



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

# **“ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris* Y SU CAPACIDAD DE DEPURACIÓN DE AGUA RESIDUAL”**

**Inmaculada Prieto Márquez**

**Grado de Biotecnología**

**Universidad de Almería, 2019-2020**

Tutora: Cynthia Victoria González López

Co-tutora: Celeste Elena Brindley Alías

Departamento de Ingeniería Química - Área de Ingeniería Química

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Depuración de aguas residuales .....	4
1.1.1 Concepto de aguas residuales y problemática .....	4
1.1.2 Tratamiento de aguas residuales urbanas .....	5
1.1.3 Caracterización del agua residual urbana .....	11
1.2 Biotecnología de microalgas.....	13
1.2.1 El proceso fotosintético.....	13
1.2.2 Cinética de crecimiento celular .....	14
1.2.3. Cultivo de microalgas .....	17
1.2.4 Aplicaciones de las microalgas .....	18
1.2.4.1 Producción de biocombustibles.....	18
1.2.4.2 Producción de biofertilizantes, bioestimulantes y biopesticidas.....	18
1.2.4.3 Industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.....	19
1.2.5 Características de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	20
1.3 Depuración de aguas residuales mediante cultivos de microalgas .....	20
1.3.1 Suplementación del medio de cultivo con lixiviados.....	22
2. OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL.....	24
2.1 Análisis de crecimiento de la microalga y la depuración de agua en cuatro medios diferentes .....	24
2.2 Optimización del aporte de lixiviados al medio .....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Microorganismo y sistema de cultivo .....	25
3.2 Toma de muestras y análisis del cultivo .....	26
3.3 Análisis de nutrientes .....	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1 Análisis de crecimiento de la microalga y la depuración de agua en cuatro medios diferentes .....	29
4.1.1 Cultivo discontinuo.....	29
4.1.1.1 Crecimiento del microorganismo.....	29
4.1.1.2 Consumo de nutrientes.....	34
4.1.2 Cultivo semicontinuo.....	39
4.1.2.1 Crecimiento del microorganismo.....	39
4.1.2.2 Consumo de nutrientes.....	43
4.2 Optimización del aporte de lixiviado al medio. Resultados esperables .....	46
5. CONCLUSIONES .....	52
6. BIBLIOGRAFÍA.....	53

# Resumen

Las microalgas son un grupo microbiano muy heterogéneo que proporciona diversas aplicaciones en la actualidad, entre las que se encuentra la depuración de aguas residuales. El tratamiento de las aguas residuales resulta muy importante, ya que estas contienen contaminantes que impiden su reutilización. En el presente estudio se ha analizado el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* y su capacidad de depuración en aguas residuales de secundario de diferente procedencia. Las microalgas son capaces de asimilar nitrógeno y fósforo del agua residual en forma de biomasa, pudiendo resultar un proceso más económico y sostenible frente a otros tipos de tratamientos terciarios. Para demostrar que este proceso es viable, se ha realizado un ensayo utilizando un sistema de 12 columnas de burbujeo con un volumen de cultivo de 250 ml, con cuatro diferentes medios de cultivo (ensayos por triplicado): medio control (Arnon modificado), efluente de secundario procedente de una EDAR (Estación Depuradora de Aguas Residuales), efluente de secundario procedente de un reactor de microalgas tipo raceway, y este último efluente suplementado con lixiviado procedente de la EDAR. Se ha visto que *C. vulgaris* es capaz de sobrevivir a las adversas condiciones presentes en las aguas residuales, eliminando eficientemente nitrógeno presente en forma de amonio y nitrato, y fósforo fundamentalmente en forma de fosfato. Los medios de cultivo que contenían aguas residuales, ya sean de la EDAR o del raceway, permitieron el crecimiento de la microalga, comprobando que esta puede crecer utilizando agua residual como único medio de cultivo, a pesar de la posible limitación de nutrientes. Se demostró que cuando el agua residual es suplementada en lixiviado (con elevada concentración de N en forma de amonio) el crecimiento es aún mayor, siempre y cuando no se alcancen los límites de inhibición para las microalgas. Así, en este trabajo se ha logrado obtener una productividad de biomasa de 0.32 g/(L·día) en ensayos en semicontinuo a una velocidad de dilución de 0.3 1/día con elevados porcentajes de depuración de nutrientes. Se demuestra, además, la importancia de determinar la cantidad óptima de lixiviado a añadir, y se proponen ensayos que añadan hasta un 25% v de lixiviado en base a un estudio bibliográfico.

# Abstract

Currently, microalgae are a very heterogeneous microbial group that provides diverse applications including wastewater depuration. Wastewater treatment is very important as wastewater contain contaminants that prevent their re-use. The growth of *Chlorella vulgaris* microalgae and its sewage treatment capacity in secondary wastewater from different sources have been analyzed in this study. Microalgae are able to assimilate nitrogen and phosphorus from wastewater into biomass, possibly leading to a more economical and sustainable process against other sorts of tertiary treatments. In order to demonstrate that this depuration system is feasible, a trial has been performed using a system of 12 bubbling columns with a working volume of 250 ml, with four different culture media (trials by triplicate): medium control (modified Arnon), secondary effluent from WTP (Wastewater Treatment Plant), secondary effluent from a raceway type microalgae reactor, and the latter effluent supplemented with centrate from WTP. It has been reported that *C. vulgaris* is able to survive the adverse conditions present in wastewater, efficiently removing nitrogen present in the form of ammonium and nitrate, and phosphorus basically in the form of phosphate. The culture mediums containing wastewater, whether from the WTP or raceway, allowed the growth of the microalgae, proving that it can grow using wastewater as the only culture medium, despite possible nutrient limitations. It was demonstrated that when wastewater is supplemented with centrate (with high concentration of N in the form of ammonium) the growth is even greater, as long as inhibition limits for microalgae are not reached. Thus, in this work a biomass productivity of 0.32 g/(L·day) has been achieved in semi-continuous assays at a dilution rate of 0.3 1/day with high percentages of nutrient purification. The importance of determining the optimal amount of centrate to be added is also demonstrated. Studies that add up to 25% v centrate are proposed based on a bibliographic study.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Depuración de aguas residuales

### 1.1.1 Concepto de aguas residuales y problemática

Las aguas residuales son todas aquellas aguas que han sido afectadas negativamente en su calidad debido a la acción humana (Romero Villegas, 2018), y contienen sustancias contaminantes que impiden su utilización para los propósitos normales, como la agricultura y la industria. Estas pueden dañar los ecosistemas donde se vierten, ya que pueden causar que ríos y lagos no sean aptos como fuentes de agua dulce, recreación, agricultura e incluso navegación.

Las fuentes principales de aguas residuales se pueden clasificar según su origen en: aguas residuales urbanas (procedentes de zonas de viviendas y de servicios), aguas residuales agrícolas, aguas residuales ganaderas o aguas residuales industriales (procedentes de locales utilizados para actividades comerciales o industriales). La composición de estas aguas está afectada por dichos orígenes, aunque también se suman contribuciones debido a lluvia e infiltración (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

Los contaminantes en las aguas residuales son una mezcla de compuestos inorgánicos y orgánicos, siendo estos últimos mayoritarios. Entre los contaminantes más habituales se suelen encontrar: materia orgánica biodegradable; organismos patógenos; nutrientes como fosfatos o nitratos, elementos tóxicos como metales pesados derivados del petróleo (aceites sintéticos, polímeros); u otros, como sustancias orgánicas sintéticas (insecticidas), cloro, hierro, detergentes, etc. (Mihelcic y Zimmerman, 2011). Los iones de metales pesados son importantes contaminantes de las aguas residuales industriales (Morales Amaral, 2016), que pueden ser tóxicos no solo para las microalgas, sino también para los seres humanos, incluso en pequeñas cantidades. Ejemplos de ellos son: mercurio, plomo, cobre, cromo, zinc o níquel. No obstante, este trabajo no trata sobre aguas residuales industriales, sino sobre aguas residuales urbanas, en las que los metales pesados no suelen ser abundantes.

Las escorrentías de usos agrícolas, que arrastran fertilizantes (fosfatos y pesticidas), y constituyen una de las causas por las que la eutrofización de pantanos y lagos tiene lugar. Ramalho (1996) define eutrofización como el proceso natural de envejecimiento de los lagos. Sin embargo, la contaminación debida a las actividades humanas acelera este proceso de envejecimiento y acorta enormemente la vida del receptor acuático o medio receptor (mar, río o lago), lugar al que las aguas residuales (tratadas o no) ricas en nitrógeno y fósforo son liberadas, contribuyendo a la aceleración de la eutrofización ecológica (Ramalho, 1996). Además, el nitrógeno y el fósforo presentes en las proteínas de las aguas residuales dan lugar a problemas en los medios receptores, ya que su alta concentración crea condiciones favorables para el desarrollo de plantas verdes. El enriquecimiento y la sedimentación contribuyen al proceso de envejecimiento, de manera que el lago se va llenando de plantas y sedimentos en el fondo, y disminuye su tamaño progresivamente por la invasión de la vegetación en las orillas, pudiendo incluso llegar a ser tierra firme (Ramalho, 1996). En resumen, la extinción de un lago es resultado del enriquecimiento, productividad, degradación y sedimentación.

De todo lo mencionado anteriormente, se desprende que es necesario llevar a cabo un tratamiento adecuado de las aguas residuales que se generan. La clave para el éxito de la reutilización del agua residual tratada es conseguir que la calidad del efluente tratado cumpla los requisitos de calidad correspondientes a su nuevo uso (Mihelcic y Zimmerman, 2011). La composición del agua, junto con el fin al que vayan a ser destinadas las aguas tratadas determina las características que se deben aplicar durante su depuración. Así, nos podemos encontrar ante diferentes casos. Por ejemplo, si el agua tratada se va a emplear como agua de riego, la presencia de una cierta cantidad de materia orgánica es admisible, e incluso beneficiosa. Sin embargo, si el agua tratada se va a verter a cauces donde se pretende mantener sus ecosistemas acuáticos esta presencia de materia orgánica no sería tolerable. Por su parte, el tratamiento de aguas residuales industriales requiere de un tratamiento que puede ser muy específico, atendiendo a la cantidad y peligrosidad de los contaminantes presentes. En último lugar, la depuración de aguas residuales urbanas se suele realizar con tratamientos mucho más estandarizados.

En cuanto a las cifras de consumo mundial de agua, se ha triplicado desde 1950 hasta 2006 (INE, 2008), y aumentó seis veces entre 1900 y 1995, más del doble de la tasa de crecimiento de la población. Actualmente, la escasez de recursos hídricos es un problema importante debido al rápido crecimiento de la población, además del aumento de la actividad agrícola e industrial. Por ello, no cabe duda de que la reutilización del agua se ha convertido en un tema de gran relevancia, siendo la depuración de aguas residuales cada vez más necesaria (Morales Amaral, 2016). Esta escasez de agua ha obligado a optimizar su uso reutilizando las aguas depuradas, que son destinadas en un primer plano para industria, consumos municipales (limpieza de calles y alcantarillado, riego de parques y jardines, etc.) e irrigación en agricultura. También se emplean en un segundo plano para uso doméstico o recargas de aguas subterráneas.

El Ministerio de la Presidencia introduce el término de aguas regeneradas para aquellas que han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan. En el periodo 2000-2005 el volumen de agua reutilizada aumentó un 69% (INE, 2008). El uso de aguas regeneradas para consumo humano está prohibido, salvo en situaciones de catástrofe y, en todo caso, con las garantías sanitarias oportunas. El volumen de aguas residuales urbanas depuradas experimentó entre los años 1996 y 2005 un incremento del 150% (INE, 2008). El volumen de aguas residuales tratadas en España en el año 2016 fue de casi 13 millones m<sup>3</sup>/día; se reutilizaron 1.35 millones m<sup>3</sup>/día; y se generó un volumen de lodos en el tratamiento de aguas residuales de 1.17 toneladas de materia seca/año (INE, 2008).

Es importante resaltar que la reducción de la contaminación de aguas exige la cooperación de disciplinas muy variadas (Ramalho, 1996): ciencias aplicadas e ingeniería, ciencias biológicas, ciencias de la tierra, ciencias sociales y económicas.

