fueron prácticamente equivalentes en ambos reactores para los dos nutrientes y las desviaciones estándar fueron también equiparables. De acuerdo con lo desarrollado se puede establecer que no aparece ninguna diferencia entre los FBR en cuanto a rendimientos de eliminación tanto de amonio como de fosfato.

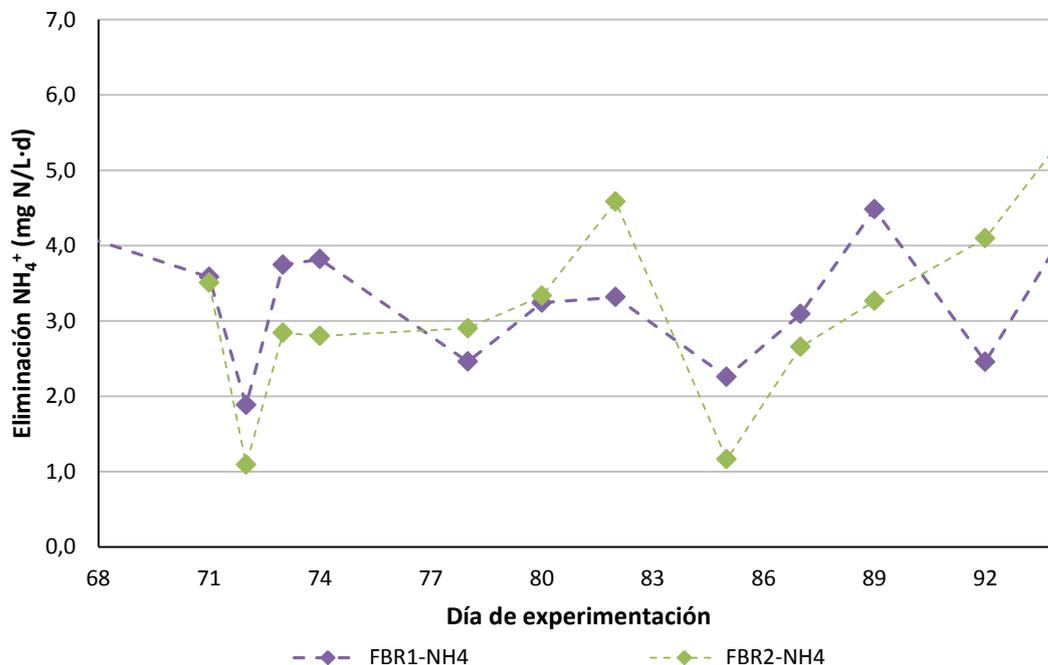


Figura 37. Rendimientos de eliminación de amonio durante el Ensayo 3

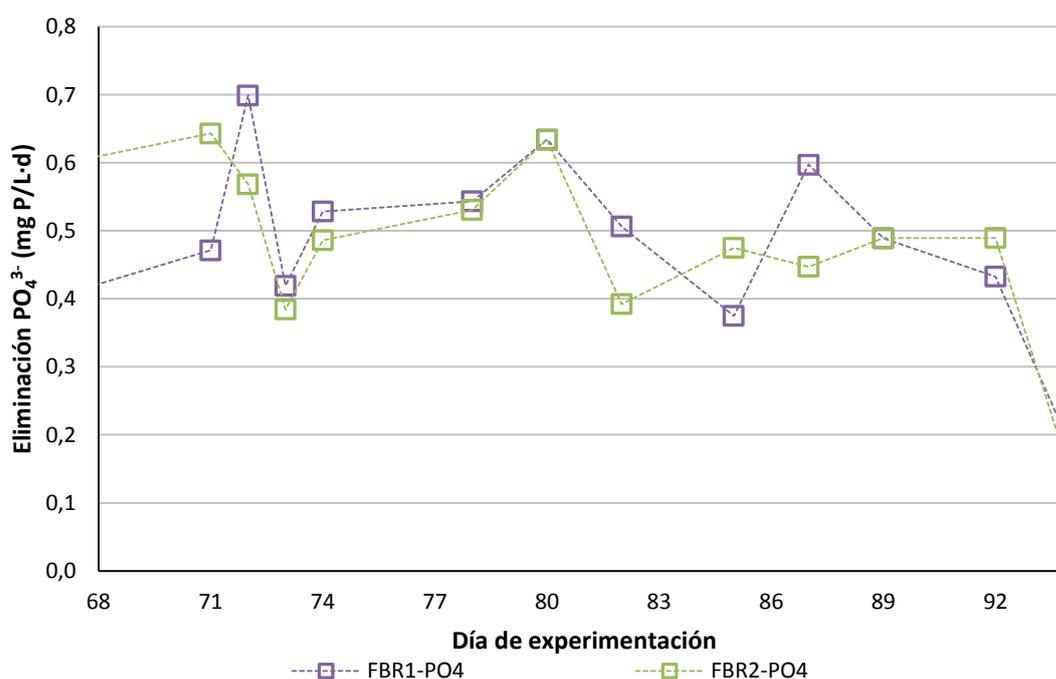


Figura 38. Rendimientos de eliminación de fósforo durante el Ensayo 3

Tabla 15. Rendimientos de eliminación en el Ensayo 3

| | Eliminación NH_4^+ (mg N/L-d) | | Eliminación PO_4^{3-} (mg P/L-d) | |
|--------------|--|-----|---|-----|
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 3,1 | 0,8 | 0,5 | 0,1 |
| FBR-2 | 3,2 | 1,2 | 0,5 | 0,1 |

Durante este ensayo las mediciones de concentración de sólidos mediante los procedimientos de *Standard Methods* (APHA-AWWA, 2005) fueron más frecuentes y se complementaron a su vez con las medidas de densidad óptica que ya se estaban realizando. Para la discusión de los resultados se utilizaron estas mediciones por su mayor fiabilidad en los resultados. No obstante se comprobó también que los valores promedio de ambos métodos no presentaban diferencias considerables por lo que se asume que las mediciones por densidad óptica son también un método adecuado.

En la figura 39 se observa poca variación de las concentraciones de sólidos durante el período de experimentación, y como en los ensayos anteriores, las diferencias entre ambos reactores son prácticamente inexistentes. Los valores medios están indicados en la tabla 16, y corresponden tanto a las mediciones realizadas con Aquapen como con el método tradicional. Debe tenerse en cuenta que la desviación estándar que muestra el conjunto de datos está en

todos los casos (en el FBR-2 se supera ligeramente) dentro del margen de incertidumbre de la medida (± 50 mg SST/L) indicada en el *Standard Methods* (APHA-AWWA, 2005).