### **1.1.2 Tratamiento de aguas residuales urbanas**

El tratamiento de aguas residuales consiste en una serie de procesos químicos, físicos y biológicos, cuyo objetivo es eliminar los contaminantes presentes en el agua residual urbana, que son mayoritariamente orgánicos. Normalmente, el tratamiento de aguas residuales urbanas comienza con la separación física de grandes sólidos, gracias a un sistema de rejillas o mallas, aunque también se pueden triturar con equipos especiales. Posteriormente, mediante desarenado se separan los sólidos pequeños más densos, como la arena. Después tiene lugar una sedimentación primaria que separa los sólidos suspendidos presentes en el

agua residual. A continuación, los microorganismos, mayoritariamente bacterias, convierten la materia orgánica disuelta generando biomasa, gracias su crecimiento. Este proceso recibe el nombre de tratamiento o proceso biológico, que se encuadra dentro de los tratamientos secundarios. Entonces, la biomasa generada es separada de nuevo mediante sedimentación, llamada sedimentación secundaria, tras la cual el agua tratada puede ser sometida a procesos adicionales como desinfección (ozonación o cloración), adsorción (carbón activado), intercambio iónico o separación por membranas, según el fin deseado. Finalmente, se consigue agua limpia o reutilizable y un residuo sólido, que es llamado fango, lodo o biosólido (Mihelcic y Zimmerman, 2011). Este tratamiento de aguas residuales urbanas normalmente se realiza en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), que normalmente incluye tratamientos primarios y secundarios (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

Normalmente, primero ha de realizarse un pretratamiento del agua residual. En esta etapa el agua se prepara para los tratamientos posteriores, eliminando sólidos de gran tamaño para impedir que estos obstruyan las entradas o salidas de los equipos encargados de la depuración (Tebbutt, 1983). Existen diferentes pretratamientos de aguas residuales, que implican la reducción de sólidos en suspensión en el agua o el acondicionamiento de las aguas residuales para su descarga en los receptores (Ramalho, 1996). Para ello, se pueden emplear sistemas mecánicos, como cribado o desbrozo. También incluye el desarenado y el desengrasado y desnatado. Se usan tanques de ecualización para nivelar caudales o cargas de materia orgánica (Mihelcic y Zimmerman, 2011). Este pretratamiento se puede realizar también mediante sedimentación, tamices, filtración o flotación. Según Castro Bustamante (2018) la filtración por membrana es la operación de separación física que tiene un mayor rendimiento de producción, sin requerimiento de agentes químicos y de bajo consumo energético. Esta se utiliza para eliminar la gran cantidad de sólidos suspendidos presentes en la corriente de agua residual, y es una de las tecnologías más modernas utilizadas para la desmineralización y purificación del agua. Dicha membrana no solo funciona en función del tamaño de partícula, sino que provoca una separación selectiva, lo que quiere decir que algunas sustancias pueden atravesar la membrana, mientras que otras quedan atrapadas en ella.

A continuación, tiene lugar el tratamiento de aguas residuales pasando por cuatro etapas o niveles en función de las partículas que se eliminan: tratamiento primario, tratamiento secundario, tratamiento terciario y desinfección. Según Ramalho (1996) la selección de los procesos de tratamiento de aguas residuales depende de diferentes factores, entre los que se encuentran los siguientes: características del agua residual (DBO, materia en suspensión, pH y productos tóxicos); calidad del efluente de salida; coste y disponibilidad de terrenos, ya que algunos tratamientos biológicos son viables económicamente solo si se dispone de terrenos de bajo coste; consideración de las futuras ampliaciones o previsión de límites de calidad de vertidos más estrictos, que necesiten tratamientos más sofisticados en el futuro; y coste local del agua.

Tabla 1. Clasificación convencional de los procesos de tratamiento de aguas residuales (Ramalho, 1996).

Tipos de tratamiento de aguas residuales

- Tratamiento primario
  - Cribado o desbozo
  - Sedimentación
  - Flotación
  - Separación de aceites
  - Homogeneización
  - Neutralización
- Tratamiento secundario
  - Lodos activos
  - Aireación prolongada (procesos de oxidación total)
  - Estabilización por contacto
  - Otras modificaciones del sistema convencional de lodos activos: aireación por fases, mezcla completa, aireación descendente, alta carga, aireación con oxígeno puro
  - Lagunaje con aireación
  - Estabilización por lagunaje
  - Filtros biológicos (percoladores)
  - Discos biológicos
  - Tratamientos anaerobios: procesos de contacto, filtros (sumergidos)
- Tratamiento terciario o "avanzado"
  - Microtamizado
  - Filtración (lecho de arena, antracita, diatomeas...)
  - Precipitación y coagulación
  - Adsorción (carbón activado)
  - Intercambio iónico
  - Ósmosis inversa
  - Electrodialisis
  - Cloración y ozonización
  - Procesos de reducción de nutrientes
  - Otros

Tratamiento primario

Durante esta etapa, se eliminan los materiales flotantes y las partículas en suspensión en el agua que sean más densos que esta. El agua pasa a través de filtros cada vez más pequeños, de manera que se separan entre el 90 y el 95% de los sólidos presentes en el agua residual, y la DQO es reducida entre el 20 y el 40% (Ramalho, 1996). Los tratamientos que se llevan a cabo durante el tratamiento primario son los siguientes:

- Coagulación-floculación: se añaden sustancias, como hidróxido de hierro o sulfato de aluminio, que induzcan la coalescencia y la floculación. De esta forma, se favorece la sedimentación de las partículas sólidas, coloides y macromoléculas del agua (Mihelcic y Zimmerman, 2011).
- Sedimentación: los sólidos se separan por la fuerza de la gravedad (Mihelcic y Zimmerman, 2011).
- Precipitación química: se agregan sustancias, como carbonato de calcio, para precipitar en forma de sales insolubles algunas impurezas presentes en el agua (Mihelcic y Zimmerman, 2011).
- Neutralización: se utiliza durante el tratamiento primario en los siguientes casos que se presentan en la depuración de aguas (Ramalho, 1996):
  - Antes de cargar aguas residuales a un medio receptor.
  - Antes de la carga de aguas residuales industriales al sistema de alcantarillado municipal.

- Antes del tratamiento biológico o químico. El pH debe estar comprendido en un rango de 6.5 a 8.5. El proceso biológico por sí solo puede conseguir una neutralización, y puede tener capacidad tampón como resultado de la producción de CO<sub>2</sub> que da lugar a la formación de carbonatos y bicarbonatos en la solución.
- Homogeneización: puede ser utilizada para otros objetivos aparte de la neutralización, como reducir las variaciones de las corrientes de aguas residuales, consiguiendo una corriente mezclada y homogénea, con un caudal relativamente constante al que llega a la planta de tratamiento. Otro objetivo sería aminorar las variaciones de la DBO del afluente a los sistemas de tratamiento (Ramalho, 1996).

### Tratamiento secundario

La expresión “tratamiento secundario” se refiere a aquellos procesos de tratamiento biológico de las aguas residuales, tanto aerobios como anaerobios, según Ramalho (1996). Durante este tratamiento biológico se eliminan las macromoléculas y coloides que no han sido eliminados anteriormente, es decir, se elimina la materia orgánica disuelta en el agua (DBO). Para ello, se pueden emplear procesos químicos, que principalmente incluyen la precipitación mediante el uso de polielectrolitos; o biológicos, que son los más utilizados, especialmente para tratar aguas residuales urbanas, y consisten en la degradación de la materia orgánica mediante microorganismos (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

Los efluentes son llevados a un tratamiento secundario directamente o pasando por una neutralización u homogeneización, procesos explicados anteriormente. Los tratamientos de aguas residuales convencionales durante el tratamiento secundario usan bacterias aerobias para degradar materia orgánica a CO<sub>2</sub> y otros compuestos. Estos microorganismos necesitan concentraciones de oxígeno disuelto de al menos 2 mg/L, motivo por el que se debe aportar oxígeno, con el consiguiente gasto energético, que finalmente encarece el proceso (Morales Amaral, 2016).

### *Clasificación de los procesos biológicos*

Según Mihelcic y Zimmerman (2011) la clasificación de los procesos biológicos aplicados a la depuración de aguas se realiza en base al metabolismo que emplean los microorganismos para degradar la materia orgánica como sigue:

- Procesos aerobios: los microorganismos que convierten la materia orgánica necesitan oxígeno para su metabolismo. El más común para depurar aguas es el proceso de lodos o fangos activos.
- Procesos anaerobios: los microorganismos que actúan en la conversión de la materia orgánica no necesitan oxígeno para su metabolismo, ya que emplean otro aceptor de electrones. Un ejemplo de estos procesos es la digestión anaerobia de los fangos activos (proceso de estabilización de fangos).
- Procesos anóxicos: los microorganismos que actúan en la conversión de la materia orgánica metabolizan el nitrógeno de los nitratos o nitritos en nitrógeno gas (N<sub>2</sub>), en ausencia de oxígeno. No obstante, las principales vías bioquímicas empleadas por estos organismos no son anaerobias, sino modificaciones de las vías aerobias. Por este motivo se emplea el término anóxico, en lugar de anaerobio.

### Proceso de fangos activos

El proceso de fangos activos es uno de los procesos biológicos más utilizados en el tratamiento de aguas residuales urbanas. El nombre de este proceso proviene de la producción de una masa activada de microorganismos, es decir, los microorganismos trabajan activamente en la degradación de la materia orgánica (Mihelcic y Zimmerman, 2011). Este proceso consiste en desarrollar un cultivo microbiano disperso en forma de flóculos, en un tanque de aireación que es alimentado con agua residual, como se puede ver en la Figura 1. La aireación se logra mediante aireadores mecánicos, ya que es necesario suministrar oxígeno para los microorganismos aeróbicos, especialmente bacterias. Por otra parte, la aireación evita la sedimentación, favorece una buena mezcla en el biorreactor, y homogeneiza la mezcla de los flóculos microbianos con el agua residual. La mezcla contenida en el reactor recibe el nombre de "líquido mezcla", y consiste en el líquido, los sólidos residuales y los microorganismos, (mezcla de reacción o mixed liquor ML), como explican Mihelcic y Zimmerman (2011). En esta mezcla se pueden encontrar:

- Sólidos suspendidos del líquido mezcla (SSLM): medida de sólidos en suspensión totales del líquido mezcla del tanque de aireación.
- Sólidos suspendidos volátiles (SSV): manera de describir la biomasa del reactor, debido a que la mayor parte de los sólidos son microorganismos con un alto contenido en carbono en su estructura celular.
- Sólidos suspendidos del líquido mezcla volátiles (SSLMV): fracción volátil de SSLM, que representa la biomasa del tanque de aireación. SSLMV consiste en bacterias, tanto facultativas como aerobias; lodo, formado por flóculos de sustancias extracelulares, contenido intracelular (proteínas, lípidos, etc.), células bacterianas y restos celulares; células con motilidad; protozoos; y materia orgánica no biodegradable.

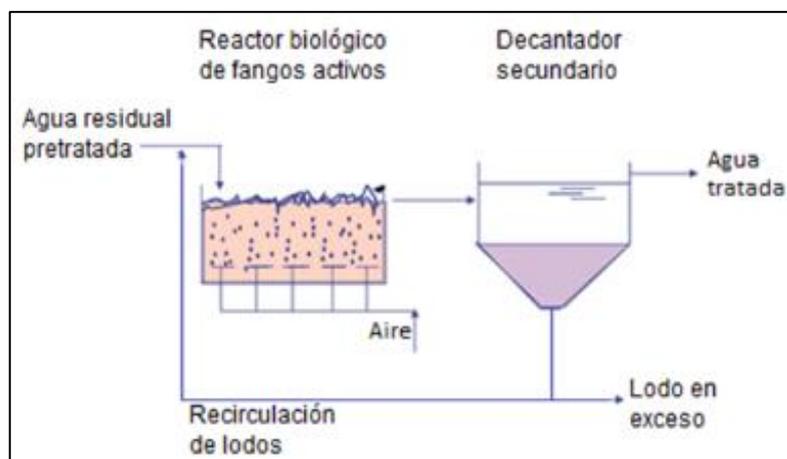


Figura 1. Proceso de fangos activos (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

En el tanque de aireación las bacterias convierten la materia orgánica disuelta (medida como CDBO y NDBO) en  $\text{CO}_2$ , agua, nitratos, y materia orgánica. Este proceso consiste en un proceso de autodepuración acelerada, reforzada y controlada. Los fenómenos presentes en este sistema son aquellos que se presentan en los ríos o lagos naturales, con la diferencia de que en los tanques de aireación los organismos se agrupan en gran número y en un espacio reducido.