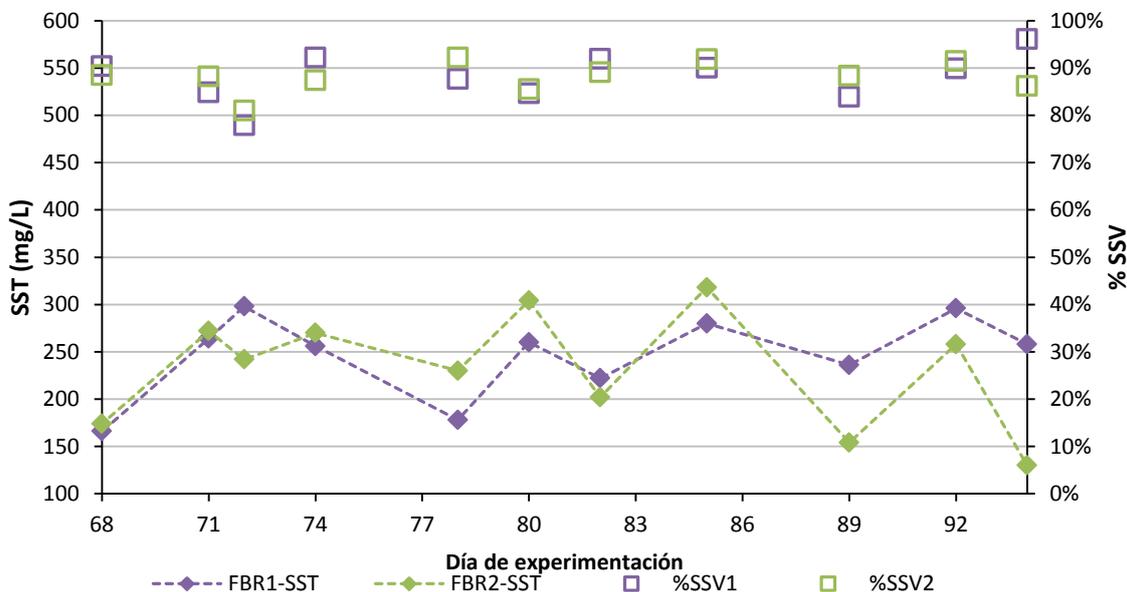


Figura 39. Concentración de sólidos suspendidos y porcentaje de volátiles en el Ensayo 3

Tabla 16. Concentración promedio de sólidos en suspensión en el Ensayo 3

| | SST (mg/L) | SD | Aquapen (mg/L) | SD | %SSV | SD |
|-------|------------|------|----------------|------|------|-----|
| FBR-1 | 246,7 | 41,4 | 241,5 | 22,3 | 85,7 | 8,1 |
| FBR-2 | 232,2 | 58,1 | 236,6 | 25,9 | 88,2 | 3,1 |

La medición de sólidos suspendidos volátiles puede asimilarse a la cantidad de biomasa presente en el cultivo. Los resultados muestran que durante toda la experimentación esta cantidad se mantuvo prácticamente igual y constante en ambos reactores, suponiendo en promedio el 85,7% en el FBR-1 y 88,2% en el FBR-2. Como comprobación final del funcionamiento de los cultivos puede calcularse el rendimiento de eliminación por unidad de biomasa, asumiendo como concentración de la biomasa el valor de la concentración de SSV. Estos resultados se recogen en las figuras 40 y 41 y en la tabla 17, y demuestran numéricamente que el funcionamiento promedio en ambos reactores fue prácticamente el mismo durante el ensayo. Las únicas diferencias han venido dadas por los diferentes grados de variación, que trasladan su efecto al valor de la desviación estándar.

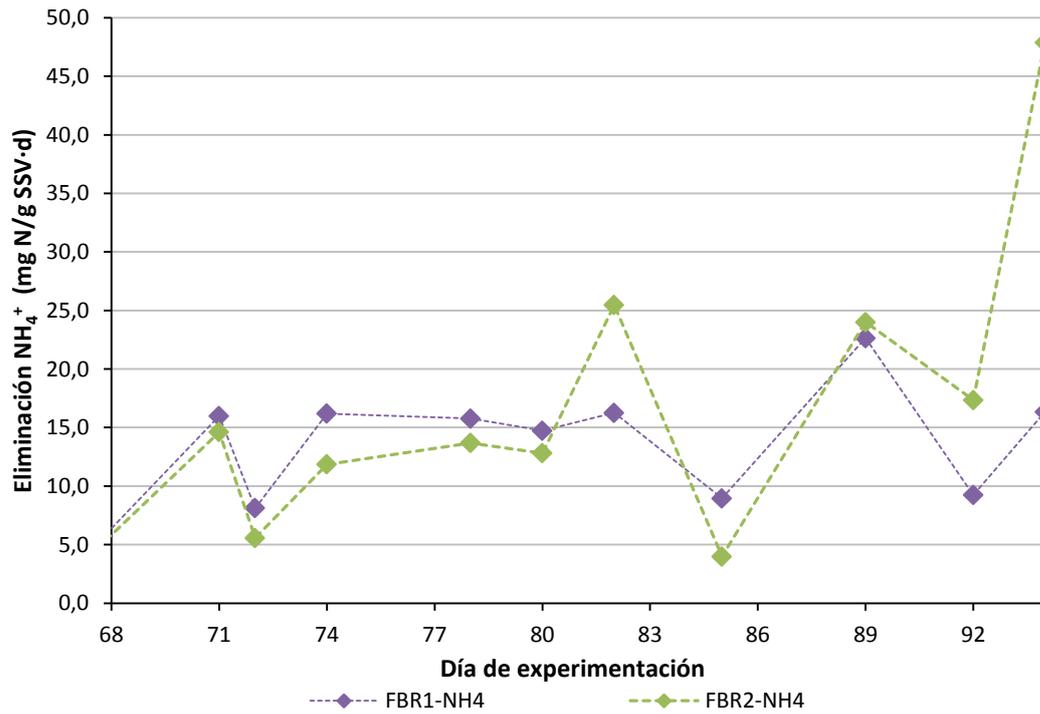


Figura 40. Eliminación de amonio por unidad de biomasa durante el Ensayo 3

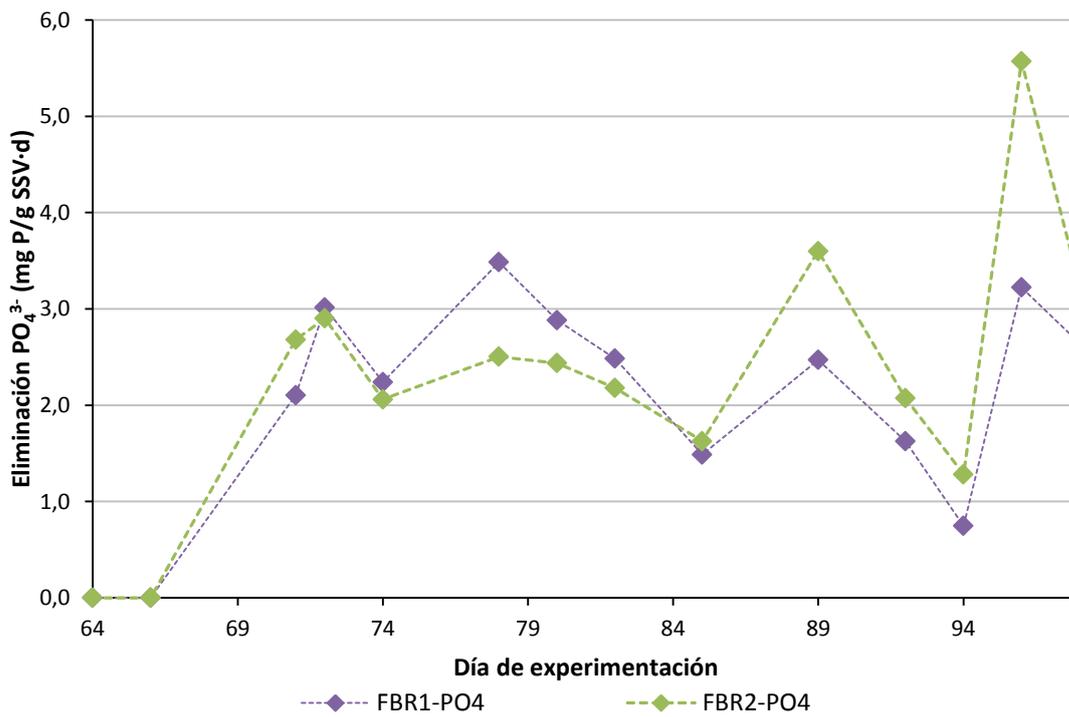


Figura 41. Eliminación de fosfato por unidad de biomasa durante el Ensayo 3

Tabla 17. Eliminación de nutrientes por unidad de biomasa durante el Ensayo 3

| | Eliminación NH ₄ ⁺ (mg N/g SSV·d) | | Eliminación PO ₄ ³⁻ (mg P/g SSV·d) | |
|-------|---|-----|--|-----|
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 15,1 | 4,9 | 2,4 | 0,9 |
| FBR-2 | 15,3 | 7,1 | 2,33 | 0,6 |

Los resultados de los recuentos de especies corroboran que el cultivo se mantuvo igual durante todo el período en cuanto a la concentración de *Scenedesmus*. Los valores promedio indican que en el Ensayo 3 el porcentaje de *Scenedesmus* respecto a las eucariotas totales se estableció en el 95,4% y el 94,0% para el FBR-1 y FBR-2, respectivamente.

De acuerdo con la discusión realizada en este apartado, los resultados han demostrado que no existe diferencia significativa en el funcionamiento de los FBR al mantenerlos con la temperatura libre. Tal y como indica la bibliografía general, la temperatura es uno de los parámetros a tener en cuenta en el crecimiento de las microalgas (Singh y Singh, 2015). No obstante, en algunos estudios realizados se afirma que el rango óptimo de crecimiento de *Scenedesmus* es relativamente más amplio que en otras especies de algas verdes. Esto implica que las diferencias en el crecimiento de cultivos que trabajen dentro de este rango no serán elevadas a pesar de estar a diferentes temperaturas (Xu *et al.*, 2012). En algunos casos, otras condiciones de operación pueden reducir la influencia de la temperatura sobre el cultivo, como es el caso de sistemas con limitación de luz y/o CO₂ (Vonshak y Torzillo, 2004).

La temperatura de trabajo en los FBR fue de 24,3 °C y 27,6 °C, por lo que teniendo en cuenta que ambos valores se encuentran dentro del rango de funcionamiento óptimo indicado por Xu *et al.* (2012) para *Scenedesmus* (14 – 30 °C), es posible justificar la poca influencia de la temperatura sobre el proceso observada en este ensayo.

4.5 Ensayo 4: Influencia de la intensidad de luz artificial sobre el crecimiento de las microalgas

El último ensayo realizado se destinó al estudio del efecto de la intensidad de luz artificial aplicada sobre los cultivos de microalgas. El FBR-1 se estableció como unidad de control y se mantuvo con todas las luces encendidas, mientras que en el FBR-2 se redujo la iluminación a la mitad.

Durante el ensayo se mantuvo activo el control de temperatura en ambos FBR, manteniendo igualmente el control de pH y el mismo sistema de aireación. Las alimentaciones y purgas

siguieron realizándose del mismo modo que en los ensayos anteriores para mantener el tiempo de retención celular en 8 días.

El experimento se inició a partir del cultivo final resultante del Ensayo 3 porque tanto las analíticas como la observación visual indicaban que se encontraba en buen estado. Del mismo modo que en los casos anteriores, se mantuvo en recirculación entre los dos FBR durante un día como paso previo al inicio de la toma de muestras.

El comienzo del Ensayo 4 fue el día 94 de experimentación y tuvo una duración total de 19 días.

4.5.1 Resultados y discusión del Ensayo 4

La figura 42 muestra la evolución de los parámetros de control establecidos. El pH promedio fue de $7,29 \pm 0,14$ y $7,14 \pm 0,19$ para los FBR-1 y FBR-2, respectivamente. La concentración de nitratos y nitritos no sobrepasó 1 ppm en ninguno de los dos reactores, y el TRC presentó valores ligeramente inferiores a 9 días pero se mantuvo constante durante todo el período de experimentación.

En lo que respecta a la temperatura cabe destacar que es el ensayo en que menos oscilaciones tuvieron lugar en los FBR, hecho favorecido por la mayor estabilidad ambiental característica de la época final de primavera (figura 43). La temperatura promedio registrada fue de $24,2 \pm 0,3$ °C y $23,7 \pm 0,3$ °C para el FBR-1 y FBR-2, respectivamente.