En cuanto al denominado fango activo, está formado por una población heterogénea de microorganismos (bacterias unicelulares, hongos, algas, protozoos y rotíferos) que cambian constantemente en función de

las condiciones ambientales y en función de las variaciones de la composición de las aguas residuales (Ramalho, 1996). En este fango las bacterias son los microorganismos más importantes, ya que son los principales causantes de la descomposición de los contaminantes del afluente, asimilando la materia orgánica disuelta en el agua. Por otro lado, los protozoos y los rotíferos contribuyen a retirar las bacterias dispersas que, de otro modo, no sedimentarían. En general, las bacterias que intervienen en el proceso de fangos activos incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium*, y los dos tipos de bacterias nitrificantes más comunes son *Nitrosomas* y *Nitrobacter*. Adicionalmente, se pueden presentar diversas formas filamentosas tales como *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Lecicothrix*, y *Geotrichum* (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

#### Tratamiento terciario o avanzado

Consiste en una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que están destinados a conseguir una calidad del efluente superior a la del tratamiento secundario, con el objetivo de eliminar las materias disueltas que no han sido eliminadas en el tratamiento anterior, como describe Ramalho (1996). El tratamiento secundario a veces no es suficiente y resulta inadecuado para proteger el medio receptor (Mihelcic y Zimmerman, 2011), por lo que es necesaria la eliminación de algunos contaminantes, y sobre todo la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) que se lleva a cabo durante el tratamiento terciario. El motivo por el que se quieren eliminar los sólidos en suspensión es que pueden constituir una parte importante de la DBO de los efluentes de las plantas de tratamiento. Esto se puede llevar a cabo mediante microtamizado, filtración y coagulación, según Ramalho (1996).

#### Desinfección

El objetivo de esta última etapa antes de la descarga del agua tratada es eliminar organismos patógenos. Este proceso se basa en un conjunto de tratamientos de tipo físico-químico, según el uso posterior que vaya a tener el agua (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

#### Línea de lodos. Obtención de lixiviado

En cuanto al lodo, se lleva a cabo una separación de insolubles, frecuentemente mediante un filtro de bandas que permite separar los sólidos de la fracción líquida del digestato, el cual se obtiene después de la digestión anaerobia de los lodos activos (Romero Villegas, 2018). Esta fracción líquida es lo que se denomina lixiviado. Presenta un elevado contenido en nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno, con una concentración de amonio de hasta 400 mg/L (Morales Amaral, 2016). Este alto contenido en nutrientes se debe al proceso de mineralización ocurrido durante la digestión anaeróbica. Este efluente procedente del “escurrido” de fangos a la salida del digestor anaerobio (Morales Amaral, 2016) contiene materiales orgánicos e inorgánicos de forma suspendida, además de microorganismos patógenos. Además, este líquido presenta un olor intenso, es negro, y puede formar espuma. Por último, tienen una alta carga orgánica, DQO y DBO<sub>5</sub> que son factores de contaminación (Guevara Naranjo, 2019).

### 1.1.3 Caracterización del agua residual urbana

La composición del agua residual urbana, formada por microorganismos, compuestos orgánicos e inorgánicos, es tan compleja que no resulta práctica su caracterización en base a un análisis químico y biológico exhaustivo, por lo que se recurre a la utilización de parámetros empíricos para cuantificar la carga contaminante del agua (Mihelcic y Zimmerman, 2011). La composición de las aguas residuales urbanas varía según la ubicación y el tiempo, pudiendo diferir considerablemente la composición de las mismas incluso de un día para otro en una misma EDAR. Por ello, es importante medir periódicamente varios parámetros para caracterizar tanto el agua residual de entrada a la planta, como los efluentes resultantes de la misma, cuantificando así los contaminantes que contienen.

A continuación, se definen las principales variables medibles:

- **Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO):** cantidad de oxígeno (mg/L) que resulta necesaria para la oxidación bioquímica aerobia de la materia orgánica biodegradable de los componentes de las aguas residuales (Castro Bustamante, 2018; Ramalho, 1996). Representa la oxidación para producir energía, la síntesis de células y la respiración endógena. Según Mihelcic y Zimmerman (2011) la DBO tiene dos componentes: la DBO carbonosa (debida al consumo de oxígeno por microorganismos quimioheterótrofos) y la DBO de la nitrificación (debida al consumo de oxígeno por microorganismos quimioautótrofos). Una elevada DBO implica una disminución del oxígeno disuelto del agua, pudiendo causar anaerobiosis y muerte de organismos. De ahí que su eliminación constituya un objetivo principal del tratamiento de aguas.

Normalmente se mide la  $DBO_5$ , que indica la cantidad de oxígeno que las bacterias y otros microorganismos consumen durante 5 días a una temperatura de 20°C en una muestra de agua para la degradación aeróbica de las sustancias contenidas en ella (Lexikon, 2020). Para aguas residuales urbanas típicas un valor de  $DBO_5$  está en torno a 200 mg/L (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

$$DBO_5 \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{OD_1 - OD_2}{V} \quad [1]$$

Siendo:             $OD_1$ : oxígeno disuelto medido al principio del ensayo  
                       $OD_2$ : oxígeno disuelto medido después de 5 días de incubación a 20 °C  
                      V: volumen de agua

- **Demanda Química de Oxígeno (DQO):** cantidad equivalente de oxígeno (mg/L) necesaria para oxidar los componentes orgánicos del agua utilizando agentes químicos oxidantes (Castro Bustamante, 2018). También se puede definir como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar por completo el sustrato, por lo que proporciona información sobre la materia total, tanto orgánica como inorgánica. La medida de la DQO se realiza mediante oxidación con dicromato y valoración del dicromato sobrante tras la oxidación que luego se convierte a oxígeno equivalente (Mihelcic y Zimmerman, 2011). Para aguas residuales urbanas típicas la DQO está en torno a 450 mg/L (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

- La relación  $DBO_5/DQO$  indica la biodegradabilidad de las aguas residuales: las aguas muy biodegradables tienen un valor mayor de 0.4; las aguas biodegradables tienen un valor entre 0.2 y 0.4; y las aguas poco biodegradables tienen un valor menor de 0.2 (Castro Bustamante, 2018). Según Mihelcic y Zimmerman (2011) para aguas residuales municipales se asume que  $DBO/DQO$  es aproximadamente 0.67.

- Sólidos totales (ST): masa del residuo que queda tras un proceso de evaporación y secado a 104°C. Una parte de estos sólidos se encuentra disuelta (sólidos disueltos totales, SDT), mientras que otra se encuentra en suspensión (sólidos en suspensión totales, SST) (Mihelcic y Zimmerman, 2011).
- Sólidos sedimentables: materia que puede ser separada mediante sedimentación o decantación (Mihelcic y Zimmerman, 2011).
- Sólidos en suspensión totales (SST): incluye materia sedimentable y sólidos no sedimentables, debido a su pequeño tamaño o a la presencia de fuerzas electrostáticas. Se separan mediante filtración del agua con un filtro. No todos los sólidos en suspensión son biodegradables, ya que parte puede corresponder con sustancias inorgánicas (Mihelcic y Zimmerman, 2011).
- Sólidos en suspensión volátiles (SSV): son los sólidos en suspensión biodegradables. No todos los sólidos en suspensión lo son, ya que parte puede corresponder con sustancias inorgánicas (Mihelcic y Zimmerman, 2011). Se determinan por calcinación a 500°C. Por ello se suele utilizar como parámetro para cuantificar el contenido en biomasa del agua residual.
- Sólidos en suspensión fijos (SSF): residuo que queda tras la calcinación mencionada en el punto anterior.
- Nitrógeno: en las aguas residuales aparece en forma de nitratos y nitritos minoritariamente, y en forma de amoníaco y nitrógeno orgánico mayoritariamente. El nitrógeno es considerado un contaminante en las aguas residuales debido a que puede causar eutrofización, además de perjudicar la salud de animales y humanos (Ghafari *et al.*, 2008). Según la legislación de la Unión Europea, el nitrógeno en el efluente de las plantas de tratamiento no debe exceder 10 mg/L (Molazadeh *et al.*, 2019).

La oxidación del material nitrogenado contribuye a la demanda de oxígeno si la incubación se lleva a cabo durante un periodo de tiempo suficientemente largo. La nitrificación se logra durante el tratamiento secundario por bacterias litotróficas (Mihelcic y Zimmerman, 2011) y tiene lugar en dos etapas (Ramalho, 1996):

- El ion amonio se oxida a nitrito (Ecuación 2) en presencia de microorganismos *Nitrosomonas*:



- Los nitritos se oxidan a nitratos (Ecuación 3) en presencia de microorganismos *Nitrobacter*:



- Fósforo: el fósforo contenido en las aguas residuales se encuentra en diversas formas, tanto orgánicas como inorgánicas. En los medios de cultivo suele incorporarse en forma de  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Hernández Pérez y Labbé, 2014). Según la legislación de la Unión Europea, el fósforo en el efluente de las plantas de tratamiento no debe exceder 1 mg/L (Molazadeh *et al.*, 2019).

La composición típica de un agua residual urbana en cuanto a DQO, nitrógeno proveniente de nitratos, nitrógeno amoniacal y fósforo proveniente de fosfato para el tratamiento primario, secundario, terciario y digestión anaerobia podría ser la que se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Composición del efluente en cada etapa del proceso (Romero Villegas, 2018).

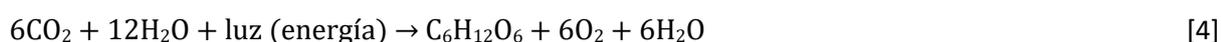
Tratamiento	DQO (mg/L)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/L)
Primario	430	0	5	11
Secundario	110	0	20	10
Terciario	< 125	0	< 10	< 1
Digestión aerobia	300	5	506	12

## 1.2 Biotecnología de microalgas

Las microalgas son un diverso grupo de microorganismos unicelulares existiendo alrededor de 300.000 especies diferentes en el planeta, de las cuales solo se han descrito alrededor de 40.000 (Lewandowski *et al.*, 2018). Este grupo incluye cianobacterias (procariontas), así como especies de microalgas eucariotas capaces de crecer en diversos ambientes (Lewandowski *et al.*, 2018). La mayoría son fotoautótrofas, es decir, la luz es su fuente de energía, mientras que el CO<sub>2</sub> es su fuente de carbono.

### 1.2.1 El proceso fotosintético

Se puede afirmar que la fotosíntesis que realizan las microalgas es un proceso de gran importancia, ya que el fitoplancton marino produce aproximadamente el 50% del oxígeno en la atmósfera (Gamarra Santos, 2019). Las microalgas utilizan la radiación fotosintéticamente activa o PAR (Photosynthetically Active Radiation), que está comprendida en el rango de longitud de onda de 400 a 700 nm. La fotosíntesis convierte la energía lumínica absorbida en energía de tipo químico, utilizable para el desarrollo y crecimiento celular, siendo el NADPH y el ATP las moléculas en las que queda almacenada esta energía química. La fotosíntesis oxigénica se puede expresar como una reacción de oxidorreducción promovida por la energía de la luz, en la que agua y CO<sub>2</sub> se convierten en oxígeno y carbohidratos. Entonces, la estequiometría de la fotosíntesis oxigénica permite calcular la relación entre: CO<sub>2</sub> fijado, O<sub>2</sub> liberado, y glucosa generada:



Este proceso, que supone la conversión de materia inorgánica en materia orgánica, ocurre en complejos enzimáticos que están presentes en las membranas celulares. En definitiva, la luz es recolectada por un sistema de pigmentos, que actúan como antenas y dirigen la energía absorbida hacia los centros de reacción, donde las reacciones fotoquímicas tienen lugar. El cambio fotoquímico inicial provoca un bombeo de electrones a través de las paredes del cloroplasto que produce una diferencia de concentración de protones entre ambos lados de la membrana, capaz de provocar la fosforilación de ADP produciendo ATP. En último término, estas moléculas de ATP son utilizadas para fabricar compuestos químicos mediante reacciones anabólicas con el fin de satisfacer las necesidades energéticas del organismo.

Los pigmentos fotosintéticos son de gran importancia, hasta el punto en que Reol (2003) afirma que son la base de la vida sobre la Tierra. Los pigmentos primarios tienen como función la captación de la energía lumínica. El pigmento primario en todas las algas es la clorofila a, que está asociada a proteínas del centro de reacción y a los pigmentos antena del fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII), y se puede clasificar según se trate de organismos fotosintéticos procariontas (bacterioclorofila a) o eucariotas (clorofila a).