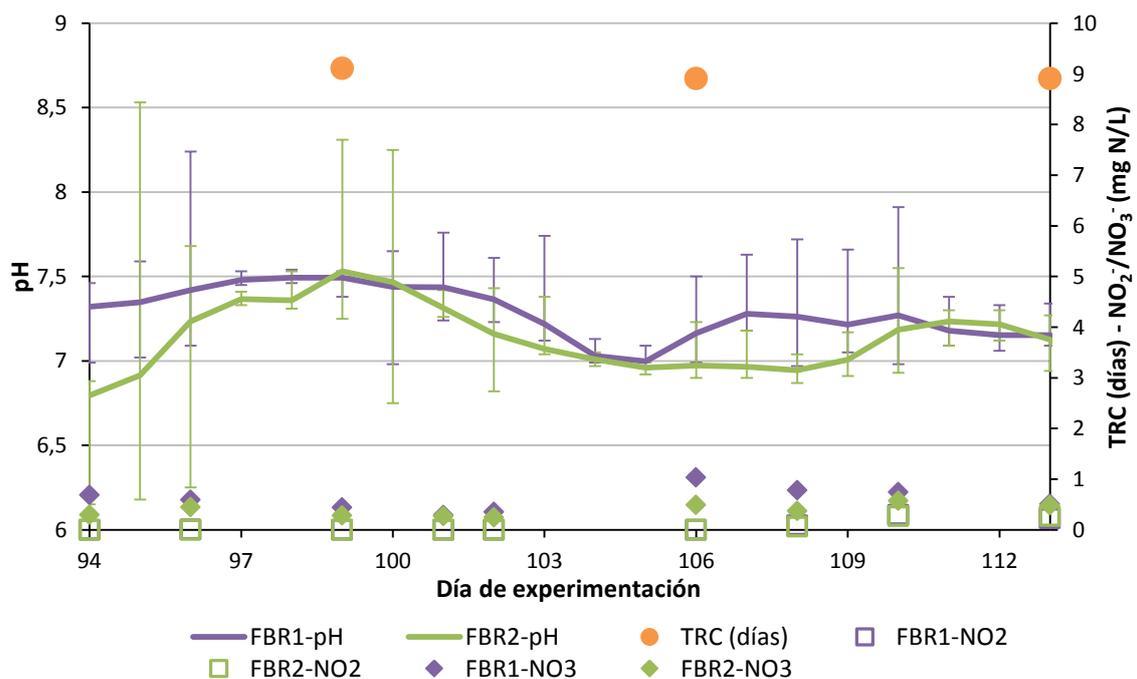


Figura 42. Parámetros de operación controlados durante el Ensayo 4

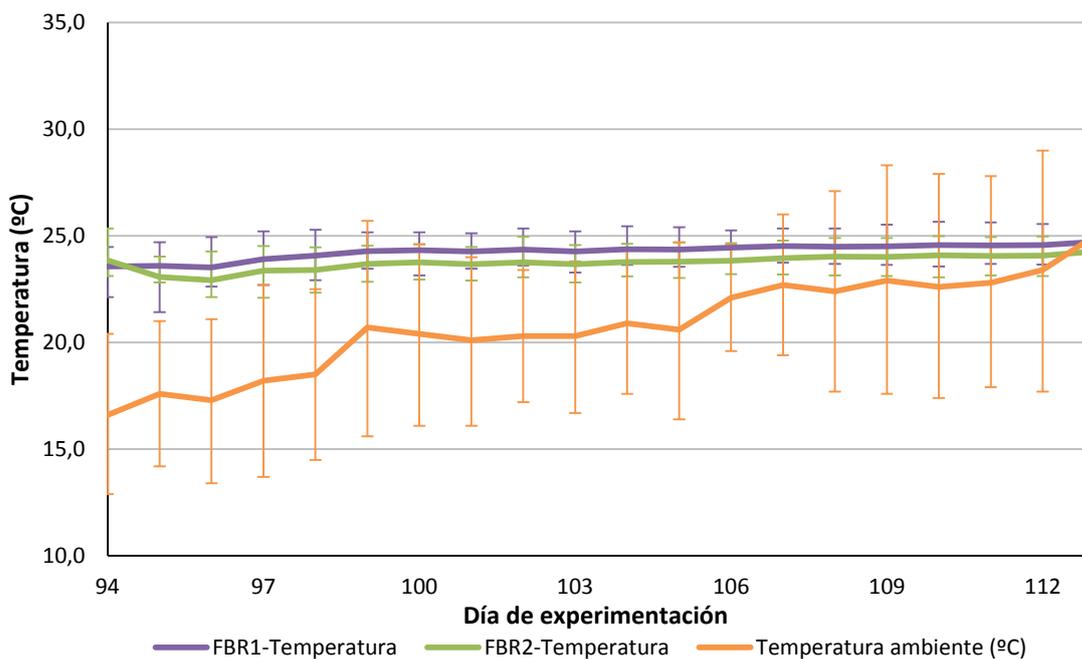


Figura 43. Evolución de la temperatura en los FBR durante el Ensayo 4

La representación gráfica de las concentraciones de nutrientes en los reactores (figura 44) y los valores promedio (tabla 18) permiten observar que hubo ciertas diferencias respecto a los experimentos anteriores. Una de estas diferencias es la estabilidad de los resultados, que siguieron tendencias claras y constantes durante toda la etapa sin las oscilaciones vistas anteriormente.

En la evolución de la concentración de amonio las diferencias no fueron especialmente significativas entre los reactores, quedando los promedios en $28,9 \pm 1,1$ mg N/L y $29,7 \pm 2,1$ mg N/L en el FBR-1 y FBR-2, respectivamente. La evolución de este nutriente se mantuvo prácticamente constante a lo largo del ensayo.

En el caso del fosfato la evolución de la concentración en los FBR se inició con valores similares en ambos reactores, aunque a los pocos días tras el inicio del experimento se observó una separación entre los reactores y se mantuvo esta diferencia constante durante el resto del experimento. Los valores promedio del ensayo fueron de $1,5 \pm 0,3$ mg P/L y $2,0 \pm 0,3$ mg P/L en el FBR-1 y FBR-2, respectivamente, lo que indica que las diferencias fueron importantes.

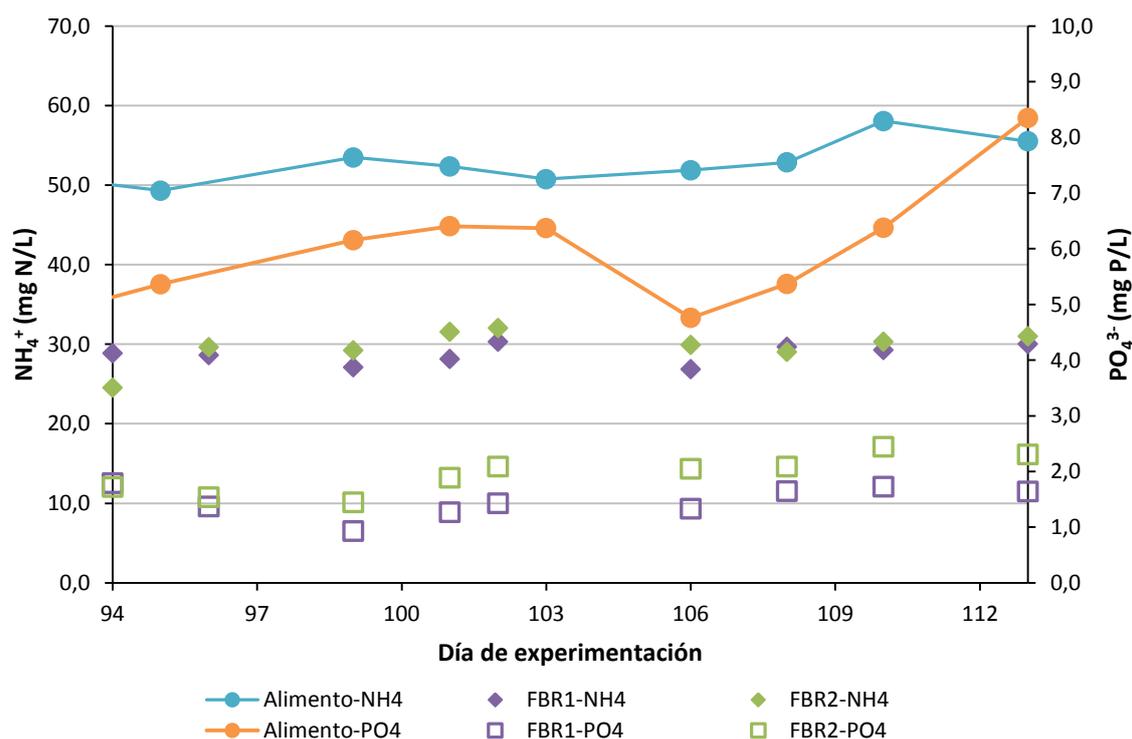


Figura 44. Concentración de nutrientes en el Ensayo 4

Tabla 18. Concentración promedio de nutrientes en el Ensayo 4

| | Ensayo 4 | | | |
|-------|---------------------------------------|-----|--|-----|
| | NH ₄ ⁺ (mg N/L) | | PO ₄ ³⁻ (mg P/L) | |
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 28,8 | 1,1 | 1,5 | 0,3 |
| FBR-2 | 29,7 | 2,1 | 2,0 | 0,3 |

La figura 45 y la tabla 19 muestran los resultados de los rendimientos de eliminación de amonio, y en ellos se observa que a pesar de las oscilaciones, los valores promedio fueron similares, por lo que no se puede asignar un mejor funcionamiento a uno de los FBR.

La figura 46 y la tabla 19 presentan los rendimientos de eliminación de fosfato y en este caso sí se observó una tendencia clara entre ambos reactores así como diferencias significativas entre ellos. La evolución en ambos FBR siguió tendencias prácticamente paralelas manteniendo la diferencia constante entre las dos series de valores. Los valores promedio corroboran esta diferencia quedando en $1,7 \pm 0,1$ mg P/L-d y $0,5 \pm 0,1$ mg P/L-d, suponiendo una disminución del rendimiento en casi un 70% al reducir la intensidad de luz aplicada.

Tabla 19. Rendimientos de eliminación en el Ensayo 4

| | Eliminación NH_4^+ (mg N/L-d) | | Eliminación PO_4^{3-} (mg P/L-d) | |
|-------|--|-----|---|-----|
| | Promedio | SD | Promedio | SD |
| FBR-1 | 2,5 | 0,5 | 1,7 | 0,1 |
| FBR-2 | 2,6 | 1,0 | 0,5 | 0,1 |

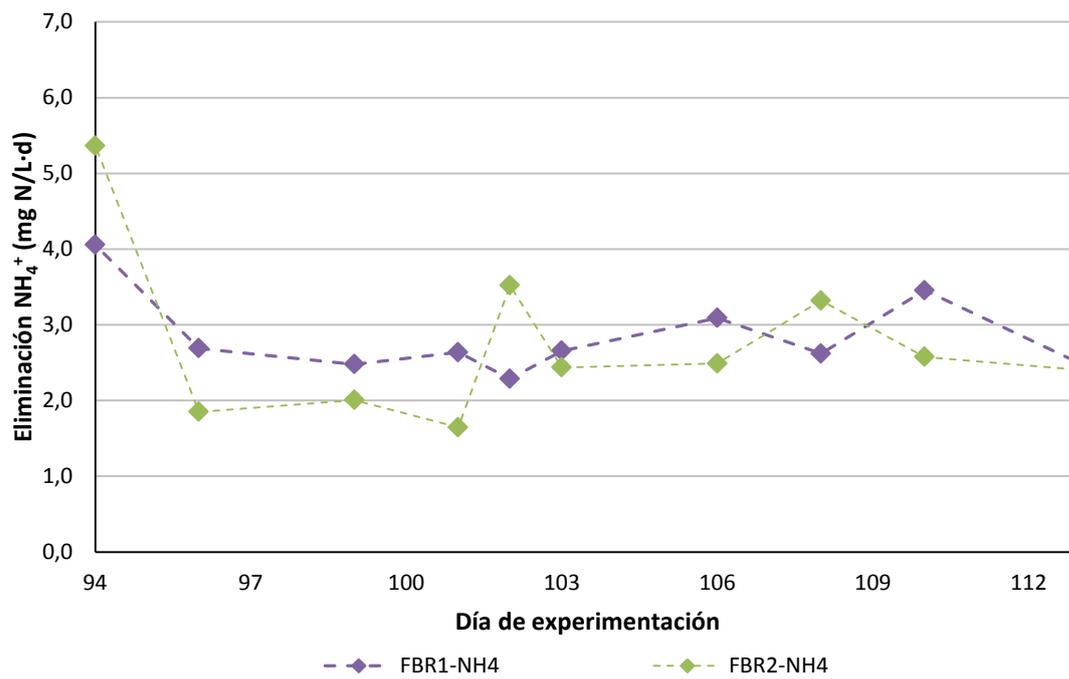


Figura 45. Rendimientos de eliminación de amonio en el Ensayo 4

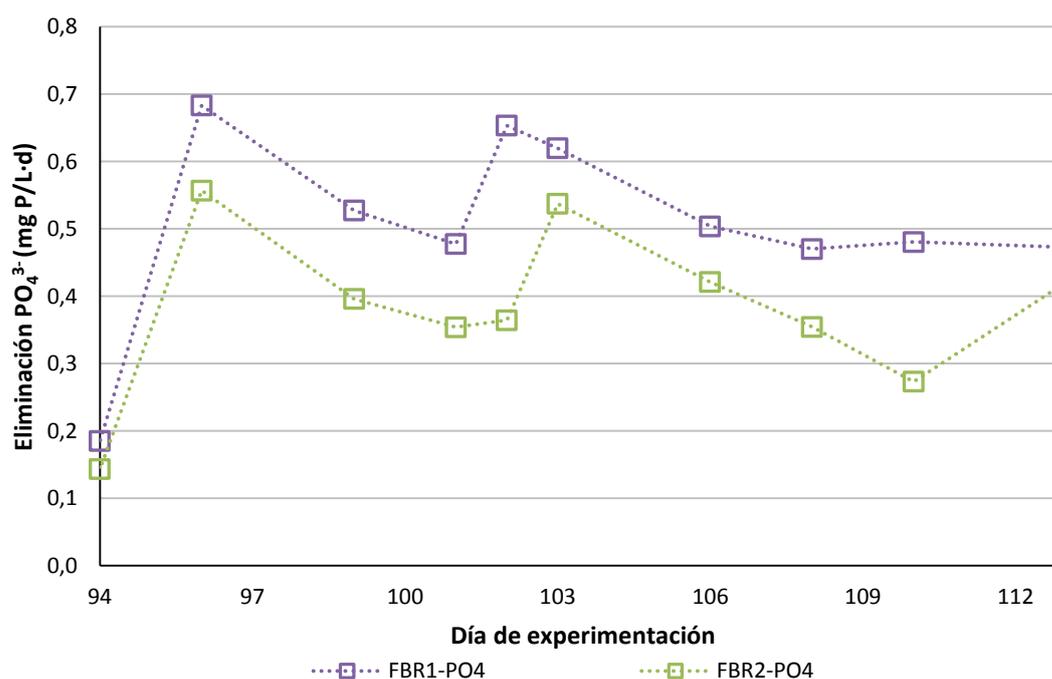


Figura 46. Rendimientos de eliminación de fosfato durante el Ensayo 4

Del mismo modo que en el Ensayo 3, durante esta última etapa también se aumentó la frecuencia de medición de concentración de sólidos suspendidos mediante la metodología de *Standard Methods* (APHA-AWWA, 2005), que se alternó con las medidas de Aquapen. La figura 47 muestra cómo durante el ensayo el cultivo experimentó las oscilaciones típicas que se han venido observando en los demás ensayos. Aun así, en el Ensayo 4 sí existió diferencia entre los fotobioreactores, siendo el FBR-1 el que consiguió mantener una mayor concentración de SST en todo momento. Los valores de porcentaje de SSV resultaron ser equivalentes para los dos reactores, lo que indica que es viable afirmar que la relación de biomasa respecto de los sólidos presentes fue similar en ambos casos.

Tabla 20. Concentración de SST y %SSV durante el Ensayo 4

| | FBR-1 | FBR-2 |
|------------|-------|-------|
| SST (mg/L) | 254,9 | 186,0 |
| SD | 14,6 | 42,6 |
| %SSV | 88,9 | 84,9 |
| SD | 3,8 | 4,4 |