*Chlorophyta* dispone de clorofila b que actúa como recolector de luz, además de transferir la energía luminosa hacia la clorofila a (Mena Bolaños, 2019). La clorofila a, junto con la clorofila b se asocian a los complejos externos cosechadores de energía del PSI y PSII denominados LHCI y LHCII, respectivamente (Nelson y Yocum, 2006). Estos están acompañados de otros pigmentos accesorios (carotenoides), cuya función es ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios, además de proteger frente a una cantidad de luz excesiva, disipando el exceso de energía absorbida, de manera que no sea dañina (Gamarra Santos, 2019). Los carotenoides son una clase de pigmentos que se producen en dos tipos principales, la clase de hidrocarburos (carotenos) y la clase oxigenada (xantofilas), que tienen una fuerte propiedad antioxidante.

### 1.2.2 Cinética de crecimiento celular

Para analizar los cultivos de microalgas es necesario obtener expresiones para la velocidad específica de crecimiento celular ( $\mu$ ) y para la productividad volumétrica de biomasa ( $P_b$ ). La concentración de biomasa ( $C_b$ ) se expresa en masa seca por unidad de volumen de cultivo. Es usual encontrarla expresada en gramos por litro (g/L), gramos por metro cúbico (g/m<sup>3</sup>) o kg por metro cúbico (kg/m<sup>3</sup>). La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es una medida de la capacidad de generación de biomasa. Mide la cantidad de gramos de biomasa que es capaz de generar cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo:

$$\mu = \frac{1}{C_b} \cdot \frac{dC_b}{dt} \quad [5]$$

Siendo:  $\mu$ : velocidad específica de crecimiento, g biomasa formada/(g biomasa seca·día), o simplemente 1/día  
 $C_b$ : concentración de biomasa, g/m<sup>3</sup>  
 $dC_b/dt$ : variación de la concentración de biomasa respecto al tiempo, g/(m<sup>3</sup>día)

Existen diversos modos de operación de fotobiorreactores. El cultivo en modo discontinuo consiste en introducir en el fotobiorreactor el medio de cultivo junto con el inóculo de microalgas y dejar que evolucione durante un periodo de tiempo determinado. Cuando la concentración de biomasa o biomoléculas de interés ha alcanzado su máximo valor se cosecha, se limpia el reactor y entonces comienza una nueva operación. Este sistema permite una mayor versatilidad del reactor, pero presenta periodos muertos entre cada carga, lo que hace que la productividad global disminuya. En el cultivo semicontinuo se cosecha una parte del volumen del reactor reponiendo dicho volumen con medio de cultivo nuevo. De esta forma, se eliminan los tiempos muertos entre cargas, por lo que se pueden conseguir mayores productividades que en el cultivo discontinuo. En el modo de operación en continuo se introduce medio fresco constantemente al cultivo mezclado homogéneamente durante el periodo iluminado, a la misma vez que se extrae el mismo caudal de cosechado del reactor, de manera que se alcanza un estado estacionario que permite operar sin detenciones. Cuando la variable fija es la velocidad de dilución se dice que el sistema actúa como un quimiostato, mientras que, cuando la variable fija es la concentración de biomasa el sistema se denomina turbidostato. Para Morales Amaral (2016) el modo continuo es el más adecuado debido al acoplamiento que se produce entre el proceso fotosintético dependiente de la luz solar, y la generación de aguas residuales que alcanza sus valores máximos en las horas diurnas, disminuyendo durante la noche considerablemente.

Si nos centramos en un cultivo discontinuo, recordemos en primer lugar que el crecimiento celular tiene lugar de tal modo que se distinguen cuatro etapas (Castro Bustamante, 2018):

- Fase de latencia o fase lag: se produce después de la inoculación. En esta etapa no tiene lugar la replicación de ADN, y no hay creación de nuevas células. Las células se están adaptando al medio.
- Fase de crecimiento exponencial: las células se reproducen a la velocidad máxima para las condiciones ambientales determinadas, ya que no hay limitación de nutrientes.
- Fase estacionaria: cuando se agota un nutriente se detiene el crecimiento, de manera que la población de células permanece estacionaria (la regeneración de células nuevas se compensa con la muerte de células viejas).
- Fase de muerte: se produce la muerte celular: se agota el sustrato y la población celular desciende, ya que la tasa de mortalidad es superior a la tasa de generación de nuevas células.

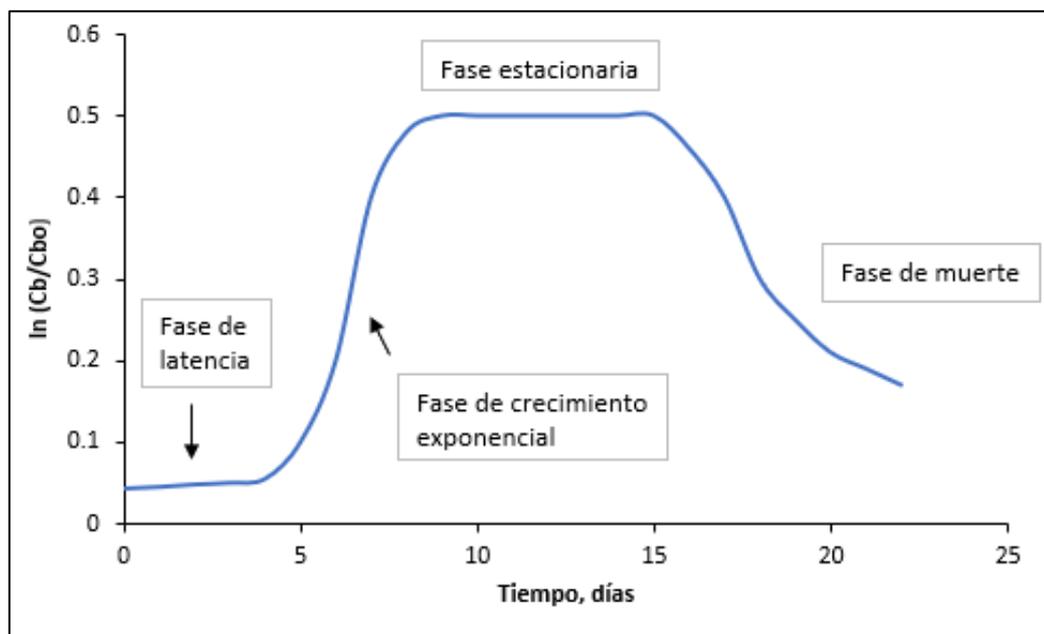


Figura 2. Crecimiento celular en discontinuo (Castro Bustamante, 2018).

La velocidad específica de crecimiento varía con respecto al tiempo. Cuando el cultivo se encuentra en condiciones de saturación de nutrientes  $\mu$  es constante y se denomina  $\mu_{max}$ . En este caso la ecuación diferencial que define  $\mu$  (Ecuación 5) se integra, dando lugar a un crecimiento exponencial:

$$Cb = Cbo \cdot e^{\mu_{max} \cdot t} \quad [6]$$

Siendo:            Cb: concentración de biomasa, g/m<sup>3</sup>  
                       Cbo: concentración de biomasa inicial, g/m<sup>3</sup>  
                        $\mu_{max}$  velocidad específica de crecimiento máxima, 1/día  
                       t: tiempo, día

Operando:

$$\ln \frac{Cb}{Cbo} = \mu_{max} \cdot t \quad [7]$$

Por tanto, la velocidad específica de crecimiento máxima se puede calcular a partir de la pendiente de  $\ln(C_b/C_{b0})$  versus tiempo.

En el caso de las microalgas, si planteamos un cultivo en continuo, la limitación más habitual del crecimiento es la limitación por luz. La relación entre  $\mu$  e irradiancia ( $I$ ) representaría el modelo de crecimiento de limitación por luz. Existen diferentes ecuaciones propuestas que varían fundamentalmente en la forma de la curva  $\mu$ - $I$ . Por ejemplo, Molina Grima *et al.* (1994) propusieron un modelo de limitación de luz para cultivos continuos mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot I_{av}^n}{I_k^n + I_{av}^n} \quad [8]$$

Siendo:  $I_{av}$ : irradiancia promedio en el interior del reactor,  $\mu E/(m^2 \cdot s)$   
 $I_k$ : irradiancia a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima de crecimiento, o constante que depende de la especie de microalga,  $\mu E/(m^2 \cdot s)$ .  
 $n$ : parámetro establecido empíricamente, que da forma sigmoideal si  $n > 1$

En un cultivo operado en modo continuo normalmente se suele trabajar en quimiostato, por lo que la velocidad específica de crecimiento de la biomasa es constante y coincide con la velocidad de dilución impuesta al cultivo ( $\mu = D$ ).

La productividad volumétrica de biomasa ( $P_b$ ) mide la masa de biomasa que se genera por unidad de volumen de cultivo y tiempo. Puede obtenerse en cada momento como el cociente del incremento de la concentración de biomasa ( $\Delta C_b$ ) en un incremento dado de tiempo ( $\Delta t$ ). Esto nos daría la productividad media del periodo. Si se mide en un  $\Delta t$  muy pequeño, tenemos la definición de productividad volumétrica instantánea:

$$P_b = \frac{dC_b}{dt} \quad [9]$$

Siendo:  $P_b$ : productividad de biomasa,  $g/(m^3 \cdot día)$   
 $dC_b/dt$ : velocidad de crecimiento microbiano,  $g/(m^3 \cdot día)$

De la definición de  $\mu$ , se deduce que ambas variables están relacionadas, de modo que en un cultivo en continuo alcanzaremos un estado estacionario y tendremos que:

$$P_b = \mu \cdot C_b = D \cdot C_b \quad [10]$$

Siendo:  $P_b$ : productividad volumétrica de biomasa,  $g/(m^3 \cdot día)$   
 $C_b$ : concentración de biomasa,  $g/m^3$   
 $\mu$ : velocidad específica de crecimiento,  $1/día$   
 $D$ : velocidad de dilución,  $1/día$

La irradiancia incidente, los ciclos de luz-oscuridad, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura, entre otras variables, influyen en la productividad de biomasa y de formación de productos de interés.

### 1.2.3. Cultivo de microalgas

Son varios los factores que afectan al cultivo de microalgas. Entre ellos se puede destacar:

Luz: es el principal factor limitante, y está relacionada con un buen diseño de los fotobiorreactores (Sutherland *et al.*, 2015). La concentración celular reduce considerablemente la penetración de luz en el cultivo causando un uso deficiente de luz (Park y Lee, 2001) debido al sombreado, lo cual afecta la disponibilidad de luz para las células. Cuando no existe limitación por nutrientes, la fotosíntesis se incrementa con el aumento de la intensidad lumínica hasta alcanzar la máxima velocidad de crecimiento específica para cada especie en el punto de saturación por luz. Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición (cuando la concentración de CO<sub>2</sub> es más baja que la de oxígeno), produciéndose resultados perjudiciales para las células e incluso la muerte, conduciendo a la pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Hernández Pérez y Labbé, 2014). Para evitar eso, es necesario que las microalgas se encuentren en un ambiente adecuado para su desarrollo, lo que quiere decir que debe tener un aporte adecuado CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo y una eficiente eliminación de oxígeno disuelto en el medio (Romero Villegas, 2018).

Temperatura: debe encontrarse en el intervalo de 18 a 30 °C para un crecimiento óptimo de la microalga *Chlorella* (Barona Altamirano, 2014). Temperaturas por debajo de 16°C retardan el crecimiento de las especies, mientras que temperaturas superiores a 35°C pueden ser letales. La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, la respiración aumenta y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura se puede controlar en un sistema de cultivo cerrado mediante cambiadores de calor, pero en un sistema de cultivo abierto el único mecanismo de atenuación de la temperatura del cultivo es la evaporación.

pH: es de gran importancia en los cultivos debido a que es el responsable de la disponibilidad y solubilidad de CO<sub>2</sub> y de los nutrientes esenciales (Romero Villegas, 2018). La modificación de este factor determina en gran medida la disponibilidad de las fuentes de carbono inorgánico. El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana tanto autotrófica como heterotrófica y, por último, la eficiencia del sistema de adición de CO<sub>2</sub> (Hernández Pérez y Labbé, 2014). Cada especie necesita un rango determinado de pH para alcanzar un crecimiento óptimo, siendo el rango de pH óptimo para *C. vulgaris* de 6 a 8 (Naderi *et al.*, 2015). Por encima o debajo de éste, tiene lugar un descenso de la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la capacidad de eliminar el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas (Park *et al.*, 2011). El pH puede controlarse con un sistema automatizado de inyección de CO<sub>2</sub> a demanda fijando el pH óptimo como punto de consigna.