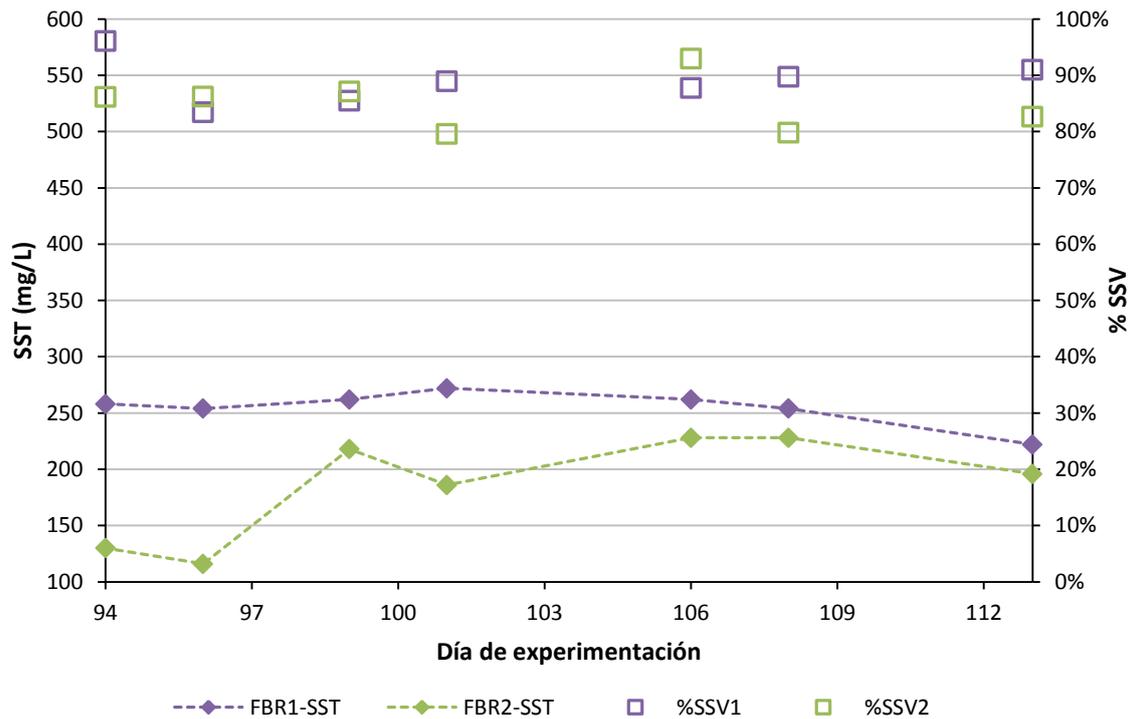


Figura 47. Concentración de SST y %SSV en los FBR durante el Ensayo 4

Los recuentos realizados en esta etapa complementan los resultados ya mostrados durante la discusión. Los resultados se recogen en la tabla 21, y en ellos se aprecia que aunque la cantidad de eucariotas se mantiene en una concentración similar en ambos reactores, el porcentaje de *Scenedesmus* aumenta en el FBR-1 y disminuye en el FBR-2. Estos datos permiten afirmar que la disminución de la intensidad de luz en el FBR-2 tuvo repercusiones negativas en el crecimiento de la población de *Scenedesmus*, con la consiguiente reducción en eliminación de nutrientes.

Tabla 21. Resultados de los recuentos poblacionales realizados durante el Ensayo 4

| | Eucariotas Totales (cel/L) | % Scenedesmus |
|---|----------------------------|---------------|
| Muestra día 95 de experimentación | | |
| FBR-1 | 4,62 E+08 | 97,5 % |
| FBR-2 | 1,05 E+08 | 92,7 % |
| Muestra día 100 de experimentación | | |
| FBR-1 | 6,38 E+08 | 98,0 % |
| FBR-2 | 2,44 E+08 | 94,4 % |
| Muestra día 106 de experimentación | | |
| FBR-1 | 6,57 E+08 | 99,4 % |
| FBR-2 | 4,28 E+08 | 85,7 % |
| Muestra día 109 de experimentación | | |
| FBR-1 | 6,34 E+08 | 99,9 % |
| FBR-2 | 4,01 E+08 | 78,6 % |

De acuerdo con los resultados presentados del Ensayo 4, se puede afirmar que el efecto de la reducción de la luz artificial aplicada sobre los FBR se traduce en una reducción del rendimiento de eliminación de los cultivos de microalgas, afectando con una mayor diferencia al consumo de fósforo.

Este hecho lleva a plantear la hipótesis de que en condiciones normales de operación en la planta piloto (todas las luces activas) los cultivos se encuentran en la fase favorable representada en el gráfico productividad-intensidad de luz (apartado 1.7.1, figura 9), y por tanto no se llega a la fotoinhibición. El encontrarse en esa fase indica que es posible que si se aumentara la intensidad lumínica podría seguir aumentando la capacidad de eliminación. Es por esta razón que la reducción de la intensidad de luz aplicada se traduce en una reducción de la actividad fotosintética del cultivo.

Los resultados obtenidos concuerdan con las hipótesis planteadas por diversos autores, en las que se afirma que la intensidad de luz aplicada sobre un cultivo de microalgas de alta densidad al aire libre influye directamente sobre su capacidad de crecimiento, más que sobre la eficacia de eliminación e incluso la variedad poblacional presente (Assemany, *et al.*, 2015). Por esta razón, la reducción de luz que reciben los microorganismos da como resultado la disminución de la concentración de biomasa en el sistema, lo que se traduce finalmente en una reducción de la eliminación de nutrientes.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos marcados al inicio del período de experimentación, tras los diferentes ensayos se comprobó la influencia de las condiciones de operación a estudiar.

En el **Ensayo 1** se pudo comprobar que los cultivos de microalgas de la planta piloto alimentados con una preparación artificial funcionaron correctamente y de una manera similar a los que se alimentaban en condiciones normales (utilizando como fuente de nutrientes el efluente de la planta SAnMBR). Las analíticas realizadas durante este ensayo fueron para determinar la concentración de nutrientes presente en el reactor, y los resultados mostraron que la evolución para ambos nutrientes fue similar en los dos fotobioreactores en los que se comparaban las dos condiciones.

En el **Ensayo 2** la concentración de amonio presente en el medio siguió la misma tendencia y en valores similares durante todo el período experimental en los dos reactores estudiados. En el caso del fosfato los resultados mostraron una mayor variabilidad en la concentración aunque las diferencias fueron ligeramente más destacadas, siendo el FBR-1 en que conseguía una mayor reducción. Los cálculos de los rendimientos de eliminación muestran que para el amonio los resultados fueron similares durante todo el ensayo, pero el FBR-1 reportó un rendimiento de eliminación de fosfato promedio un 25% superior al FBR-2 en la segunda etapa del ensayo.

La concentración de sólidos durante esta parte de experimentación no mostró diferencias entre ambos reactores. Cabe destacar que la primera etapa se dio por finalizada tras un aumento repentino de materia orgánica suspendida que apareció a lo largo de un fin de semana en el FBR-1 (tamaño de burbuja pequeño), que tuvo como consecuencia un importante ensuciamiento de los fotobioreactores y de los cultivos. Tras este episodio, se decidió finalizar la primera etapa y retomar el ensayo 2 en una segunda etapa a partir de una resiembra.

A nivel microscópico, los recuentos realizados mostraron que entre los dos reactores había claras diferencias en cuanto a la concentración de *Scenedesmus*, siendo en el FBR-1 donde se reducía la cantidad respecto del FBR-2. No obstante, la cantidad de células eucariotas totales era similar, lo que indica que se estaba produciendo un cambio poblacional en el sistema, consecuencia de la proliferación de otra especie capaz de competir contra las microalgas verdes en cuestión.

Los resultados permiten afirmar que la reducción del tamaño de burbuja en el sistema de aireación no presentó diferencias respecto al sistema tradicional en cuanto a rendimiento de eliminación de nutrientes o aumento de la capacidad de crecimiento de las microalgas. Al contrario de la mejora esperada, en el FBR con el dispositivo de burbuja fina tuvo lugar la proliferación de cianobacterias filamentosas que obligó a retirar el cultivo del fotobioreactor y sembrar para iniciar de nuevo el ensayo, por lo que constó de dos etapas.

La hipótesis que se plantea para justificar los resultados es que la reducción del tamaño favoreció el crecimiento de las cianobacterias filamentosas tal y como se indica en la bibliografía. Junto a esto, alguna pequeña modificación en las condiciones de operación podría haber afectado negativamente al crecimiento de *Scenedesmus*, más sensible a los cambios en el sistema que las cianobacterias, por lo que finalmente las cianobacterias obtendrían la ventaja competitiva sobre las algas verdes, aumentando su población en el sistema. Las pequeñas diferencias en las concentraciones de nutrientes podrían ser explicadas por este cambio en la distribución de especies en el sistema, y no atribuidas a una mejora del funcionamiento del cultivo inicial de *Scenedesmus*.

En el **Ensayo 3** las determinaciones de concentración de nutrientes revelaron que no existieron diferencias destacables entre los reactores, y por tanto tampoco en los resultados de los rendimientos de eliminación. La concentración de sólidos suspendidos totales y volátiles se mantuvo también en valores prácticamente constantes durante todo el ensayo y a la vez similares entre ambos FBR.

Los recuentos de especies presentes permitieron comprobar que se mantuvo en todo momento la alta concentración de *Scenedesmus* en ambos reactores (más del 90% de eucariotas totales), por lo que no se observaron cambios poblacionales ni desplazamientos de especies.

Dichas observaciones permiten afirmar que la variación de temperatura no tuvo efecto significativo sobre el funcionamiento de los cultivos de la planta piloto a pesar de las diferentes temperaturas de trabajo y las oscilaciones experimentadas. La justificación se puede encontrar en el hecho de que para *Scenedesmus* el rango de temperatura óptima de trabajo es amplio y las temperaturas a las que se operó se encontraban dentro de dicho rango. Teniendo en cuenta los datos de la bibliografía, *Scenedesmus* presenta su desarrollo óptimo entre 14 – 30 °C, y las temperaturas promedio de trabajo en el ensayo fueron 24 y 27 °C en FBR-1 y FBR-2 respectivamente.

Otro de los motivos podría ser la limitación de algún parámetro de operación como la luz o el dióxido de carbono. Algunos autores indican en varios estudios que un sistema en condiciones de limitación por alguno de estos dos parámetros, puede provocar que la influencia de la temperatura sobre el propio cultivo se reduzca.

En el **Ensayo 4** la reducción a la mitad de la intensidad de luz artificial que se aplicaba sobre los fotobioreactores supuso la disminución de la eliminación de nutrientes del medio, más acusada en el caso del fósforo, observada tanto en los valores de concentración en el medio como en los rendimientos de eliminación calculados. La determinación de sólidos suspendidos totales dejó ver que en el FBR-2 (reducción de luz) la concentración disminuyó, manteniéndose igual en ambos reactores el porcentaje de sólidos suspendidos volátiles. Este hecho puede asignarse a una disminución de la concentración de biomasa en el FBR-2. A su vez, los recuentos mostraron que el porcentaje de *Scenedesmus* se redujo también en el FBR-2 respecto a la cantidad de células presentes.

Todos estos efectos fueron los causantes de la reducción del rendimiento de eliminación, por lo que puede afirmarse que las condiciones normales de iluminación de los cultivos de la planta piloto se encuentran en la zona favorable de las gráficas que relacionan la intensidad de luz recibida con la actividad fotosintética. Esto implica que es probable que si se aumentara la intensidad de luz, la productividad del sistema aumentaría, siempre hasta unos valores límite, del mismo modo que la reducción supone la disminución de la actividad. Por estas mismas razones, puede plantearse que el posicionamiento en la zona creciente de los gráficos indica que no existen condiciones de fotoinhibición.

5.1 Trabajos futuros

Los ensayos realizados en el presente trabajo pueden ser rediseñados y complementados con el objetivo de obtener unos resultados más concretos y ajustados para la planta piloto de estudio en cuestión. Para ello se pueden plantear una serie de modificaciones en vista a su realización en ocasiones futuras.

Como mejora del Ensayo 2 se podría plantear la introducción de mediciones de capacidad de fijación de CO₂ en los cultivos. Este parámetro permite observar la mejora que implica en el cultivo el menor tamaño de burbuja, independientemente de la especie que prolifera. Por esta misma razón, sería importante establecer una mayor frecuencia de recuento para poder observar claramente los cambios poblacionales en los reactores, en el caso que existan.

A la vista de los resultados en el Ensayo 3, se podría plantear la repetición del mismo ensayo en las épocas del año en que las temperaturas sean más extremas, tanto en el margen superior como inferior. De este modo podría comprobarse si las condiciones más desfavorables de temperatura a las que está sometida la planta piloto durante el año afectan directamente al cultivo, o de lo contrario dichas temperaturas se encuentran dentro del rango de funcionamiento óptimo y no tienen influencias negativas sobre las microalgas.

La continuación del Ensayo 4 para estudiar el efecto de la aplicación de luz artificial podría ser la programación de ciclos temporales de iluminación, con todas las luces activas en el ciclo período de encendido. De este modo podría comprobarse cuál sería la relación horaria más eficiente, pudiendo reducir horas de encendido suponiendo una reducción de los costes de operación de la planta piloto.

De acuerdo con la temática del estudio de condiciones de operación que conduce este trabajo, podría plantearse la realización de nuevos ensayos en los que se compruebe la influencia que podrían tener otros parámetros. Podría plantearse el estudio de la influencia de la recirculación de los cultivos, concretamente las consecuencias negativas de las fuerzas de estrés causadas por el bombeo del cultivo.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., & Ibraheem, I. (2012). Microalgae and Wastewater Treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 257-275.
- APHA-AWWA. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 21th Ed.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Alvarez-Diaz, P., Garrido-Perez, C., & Perales, J. (2013). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO2 bio-fixation and low cost biofuels production. *Water research*.
- Assemany, P., Calijuri, M., Aguiar do Couto, E., Batalha de Souza, M., Silva, N., Santiago, A., & Castro, J. (2015). Algae/bacteria consortium in high rate ponds: Influence of solar radiation on the phytoplankton community. *Ecological Engineering*, 77, 154-162.
- Assemany, P., Calijuri, M., Aguiar, E., Batalha, M., & Silva, N. (2015). Algae/bacteria consortium in high rate ponds: Influence of solar radiation on the phytoplankton community. *Ecological Engineering*, 77, 154-162.
- AST Ingeniería S.L. (2013). Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. *Oportunidades empresariales alrededor de las microalgas en el litoral cantábrico*.
- Banco Mundial. (2013). Obtenido de <http://www.bancomundial.org/>
- Barceló, D.; López de Alda, M.J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Plan científico-técnico de seguimiento de la política de aguas*.
- Becker, E. (1994). *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press.
- Cai, T., Park, S., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.
- Carvalho, A., Silva, S., J., B., & Malcata, F. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1275-1288.
- Centro de Investigaciones Sociológicas (CIS). (Abril de 2015). *Barómetro. Percepción de los principales problemas de España*. Recuperado el 2015 de 05 de 23, de

<http://www.cis.es/opencms/->

Archivos/Indicadores/documentos_html/TresProblemas.html

Chiu, S., Kao, C., CHen, T., Chang, Y., Kuo, C., & Lin, C. (2015). Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresource Technology*, *184*, 179-189.

Daigger, G. (2009). Evolving Urban Water and Residuals Management Paradigms: Water Reclamation and Reuse, Decentralization and Resource Recovery. *Water Environment Research*, *81*, 809.

Econosystemics. Recontextualizing Economics for Sustainability. (s.f.). Recuperado el 18 de 05 de 2015, de <http://econosystemics.com/>

Ferrer, P., & Seco, A. (2007). *Tratamientos biológicos de aguas residuales*. Universitat Politècnica de Valencia.

Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + limpia*, *7*(2), 52-73.