Nutrientes: la biomasa necesita tener disponibles distintos tipos de nutrientes para su crecimiento. Los macronutrientes forman parte de la estructura de la célula y se necesitan en mayor porcentaje (N, P, C, H, S...). Los micronutrientes son elementos que la célula necesita en pequeñas cantidades y que habitualmente forman parte de enzimas (Fe, Mn, Cu o Mo) (Rodríguez González y Serrano Luna, 2012). El nutriente más importante para las microalgas es el carbono, seguido del nitrógeno, que se incorpora como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o como amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía. Además, aparece en importantes intermediarios metabólicos y en moléculas estructurales como los fosfolípidos.

Oxígeno disuelto: la intensa fotosíntesis realizada durante el día en sistemas de cultivo puede aumentar los niveles de oxígeno disuelto en el medio. Una elevada saturación puede afectar la productividad de algas: en 2001 Molina *et al.* determinaron que a una saturación del 200% existe una reducción del 17% en la productividad. Debe configurarse un adecuado sistema de desorción de oxígeno del sistema de forma que se garantice que el oxígeno disuelto se encuentre siempre por debajo de 250%Sat., teniendo en cuenta que en un cultivo externo los valores máximos se alcanzan alrededor del mediodía solar.

## **1.2.4 Aplicaciones de las microalgas**

Las microalgas han despertado un enorme interés en los últimos años debido a su rápido crecimiento en comparación con las plantas superiores y a la interesante composición de su biomasa. Presentan una gran capacidad de generación de biomasa de composición compleja que puede ser modulada mediante las condiciones de cultivo, por ejemplo, modificando la irradiancia incidente, los ciclos luz-oscuridad, la temperatura de cultivo, o la concentración de ciertos nutrientes con el fin de aumentar la producción de ácidos grasos poliinsaturados, pigmentos (clorofilas o carotenoides), proteínas, enzimas antioxidantes, exopolisacáridos, polialcoholes u otros diversos compuestos bioactivos. A partir de ellas se pueden obtener productos de alto valor en la nutrición y salud humana y animal, acuicultura, cosméticos, etc. y productos de bajo valor añadido como biocombustibles

### **1.2.4.1 Producción de biocombustibles**

La disminución de los recursos petroleros, junto con el aumento de la demanda de los mismos han llevado a diferentes profesionales a buscar nuevas fuentes renovables de biocombustibles, tales como biodiesel y bioetanol, productos de bajo valor derivados de la agricultura. Es importante destacar que los biocombustibles no son la solución definitiva a los problemas energéticos, ambientales y económicos que nuestro planeta sufre. Pero son una fuente alternativa de energía, complementaria de las tradicionales a corto, y con muchos rasgos prometedores a largo plazo, en el que la primera gran incógnita es cómo evolucionarán los combustibles fósiles, que hoy en día constituyen la base para la economía a nivel mundial (Ramos *et al.*, 2016).

Las microalgas se consideran una buena alternativa a los cultivos tradicionales para la producción de biocombustibles debido a su alta velocidad de crecimiento y al hecho de no competir por suelos cultivables ni fuentes de agua (Valdés Santiago *et al.*, 2018). Así se da el salto desde los biocombustibles de segunda generación a los de tercera generación. La producción de biodiesel a partir de microalgas ha tenido un papel muy importante, ya que pueden producir grandes cantidades de triacilglicerolos (20-50% en peso de células secas), como materia prima para biodiesel (Kim *et al.*, 2010). Además, a partir de los carbohidratos presentes en la biomasa se pueden obtener bioalcoholes, como apuntan Kim *et al.* (2010). Por último, la biomasa residual puede someterse a un proceso de digestión anaerobia para obtener biogás.

### **1.2.4.2 Producción de biofertilizantes, bioestimulantes y biopesticidas**

Durante las últimas décadas, se han utilizado desmesuradamente fertilizantes químicos que generan el empobrecimiento del suelo y agotan los cultivos, motivo por el que se han investigado tecnologías alternativas. De este modo surgen los biofertilizantes, que pueden ser derivados de organismos vivos o los organismos en sí. Los biofertilizantes constituyen una alternativa más ecológica, rentable y sostenible a los

fertilizantes sintéticos, ya que además de mejorar los cultivos disminuyen la contaminación ambiental, pues son productos que mejoran las propiedades del suelo y estimulan el desarrollo de las plantas (Carvajal Proaño, 2017). Así, las microalgas pueden ser fuentes de este tipo de productos. Los bioestimulantes usados en agricultura derivados de microalgas basan su éxito en la presencia de pequeñas cantidades de compuestos activos para el metabolismo vegetal, con el fin de ahorrarle a la planta gastos energéticos innecesarios en momentos de estrés (Mera *et al.*, 2020). Los biopesticidas microbianos, los cuales pueden ser microorganismos completos o metabolitos producidos por los mismos con propiedades antibióticas, son una opción para reemplazar los pesticidas químicos, que tienen efectos negativos sobre la salud humana, entre ellos, inducción de cáncer, enfermedades neurológicas, diabetes, enfermedades respiratorias o fetales y desórdenes genéticos. Debido a esto, es necesario desarrollar alternativas ecológicas para el control de plagas para agricultura que aseguren la producción de alimentos (Valdés Santiago *et al.*, 2018).

#### **1.2.4.3 Industria alimentaria, farmacéutica y cosmética**

Recientemente se han desarrollado multitud de productos basados en microalgas o en extractos obtenidos a partir de las mismas centrados en alimentación humana o animal, nutracéuticos, cosmeceúticos, etc. En algunos trabajos, como el de Cerón García (2013) se menciona que las microalgas han desarrollado un relevante papel en la industria alimentaria (alimentación humana o piensos para el ganado) y en la industria farmacéutica y cosmética, debido al hecho de que muchos consumidores buscan productos más naturales con beneficios para la salud. También se emplean desde hace décadas en acuicultura para mejorar la salud y aspecto de los peces y para biorremediación, gracias a su capacidad quelante, motivo por el que se emplean para el tratamiento de aguas residuales.

Los extractos de microalgas se pueden encontrar principalmente en productos para el cuidado de la piel, siendo las principales especies utilizadas *Arthrospira* y *Chlorella* (Stolz y Obermayer, 2005). Las microalgas también son utilizadas para productos de protección solar y cuidado del cabello (Spolaore *et al.*, 2006). Según Spolaore *et al.* (2006) las microalgas son capaces de mejorar el contenido nutricional de los alimentos y, por lo tanto, afectar positivamente la salud de los seres humanos y los animales. Esto se debe a su composición química con un alto contenido proteico y con presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Algunos de los PUFAs más interesantes obtenidos a partir de las microalgas son:  $\gamma$ -Ácido linolénico (GLA) producido por *Arthrospira*; Ácido araquidónico (AA), producido por *Porphyridium*; Ácido docosahexanoico (DHA) producido por *Cryptocodinium* o *Schizochytrium*; y Ácido eicosopentanoico (EPA) producido por *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum* o *Nitzschia*. Todos ellos se utilizan como suplemento nutricional. EPA y DHA se utilizan además en la acuicultura. También presentan pigmentos como la clorofila (0.5-1% de peso seco) o los carotenoides (0.1-0.2% de peso seco en promedio y hasta 14% de seco para el  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella*), antioxidantes de gran interés. Los principales carotenoides utilizados comercialmente son:  $\beta$ -caroteno, astaxantina y, de menor importancia, luteína, zeaxantina, licopeno y bixina (Del Campo *et al.*, 2000). Sus usos más importantes son colorantes naturales de alimento y aditivo para piensos. La relevancia nutricional y terapéutica de ciertos carotenoides se debe sobre todo a su capacidad para actuar como provitamina A (García González *et al.*, 2005; Gouveia y Empis, 2003). Los carbohidratos de las microalgas se pueden encontrar en la forma de almidón, glucosa, azúcares y otros polisacáridos. Su digestibilidad es alta, por lo que no hay limitación en usar microalgas enteras secas en alimentos o piensos (Becker, 2004).

### 1.2.5 Características de *Chlorella vulgaris*

De entre las microalgas existentes, en este trabajo se ha seleccionado la microalga verde unicelular *Chlorella vulgaris* para estudiar su crecimiento y su capacidad de depuración de aguas residuales. Se trata de uno de los protistas fotosintéticos más populares, perteneciente a la siguiente clasificación científica: Dominio: *Eukaryota*, Reino: Protista, División: *Chlorophyta*, Clase: *Trebouxiophyceae*, Orden: *Chlorella*, Familia: *Chlorella*, Género: *Chlorella*. (Céspedes Bernal, 2019). Tiene una alta velocidad de crecimiento (Canovas *et al.*, 1996) y exhibe un gran potencial en tratamiento de aguas residuales. *C. vulgaris* puede tolerar las condiciones ambientales rigurosas que se encuentran en las aguas residuales y asimilar eficientemente nitrógeno y fósforo presentes en ellas (Pittman *et al.*, 2011).

*Chlorella vulgaris* se descubrió en 1890 como la primera microalga con un núcleo bien definido. El nombre *Chlorella* proviene de la palabra griega “*chloros*”, que significa verde, mientras que el sufijo se refiere a su tamaño microscópico. Es una microalga sin flagelo que crece en agua dulce y ha estado presente en la tierra desde hace 2500 millones de años. Desde entonces, su integridad genética se ha mantenido constante (Krienitz *et al.*, 2015; Safi *et al.*, 2014, como citó Céspedes Bernal, 2019). Esta es considerada una microalga termotolerante (Trivedi *et al.*, 2019, como citaron de Oliveira *et al.*, 2019), y normalmente incluye 14-22% de lípidos, 51-58% de proteínas, 12-17% de carbohidratos y 4-5% de ácidos nucleicos (Kim *et al.*, 2010).

Morfológicamente es una célula esférica de 2-10  $\mu\text{m}$  de diámetro, y contiene los pigmentos verdes fotosintetizadores clorofila a y clorofila b en su cloroplasto (Navinta Huashuayo, 2019). La especie *Chlorella* ha sido ampliamente utilizada con las siguientes aplicaciones: salud, nutrición humana y animal, cosméticos, biocombustibles o aditivos de alimentación (Santos Montes *et al.*, 2014). Por ejemplo, *Chlorella* sp. ha mostrado una buena capacidad de producción de carotenoides, que tienen múltiples aplicaciones en el sector de la industria alimentaria, farmacéutica, nutracéutica, sanitaria y cosmética, debido a su alto valor comercial (Rajesh *et al.*, 2017).

## 1.3 Depuración de aguas residuales mediante cultivos de microalgas

Las microalgas requieren nitrógeno, fósforo,  $\text{CO}_2$ , luz y una serie de micronutrientes para su crecimiento. Puesto que, como se ha mencionado, las aguas residuales urbanas son ricas en nitrógeno y fósforo, el cultivo de microalgas en ellas permitiría eliminar estos contaminantes mediante su incorporación a la biomasa microalgal. Concretamente para *C. vulgaris*, más del 64% del nitrógeno total es reciclado en forma de biomasa (He *et al.*, 2013). La indudable habilidad de las microalgas para eliminar nitrógeno y fósforo inorgánico hace que puedan ser utilizadas como una herramienta de biorremediación para el tratamiento de aguas residuales, siendo considerada una práctica económica y prometedora (Ledda *et al.*, 2015). Los tratamientos microalgales ofrecen una opción poco costosa para la eliminación de nutrientes mediante tratamiento terciario (Tang *et al.*, 2011). En sistemas convencionales los tratamientos terciarios tienen el propósito de eliminar compuestos como el amonio, los nitratos y los fosfatos, lo que incrementa hasta cuatro veces el coste en comparación con un tratamiento primario. El tratamiento de aguas residuales asistido por microalgas puede proporcionar beneficios, como un aumento en el oxígeno disuelto debido a la fotosíntesis microalgal, una reducción en la población de bacterias patógenas y la eliminación de metales

pesados (Molazadeh *et al.*, 2019) y de algunos compuestos orgánicos tóxicos (Romero Villegas, 2018), reduciendo el riesgo de contaminación secundaria (de la Noüe y Bassères, 1989). El biotratamiento de aguas residuales con microalgas (ficorremediación) para la eliminación de nitrógeno y fósforo fue propuesta a finales de los años 50 por William Oswald (Oswald y Gotass, 1957).