Giménez, J. (2014). Estudio del tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas en biorreactores de membranas. En *Tesis doctoral. Universitat de València*. Departament d'Enginyeria Química.

Gimenez, J., Robles, A., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M., Gatti, M., . . . Seco, A. (2011). Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology*, *102*, 8799-8806.

Ginestet, P., Audic, J., Urbain, V., & Block, J. (1998). Estimation of Nitrifying Bacterial Activities by Measuring Oxygen Uptake in the Presence of the Metabolic Inhibitors Allylthiourea and Azide. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(6), 2266-2268.

Golterman, H., & de Oude, N. (1991). Eutrophication of Lakes, Rivers and Coastal Seas. En *Water Pollution* (págs. 79-124).

Gouvion Saint Cyr, D., Wisniewski, C., Schrive, L., Farhi, E., & Rivasseau, C. (2014). Feasibility study of microfiltration for algae separation in an innovative nuclear effluents decontamination process. *Separation and Purification Technology*, *125*, 126-135.

Graham, L., Graham, J., & Wilcox, L. (2000). *Algae* 2ⁿ ed. Pearson Benjamin Cummings.

- Grobbelaar, J., Nebdal, L., & Tichy, V. (1996). Influence of frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different intensities and implications for mass algal cultivation. *Journal of applied phycology*, 8, 335-343.
- Halim, R., Danquah, M., & Webley, P. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30, 709-712.
- Hispagua. (26 de mayo de 2015). *Sistema español de información sobre el agua*. Recuperado el 26 de Mayo de 2015, de http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/hispagua_articulo/dyna/53.pdf
- Ho, S., Li, P., Liu, C., & Chang, J. (2013). Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 145, 142-149.
- Instituto Nacional de Estadística. (2012). *Environment Statistics of Water*. Recuperado el 23 de Mayo de 2015, de <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=%2Ft26%2Fp067%2Fp01&file=inebase>
- Instituto Nacional de Estadística. (2014). Encuesta sobre el Suministro y Saneamiento del agua. Año 2012. *Notas de prensa INE*.
- Kin, K., Choi, J., Ji, Y., Park, S., Do, H., Hwang, C., & Lee, B. (2014). Impact of bubble size on growth and CO₂ uptake of *Arthrospira (Spirulina) platensis* KMMCC CY-007. *Bioresource Tecnology*, 170, 310-315.
- Kong, Q., Li, L., Martinez, B., Chen, P., & Ruan, R. (2009). Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. *Applies Biochemistry ans Biotechnology*, 160, 9-18.
- Lee, K., & Shen, H. (2004). Basic Culturing Techniques. En *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (págs. 41-56). Blackwell Publishing Ltd.
- Lüring, M., & Roessink, I. (2006). On the way to cyanobacterial blooms: Impact of the herbicide metribuzin on the competition between a green alga (*Scenedesmus*) and a cyanobacterium (*Microcystis*). *Chemosphere*, 65, 618-626.

- Marchillac, C., Sialve, B., Pourcher, A., Ziebal, C., Bernet, N., & Béline, F. (2014). Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. *Water Research*, *64*, 278-287.
- Martín, M., & Marzal, P. (1999). Modelación de la calidad del agua. Universitat Politècnica de Valencia.
- Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2009). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 217-232.
- Meseck, S., Smith, B., Wikfors, G., Aliz, J., & Kapareiko, D. (2007). Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. *Journal of Applied Phycology*, *19*, 229-237.
- Metcalf and Eddy Inc. (2004). Treatment Methods. En *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse (4th Edition)*.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2010). Guía para la Aplicación del R.D. 1620/2007 por el que se establece el Régimen Jurídico de la Reutilización de las Aguas Depuradas.
- Mo, W., Soh, L., Werber, J., Elimelech, M., & Zimmerman, J. (2015). Application of membrane dewatering for algal biofuel. *Algal Research*, *11*, 1-12.
- Nyenje, P., Foppen, J., Uhlenbrook, S., Kulabako, R., & Muwanga, A. (2010). Eutrophication and nutrient release in urban areas of sub-Saharan Africa. A review. *Science of The Total Environment*, *408*(3), 447-455.
- Oswald, W. (1988). Micro-algae and wastewater treatment. *Micro-Algal Biotechnology*.
- Oswald, W., & Gotaas, H. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Transcript of the American Society of Civil Engineers*, *122*, 73-105.
- Pancha, I., Choksi, K., George, B., Gosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, *156*, 146-154.
- Photon Systems instruments (PSI). (2014). *Aquapen-P AP-P 100/Aquapen-C AP-C 100. Manual Operation*.

- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., & Pratt, S. (2009). Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*, 43, 4207-4213.
- Ramos, I., Peña, M., & Fdez-Polanco, M. (2014a). Where does the removal of H₂S from biogas occur in microaerobic reactors? *Bioresource Technology*, 166, 151-157.
- Ramos, I., Pérez, R., Reinoso, M., Torio, R., & Fdez-Polanco, M. (2014b). Microaerobic digestion of sewage sludge on an industrial-pilot scale: The efficiency of biogas desulphurisation under different configurations and the impact of O₂ on the microbial communities. *Bioresource Technology*, 164, 338-346.
- Reynolds, C. (2006). Nutrient uptake and intracellular transport of nutrients. En *The ecology of Phytoplankton* (págs. 146-177). Cambridge.
- Risgaard-Petersen, N., Hicolaisen, M., Resvech, N., & Lomstein, B. (2004). Competition between Ammonia-Oxidizing Bacteria and Benthic Microalgae. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5528-5537.
- Ruiz-Marin, A., & Mendoza-Espinosa, L. S. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58-64.
- Ruiz-Martinez, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente*. Univeristat Poliècnica de València.
- Ruiz-Martinez, A., Serralta, J., Seco, A., & Ferrer, J. (2015). Effect of temperature on ammonium removal in *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 191, 346-349.
- Singh, S., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species. A review. *Renewable and Sustainable Energy reviews*, 50, 431-444.
- Smith, A., Stadler, L., Love, N., Skerlos, S., & Raskin, L. (2012). Perspectives on anaerobic membrane bioreactor treatment of domestic wastewater: A critical review. *Bioresource Technology*, 122, 149-159.
- Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2012). Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresource Technology*, 124, 157-162.

- Suikkanen, S., Fistarol, G., & Granéli, E. (2004). Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 308, 85-101.
- Tomaselli, L. (2004). The Microalgal Cell. En *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (págs. 3-19). Blackwell Publishing.
- Tredici, M. (2004). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. En *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (págs. 178-214). Blackwell Publishing Ltd.
- Tripathi, R., Singh, J., & Thakur, S. (2015). Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy*, 74, 774-781.
- U.S. Census Bureau. (s.f.). Recuperado el Mayo de 2015, de <http://www.census.gov/en.html>
- Vonshak, A., & Torzillo, G. (2004). Environmental Stress Physiology. En *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (págs. 57-82). Blackwell Publishing Ltd.
- Wallace, B. (2005). *Becoming Part of the Solution: The Engineer's Guide to Sustainable Development*.
- Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T., & Nelson, Y. (2009). Algal grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, 135, 1115-1112.
- Xu, K., Jiang, H., Juneau, P., & B., Q. (2012). Comparative studies on the photosynthetic responses of three freshwater phytoplankton species to temperature and light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1113-1122.
- Xu, M., Bernards, M., & Hu, Z. (2014). Algae-facilitated chemical phosphorus removal during high-density *Chlorella emersonii* cultivation in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 153, 383-387.