La producción de microalgas requiere el aporte de agua y de elementos (N, C, P, Mg o S) que normalmente son suministrados en forma de fertilizantes. El empleo de agua dulce y fertilizantes puede suponer entre un 10 y un 50% del coste de producción de la biomasa de microalgas (Acién Fernández *et al.*, 2012). Este coste puede evitarse si se utiliza agua residual para la producción de microalgas, ya que estas están cargadas de nutrientes que pueden ser consumidos por las microalgas, contribuyendo así a generar un efluente depurado. Además, las normativas de vertido de aguas residuales son cada vez más estrictas, por lo que es necesario desarrollar nuevas técnicas de depuración que sean más eficientes y sostenibles (Gómez Serrano *et al.*, 2015).

Los sistemas de depuración de aguas pueden clasificarse en convencionales o naturales. Los sistemas convencionales son los más utilizados en depuración de aguas residuales urbanas, sobre todo en grandes núcleos de población, y presentan la ventaja de que requieren poca superficie. Sin embargo, presentan la desventaja de que se requiere un consumo elevado de energía con el fin de degradar materia orgánica mediante los procesos aerobios en los que se basan las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales. Se ha visto que la biorremediación de aguas residuales mediante microalgas consume mucha menos energía que los sistemas convencionales:  $0.52 \text{ MJ/m}^3$  versus  $3.6 \text{ MJ/m}^3$  (Ledda *et al.*, 2015). Por tanto, las microalgas tienen un papel muy importante en los procesos de depuración debido al descenso de los costes (Morales Amaral, 2016). Los sistemas naturales o sistemas de lagunas son una alternativa más económica y sostenible, ya que utilizan recursos ambientales como la luz solar, y el proceso de depuración es realizado por bacterias, algas, y vegetación y fauna propia del medio (García *et al.*, 1998). Además, la biomasa producida mediante microalgas es rica energéticamente, y puede ser posteriormente procesada para producir biocombustibles, biofertilizantes, biopolímeros, bioplásticos o colorantes de alimentos naturales, como se mencionó en el apartado sobre aplicaciones de las microalgas.

Las microalgas más utilizadas en los procesos de tratamiento de aguas residuales son los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, aunque las cepas *Muriellopsis* y *Botryococcus* también han sido probadas (Gómez Serrano *et al.*, 2013; Sutherland *et al.*, 2014). En realidad, no hay cepas utilizadas específicamente en el tratamiento de aguas residuales, sino que cualquier cepa que combine alta productividad de biomasa y tolerancia a las condiciones adversas al aire libre puede ser utilizada. La tolerancia de una cepa a unas aguas residuales particulares utilizadas como medio de cultivo debe verificarse. Además, identificar las cepas más productivas y eficientes puede mejorar el proceso, el rendimiento y la fiabilidad. Para ello, además de la productividad y la composición bioquímica, otras propiedades celulares como el peso celular, la eficiencia de la utilización de la luz y los requerimientos de nutrientes deben tenerse en cuenta (Gómez Serrano *et al.*, 2013).

A la hora de realizar la depuración de aguas mediante microalgas, ha de tenerse en cuenta que lo normal será que se presente un consorcio de microalgas y bacterias estableciéndose una relación simbiótica: las microalgas consumen  $\text{CO}_2$  y los compuestos minerales producidos por las bacterias a través de la degradación aeróbica de la materia orgánica, produciendo oxígeno fotosintético, que es necesario para que

estas bacterias lleven a cabo esta degradación (Figura 3). La simbiosis entre los cultivos de microalgas y bacterias procedentes de fangos activos aumentan la capacidad de depuración del sistema (Olguín, 2012). La utilización de microalgas ha demostrado ser eficiente en la reducción de DBO y DQO gracias a ese aporte de oxígeno a las bacterias aeróbicas que ayudan a la biotransformación (Hernández Pérez y Labbé, 2014).

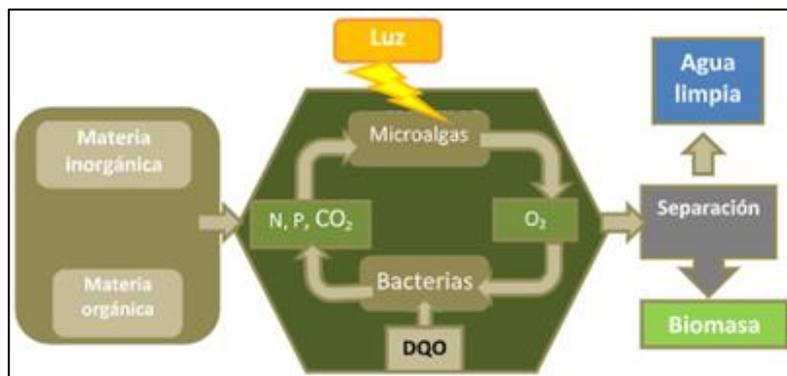


Figura 3. Mecanismo de acción para consorcios microalgas-bacterias en aguas residuales (Morales Amaral, 2016).

### 1.3.1 Suplementación del medio de cultivo con lixiviados

A la hora de cultivar microalgas, a menudo no basta con aportar directamente agua residual procedente de un tratamiento primario o secundario (que tiene contenidos relativamente bajos de N y P), sino que es necesario suplementarla con más nutrientes. Para ello, es conveniente suplementarla con lixiviado, pues es una fuente rica en nutrientes que puede sustituir a los fertilizantes químicos, los cuales incrementan los costes de producción y disminuyen la sostenibilidad medioambiental del proceso global (Ledda *et al.*, 2015). Es decir, el uso de lixiviado es un método eficaz para reducir el coste de producción de microalgas y aumentar la sostenibilidad, logrando altas productividades y elevadas tasas de eliminación de nutrientes, siempre y cuando se usen cepas adecuadas, y el sistema opere adecuadamente.

No obstante, el lixiviado puede contener también compuestos que inhiban el crecimiento de los cultivos como urea, ácidos orgánicos, fenoles y pesticidas, que a altas concentraciones podrían tener efectos adversos, y limitar el uso de estos efluentes en el proceso (Ledda *et al.*, 2015). Por este motivo, es necesario optimizar la cantidad de lixiviado con la que resulta ideal suplementar el medio en el que se cultiven las microalgas. Por ejemplo, el contenido en nitrógeno del lixiviado suele ser elevado y es por ello necesario diluir el lixiviado, ya que normalmente el nitrógeno está en forma de amonio y puede inhibir el crecimiento a concentraciones elevadas (Ledda *et al.*, 2015). Las concentraciones de nitrógeno y fósforo, en ningún caso pueden ser mayores que los límites de inhibición, estando la inhibición por amonio a concentraciones mayores de 100 mg/L, para muchas cepas de microalgas (Ledda *et al.*, 2015).

Según Morales Amaral *et al.* (2015), las microalgas son especialmente sensibles a altas concentraciones de amonio y altos valores de pH, ya que por encima de pH 9 la mayoría de los iones amonio están en forma de  $\text{NH}_3$  que desacopla el transporte de electrones en el fotosistema II y compite con el agua en las reacciones de oxidación que conducen a la generación de  $\text{O}_2$ . En dicho estudio se comprobó que *Chlorella sorokiniana* fue completamente inhibida a una concentración total de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  de 15 mM (250 mg/L) y pH 8.7 en un fotobiorreactor de tipo columna de burbujeo de 50 L. Este valor es similar al obtenido en el estudio de Ledda *et al.* (2015), en el que *C. sorokiniana* fue completamente inhibida a una concentración de amonio

de 210 mg/L. Goto *et al.* (2018) comprobaron que el crecimiento de *C. vulgaris* se inhibió a una concentración de amonio de 239 mg/L a un pH de 8.5. El uso de microalgas tolerantes a NH<sub>3</sub>, como *C. sorokiniana*, puede aumentar la estabilidad del proceso.

Por otra parte, *C. vulgaris* puede acumular fósforo intracelularmente hasta concentraciones de 0.5 M, de manera que pueden utilizar sus reservas en un medio sin fósforo (Arce Portugal, 2018).

Otro factor clave, además de la adecuada concentración de N y P en el medio, es el cociente N:P, tanto en el lixiviado como en el medio de cultivo. Los experimentos de Molazadeh *et al.* (2019) revelaron que una relación N:P de 10 fue el cultivo más productivo para *C. vulgaris*, generando la concentración máxima de biomasa con un valor de 0.79 g/L, una velocidad de crecimiento específica de 0.42 1/día, una productividad de biomasa de 0.085 g/(L·día) y una tasa de biofijación de CO<sub>2</sub> de 0.143 g/(L·día).

## 2. OBJETIVO Y PLAN EXPERIMENTAL

El presente trabajo se llevó a cabo en el centro IFAPA (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera de Andalucía) de Almería bajo el convenio de colaboración con la Universidad de Almería. El objetivo general de este trabajo fue estudiar a escala de laboratorio el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* a la par que analizar su capacidad de depuración de nitrógeno y fósforo de aguas residuales urbanas con distinta composición.

Inicialmente estaba previsto realizar dos series experimentales, tal como se detalla a continuación. No obstante, debido a la crisis provocada por el SARS-Cov-2, y al amparo de los cambios propuestos por la Comisión Académica del Grado en Biotecnología de la Universidad de Almería, la segunda serie experimental ha quedado elaborada como “resultados esperables” considerando la hipótesis de trabajo y los resultados obtenidos por otros autores.

### 2.1 Análisis de crecimiento de la microalga y la depuración de agua en cuatro medios diferentes

El propósito de la primera serie experimental es estudiar el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y su capacidad de depuración utilizando agua residual de distinta procedencia: se pretende comparar el agua residual de secundario obtenida en una EDAR convencional (EDAR El Bobar) con el efluente de un reactor raceway con cultivo de microalgas alimentado con agua residual de primario. Es decir, agua residual de secundario obtenida mediante dos tratamientos alternativos. El objetivo es comprobar si ambos efluentes son similares y si la microalga se comporta de manera similar en ambos. Además, también se realizó un ensayo suplementando el agua residual con lixiviado para conseguir un mayor aporte de nutrientes, puesto que el contenido en N y P de las aguas de secundario suele ser bajo respecto de los requerimientos que tiene un cultivo de microalgas. Los datos serán comparados con un ensayo control donde se cultiva la microalga con medio de cultivo Arnon (Arnon *et al.*, 1974) modificado. Así, los cuatro ensayos propuestos se realizaron con los siguientes medios:

- Control: medio de cultivo estándar, medio Arnon modificado (suplementado en nitrato).
- Agua residual de secundario obtenida de EDAR.
- Agua residual de secundario obtenida de reactor raceway (RW).
- Agua residual de secundario obtenida de RW suplementada con lixiviado.

### 2.2 Optimización del aporte de lixiviados al medio

En la segunda serie experimental se pretendía optimizar el aporte de lixiviado al medio con objeto de maximizar la productividad de biomasa a la vez que la depuración del mismo. Para ello, se había propuesto realizar cuatro ensayos: un control, igual a la primera serie experimental, y tres ensayos con distintos aportes de lixiviado. Como ya se ha comentado, se hará una revisión bibliográfica al respecto debido a la imposibilidad de realización de estos ensayos por la crisis Covid-19.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Microorganismo y sistema de cultivo

La microalga utilizada fue *Chlorella vulgaris* (Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection, Hungary). Esta se inoculó con un 10% en volumen en un sistema de 12 columnas de burbujeo de vidrio de 3 cm de diámetro y 45 cm de altura, con un volumen de operación de 250 ml (Figura 4). Disponen de una varilla de vidrio que llega hasta el fondo para suministrar burbujeo de aire a 0.2 v/(v·min) que proporciona la mezcla del cultivo y ayuda a la retirada de O<sub>2</sub>. El aporte de CO<sub>2</sub> se hace a demanda mediante un sistema de control que lo inyecta cuando el pH supera la consigna impuesta de 8.0. La temperatura se mantuvo en 25°C. La iluminación se realizó mediante 8 lámparas fluorescentes de encendido y apagado progresivo para simular el ciclo circadiano, con una irradiancia promedio incidente de 2622  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ .



Figura 4. Sistema de columnas de burbujeo en interno.

Respecto al modo de operación de los fotobiorreactores, durante este trabajo se realizó, en primer lugar, un cultivo en modo discontinuo para estudiar el crecimiento de la microalga en los distintos medios: concentración de biomasa alcanzada al final de la fase de crecimiento exponencial, productividad de biomasa y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Seguidamente, se procedió al cultivo en modo semicontinuo a una velocidad de dilución de 0.3 1/día para simular las condiciones de operación reales en una planta a mayor escala. Esto implicaba sustituir cada día 75 ml de cosechado por medio de cultivo fresco.

En cuanto al medio de cultivo, se comparó el crecimiento de la microalga en cuatro medios diferentes:

- Control: medio de cultivo Arnon suplementado en nitrato (Tabla 3).
- SWW: efluente obtenido tras el tratamiento secundario de agua residual en la Estación Depuradora de Aguas Residuales El Bobar (Almería, España).
- SWW-RW: efluente obtenido tras la realización de un tratamiento secundario de agua residual de primario mediante microalgas cultivadas en un raceway externo de 11200 L (IFAPA, Almería).
- SWW-RW-C: efluente anterior suplementado en un 10% en volumen con lixiviado obtenido de la EDAR El Bobar.

La Tabla 3 muestra la composición del medio Arnon suplementado en nitrato. Para preparar 5 L de medio de cultivo se llevan a cabo los siguientes pasos. Para preparar la disolución Arnon A se añade 1 ml de las disoluciones Stock 2 a 8, y 10 ml de la disolución 1 (nitrato sódico 85 g/L) en un matraz aforado de un volumen de 1 L, enrasando con agua destilada. Por otra parte, se prepara la disolución Arnon B. Para ello, en otro matraz aforado se vierte 1 ml de  $K_2HPO_4$  o disolución 9 por cada litro de medio de cultivo, y se enrasa con agua destilada hasta un volumen de 4 L. Ambas disoluciones se esterilizan en autoclave a 121°C durante 30 minutos en dos botellas separadas para evitar la aparición de precipitados de fosfato. Tras ello, cuando ambas disoluciones, A y B, se encuentren a temperatura ambiente, se mezclan en ambiente estéril, en campana obteniendo así un volumen total de 5 L de medio de cultivo.

Tabla 3. Medio Arnon modificado de Arnon et al. (1974).

Disolución	Nomenclatura disoluciones	Disoluciones Stock a preparar		V disolución/ L medio de cultivo	
Arnon A	1	NaNO <sub>3</sub> 1M (85 g/L)		10 ml	
	2	NaVO <sub>3</sub> (0.239 g/L)		1 ml	
	3	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (1.26 g/L)		1 ml	
	4	D7	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (2.82 g/L)		1 ml
			MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O (1.81 g/L)		
			ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (0.222 g/L)		
			CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O (79 mg/L)		
			CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O		
5	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (124 g/L)		1 ml		
6	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (15 g/L)		1 ml		
7	NaCl (117 g/L)		1 ml		
8	Solución Fe-EDTA	Disolver 16 g EDTA y 10.4 g KOH en 186 ml H <sub>2</sub> O		1 ml	
		Disolver 13.7 g FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O en 364 ml H <sub>2</sub> O			
		Mezclar ambas soluciones y burbujear 24h			
Arnon B	9	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M (174 g/L)		1 ml	

### 3.2 Toma de muestras y análisis del cultivo

La evaporación de agua se compensaba cada día antes de proceder a la toma de muestras, la cual se realizaba en campana de flujo laminar y siempre a la misma hora. Una vez tomada la muestra, se procedía a realizar los siguientes análisis:

- Concentración de biomasa

Para determinar el crecimiento de los cultivos mencionados anteriormente en los diferentes fotobiorreactores se midió diariamente la absorbancia a 750 nm mediante espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-VIS), pudiendo determinar la concentración de biomasa mediante cuatro curvas de calibrado: para el control (Ecuación 13), para SWW (Ecuación 14), para SWW-RW (Ecuación 15) y para SWW-RW-C (Ecuación 16), siendo FD el factor de dilución aplicado a las muestras. No obstante, la

estimación de concentración de biomasa por espectrofotometría fue validada mediante peso seco, para lo que se filtraron 40 ml de cultivo en un filtro Whatman con un diámetro de poro de 1  $\mu\text{m}$  previamente pesado. Estos filtros se secaron durante 24 h en una estufa a 80°C y posteriormente, se pesaron nuevamente, permitiendo así obtener el peso seco de biomasa en g/L.

$$Cb \left( \frac{g}{L} \right) = 0.6628 \cdot Abs_{750} \cdot FD \quad R^2 = 0.9587 \quad [11]$$

$$Cb \left( \frac{g}{L} \right) = 0.5667 \cdot Abs_{750} \cdot FD \quad R^2 = 0.9880 \quad [12]$$

$$Cb \left( \frac{g}{L} \right) = 0.5473 \cdot Abs_{750} \cdot FD \quad R^2 = 0.9767 \quad [13]$$

$$Cb \left( \frac{g}{L} \right) = 0.5793 \cdot Abs_{750} \cdot FD \quad R^2 = 0.9835 \quad [14]$$

- Estado fisiológico de la célula

El estado fisiológico de las células de cada uno de los cultivos es determinado diariamente por la cuantificación de la fluorescencia de las clorofilas (Fv/Fm), lo que muestra la actividad del aparato fotosintético. Es decir, se mide el rendimiento fotosintético óptimo (Fv/Fm), mediante un fluorímetro. Para ello, se introducen 2 ml de cultivo en una cubeta, se somete a 15 min de oscuridad y se mide en un fluorímetro (AquaPen AP 100, Photon System Instruments, República Checa).

- Observación morfológica

Al comienzo y al final de cada ensayo se realizó un estudio del estado del cultivo y la morfología celular por microscopía óptica a diferentes aumentos (x 10 y x 40), con el microscopio LEICA DM500 (Alemania) con cámara LEICA ICC50 W (Alemania). De esta manera, se comprueba que se mantiene un cultivo monoalgal y no han crecido especies no deseadas.

### 3.3 Análisis de nutrientes

Tanto el medio de cultivo empleado en cada ensayo, como el sobrenadante obtenido tras el cosechado de las muestras de cada fotobiorreactor se analizaron en cuanto a contenido en amonio nitrato, amonio y fosfato. Estos ensayos se realizaron con los sobrenadantes obtenidos el último día tanto del ensayo en discontinuo (al comenzar la fase estacionaria) como del ensayo en semicontinuo (estado estacionario). Se utilizaron los métodos oficiales estándar aprobados por el Ministerio de Agricultura de España (1982) para analizar el agua de entrada y de salida de los fotobiorreactores.

- Nitrato

En un matraz de 50 ml se introducen 0.5 ml de muestra (previamente filtrada) y 2.5 ml de HCl al 37% v y se enrasa con agua destilada. Se agitan los matraces y se mide la absorbancia en espectrofotómetro a 220 y 275 nm usando una cubeta de cuarzo. Posteriormente, se calcula la concentración de nitrato empleando la siguiente recta de calibrado:

$$C_{nitrato} \left( \frac{mg}{L} \right) = (Abs_{220} - 2 \cdot Abs_{275}) \cdot 1638 \cdot FD \quad R^2 = 0.9998 \quad [15]$$

- Amonio

En un matraz aforado de 25 ml se introduce 1 ml de la muestra (previamente filtrada) y se añade 1 ml de tartato sódico al 20% v y 1 ml de reactivo Nessler. Posteriormente, se enrasa con agua destilada y se agitan los matraces. Pasados 15 min, se mide la absorbancia en espectrofotómetro a 410 nm usando una cubeta de cristal. Seguidamente se calcula la concentración de amonio (mg/L) empleando la siguiente recta de calibrado:

$$C_{amonio} \left( \frac{mg}{L} \right) = 0.0066 \cdot Abs_{410} \cdot FD \quad R^2 = 0.9984 \quad [16]$$

- Nitrógeno total

Una vez analizado el contenido en nitrato y en amonio de las muestras, se calcula el contenido en nitrógeno total como la suma de la contribución del nitrógeno presente en ambas moléculas.

- Fosfato

Para medir la concentración de fosfato se emplea un matraz aforado de 25 ml en el cual se introducen 1 ml de muestra (previamente filtrada), 1 ml de una disolución de hidroquinona (0.25 g en 50 ml de agua ultrapura), 1 ml de sulfito sódico al 20% v, y 1 ml de una disolución de molibdato amónico (12.5 g de molibdato amónico, 37.5 ml de ácido sulfúrico al 96% v, y se enrasa hasta 250 ml con agua ultrapura). Los matraces se enrasan con agua ultrapura y se agitan. Pasados 30 min, se mide la absorbancia en espectrofotómetro a 430 nm usando una cubeta de cristal. Posteriormente, se calcula la concentración de fosfato empleando la siguiente recta de calibrado:

$$C_{fosfato} \left( \frac{mg}{L} \right) = 0.0005 \cdot Abs_{430} \cdot FD \quad R^2 = 0.9960 \quad [17]$$

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis de crecimiento de la microalga y la depuración de agua en cuatro medios diferentes

El crecimiento de la microalga se estudió en cuatro medios de cultivo diferentes operando los fotobiorreactores primero en modo discontinuo y, a continuación, en modo semicontinuo. Paralelamente se ha analizado el consumo de nutrientes por la microalga depurando de esta forma el medio aportado. *Chlorella* sp. tiene alta eficiencia de eliminación (superior a 80%) de nutrientes en los efluentes del tratamiento primario y secundario de aguas residuales urbanas (Lau *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2010). La adaptación de *Chlorella* sp. a altas concentraciones de nutrientes conduce a su aplicación en el tratamiento de aguas residuales (Borowitzka, 1999). Esta microalga ha sido elegida porque puede asimilar eficientemente nitrógeno y fósforo (Pittman *et al.*, 2011) a la vez que tolera altos niveles de CO<sub>2</sub> y otras condiciones ambientales adversas (Molazadeh *et al.*, 2019).

#### 4.1.1 Cultivo discontinuo

##### 4.1.1.1 Crecimiento del microorganismo

###### Concentración de biomasa y productividad de biomasa

La concentración de biomasa experimentó un aumento con los días para todos los medios ensayados (Figura 5 a). Para el día 7 de cultivo todos los cultivos habían alcanzado una concentración cercana a 1.0 g/L. Para el día 11 se produjo un importante incremento de la concentración en el ensayo llevado a cabo con medio suplementado en lixiviado (SWW-RW-C) acercándose a los 2.0 g/L, valor muy superior al ligero aumento observado en el control (1.12 g/L). Cabe destacar que los valores alcanzados empleando el efluente de la EDAR (SWW) y el efluente del raceway (SWW-RW) son similares, lo que nos lleva a pensar que el tratamiento secundario realizado mediante sistemas de producción de microalgas (donde se dispone de consorcios microalgas-bacterias) ofrece un efluente de similares características al obtenido mediante los procesos convencionales llevados a cabo en una EDAR. Con respecto a la productividad de biomasa (Figura 5 b), el control presentó la menor productividad, 0.26 g/(L·día). Los cultivos en SWW y SWW-RW presentan productividades similares entre ellos: 0.35 g/(L·día) y 0.30 g/(L·día), respectivamente. Se puede observar que el medio de cultivo más productivo fue SWW-RW-C, alcanzando un valor de 0.40 g/(L·día). Estos resultados son los esperables: la adición de lixiviado supone un aporte mayor de nutrientes en el medio, que permite que la microalga pueda alcanzar una mayor concentración de biomasa en el mismo tiempo con respecto al empleo de medios no suplementados. Los bajos valores alcanzados al final del ensayo empleando el control (Arnon) con respecto al medio suplementado en lixiviado han de estar relacionados con el mayor agotamiento de nutrientes en el caso del Arnon. Así, si vemos las gráficas aportadas en el apartado 4.1.1.2 sobre consumo de nutrientes, podemos ver cómo al final el cultivo llevado a cabo con medio Arnon había consumido prácticamente todo el N y el P aportados.

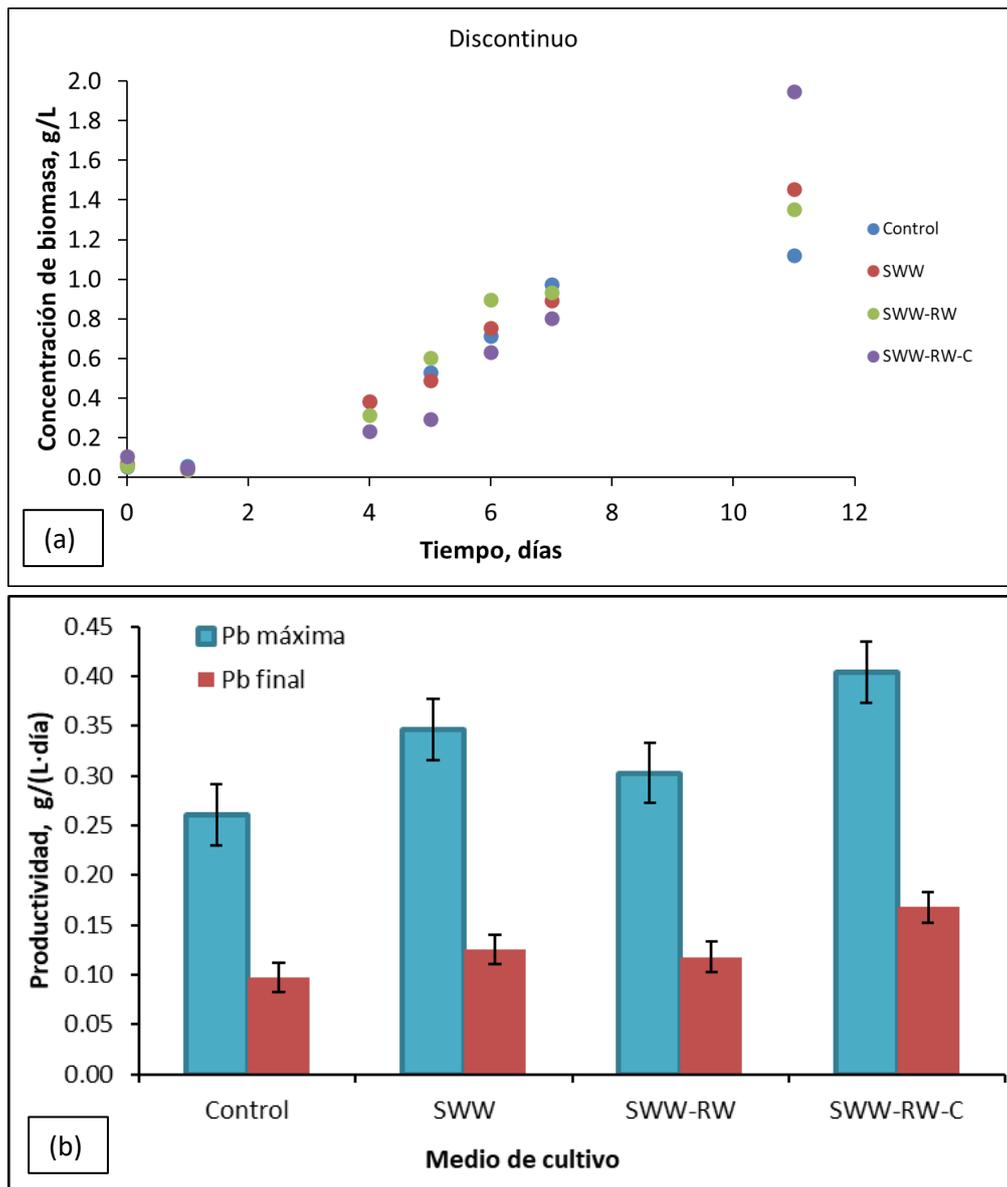


Figura 5. Evolución de la concentración de biomasa con el tiempo en el cultivo discontinuo (a) y productividad de biomasa máxima y final (día 11) (b) alcanzada para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

Si se lleva a cabo una comparación con otros autores, se puede ver que Wong *et al.* (2017) en experimentos en discontinuo con *C. vulgaris* en medio Bold Basal durante 12 días en un estanque de 6 L obtuvieron una concentración de biomasa de 0.9 g/L, siendo este valor ligeramente inferior al obtenido utilizando medio Arnon modificado en el presente estudio. La productividad de biomasa promedio fue de 0.0716 g/(L·día), (calculada a partir de  $Pb = (Cb - Cbo)/t$ ). Si se comparan ambos medios, se puede observar que el medio Bold Basal contiene 0.0676 g de nitrógeno y 0.0532 g de fósforo (Wong *et al.*, 2017), mientras que el Arnon modificado contiene 0.0369 g de nitrógeno y 0.056 g de fósforo. Aunque el medio Bold Basal presente una mayor cantidad de nitrógeno, el crecimiento obtenido es algo menor debido a que en el experimento de Wong *et al.* (2017) la irradiancia incidente suministrada a los cultivos fue más baja (70  $\mu$ moles de fotones/( $m^2 \cdot s$ )).

Es importante destacar que toda la bibliografía encontrada respecto a crecimiento microalgal en agua residual es comparable no solo con el medio SWW, sino también con el medio SWW-RW. La diferencia entre ellos es principalmente que el agua residual de secundario procedente de la depuradora El Bobar es más rica en N de lo que habitualmente se espera para un afluente de un tratamiento secundario, si bien cumple con toda la legislación aplicable para su vertido. El resultado es que ese efluente (y el medio SWW-RW-C que está suplementado en lixiviado) es rico en nutrientes, e incluso comparable al medio Arnon.

El estudio de Chawla *et al.* (2020) realizado en discontinuo en vasos de 100 ml de cultivo y con una irradiancia incidente de 50  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , se centró en el potencial de cultivos de microalgas para la depuración de tres tipos de agua residual (no esterilizadas) con diferente procedencia: de una planta de tratamiento de aguas residuales, de una industria de procesamiento de lácteos y de un matadero. Se obtuvo para *C. vulgaris* una concentración de biomasa máxima de 0.78 g/L usando aguas residuales tratadas, lo que se corresponde con los medios SWW y SWW-RW. La diferencia de concentración y productividad de biomasa respecto al presente estudio se debe a que la composición del agua procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales es muy variable, no solo con el lugar de procedencia, sino incluso de un día para otro. Para el experimento de Chawla *et al.* (2020) el agua presentaba las siguientes concentraciones: 14 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 46.8 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 15.5 mg/L P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. Por su parte, el medio SWW utilizado en este trabajo presenta 2.8 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 77.7 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 5.1 mg/L P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. La razón por la que las microalgas crecieron más en el presente estudio es, probablemente, porque el N total disponible es mayor (80.5 mg/L frente a 60.8 mg/L).

Kim *et al.* (2010) cultivaron *C. vulgaris* en discontinuo utilizando como medio de cultivo agua residual de una planta de tratamiento, lo que es comparable los medios SWW y SWW-RW. En este experimento la fase de adaptación al agua residual fue de 24 h, mientras que en el presente trabajo fue algo más larga, 48h (Figura 5 a). Esta mayor duración de la fase lag puede ser debida a la acidez del agua que se utilizó, lo que al inicio pudo provocar cierto estrés a las células. Hernández (2010) concluyó que, al usar un efluente sin tratamiento, la microalga *C. vulgaris* precisa de un proceso de adaptación largo para comenzar la absorción de nutrientes. Sin embargo, al utilizar un efluente filtrado y desinfectado, *C. vulgaris* comienza la absorción de nutrientes a partir del segundo día de cultivo, como afirman Ramos y Pizarro (2018), lo que está en sintonía con lo observado aquí.

Kim *et al.* (2010) afirmaron que la concentración de *C. vulgaris* se incrementó hasta 0.13 g/L en el día 9 de cultivo, valor bastante menor que el obtenido durante este experimento, que sería aproximadamente 1 g/L en el día 9. Esta menor concentración de biomasa obtenida en el experimento de Kim *et al.* (2010) se puede atribuir al hecho de que el agua residual utilizada por este autor era escasa en nutrientes en comparación con el agua utilizada en el presente experimento. Prueba de ello es que el efluente de aguas residuales procedente de la planta contenía una concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de solamente 7.7 mg/L y 0.90 mg/L de fósforo total, existiendo una clara limitación por nutrientes.

En el estudio de Ge *et al.* (2018), los cultivos de *C. vulgaris* se realizaron en columnas de burbujeo de 2 L con una irradiancia promedio dentro del reactor de 75 a 120  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ . El crecimiento y la eliminación de nutrientes por *C. vulgaris* fueron optimizados en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas empleando el efluente de la digestión anaerobia en una planta de tratamiento de agua residual (esterilizado). Las condiciones mixotróficas promovieron un mayor crecimiento de biomasa (0.72

g/L en 12 días), siendo este valor menor que el obtenido en el presente estudio para el medio SWW-RW-C (1.95 g/L). Según este autor, al añadir glicerol en la fase exponencial tardía se generó la máxima productividad de biomasa, con un valor de 0.07 g/(L·día), en comparación con 0.17 g/(L·día) en este estudio. El crecimiento en el presente estudio fue mayor debido, probablemente, a disponer de una mayor irradiancia y un mayor aporte de nutrientes: en el presente estudio 154 mg/L de N total y 4.3 mg/L de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, en comparación con 80.3 mg/L de N total y 2.9 mg/L de fósforo.

#### Velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu$ máxima)

En cuanto a la velocidad específica de crecimiento máxima, se puede observar cómo el control presenta el menor valor de  $\mu$  máxima (0.62 1/día), mientras que SWW-RW-C presenta el mayor valor (0.76 1/día). Los valores de  $\mu$  máxima para los medios SWW y SWW-RW son prácticamente idénticos: 0.70 y 0.71 1/día. Estos resultados sugieren, como se ha explicado anteriormente, que estos dos medios aportan características similares en cuanto a crecimiento de la microalga y, por tanto, podrían ser utilizados indistintamente como medio de cultivo.

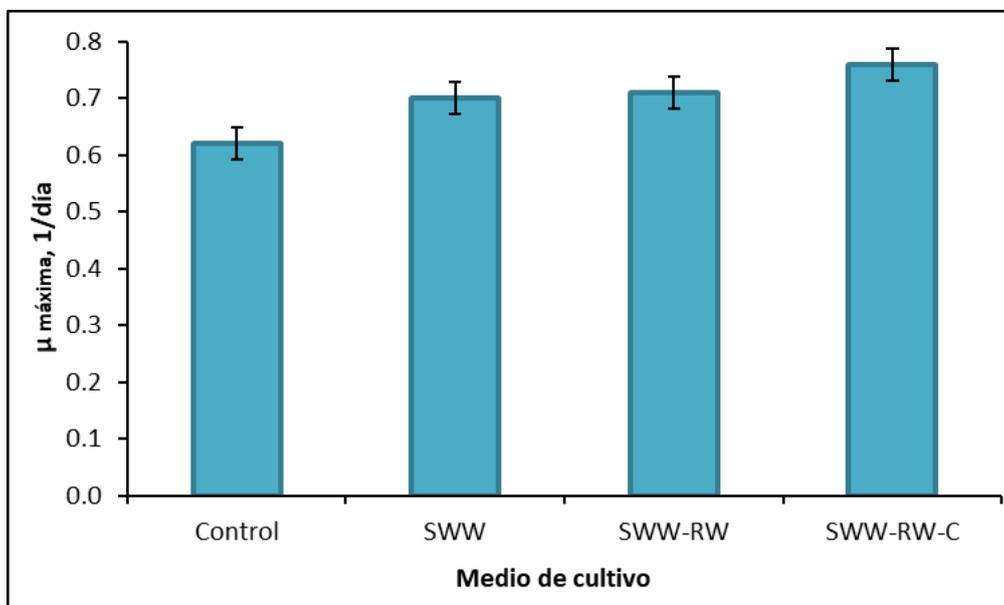


Figura 6. Velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu$  máxima) para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

En el estudio de Lim *et al.* (2010) observaron cultivando *C. vulgaris* durante 10 días en medio Bold Basal un valor de  $\mu$  máxima de 0.4 1/día, siendo este resultado menor al obtenido en este estudio con medio Arnon modificado (0.62 1/día). Esto probablemente se debe a que en el presente estudio la irradiancia suministrada a los reactores es mucho mayor; Lim *et al.* (2010) emplearon estanques de 40 L, en los que la irradiancia incidente tomó valores desde 135 hasta 1193  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ .

En el estudio de Ruiz-Marín *et al.* (2010) las cepas *C. vulgaris* y *S. obliquus* fueron cultivadas en discontinuo en biorreactores de 2.5 L de cultivo. Se cultivaron bajo 135  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , empleando medios artificiales por un lado, y aguas residuales urbanas, por otro. El agua residual artificial fue preparada simulando la cantidad en nutrientes del efluente de secundario procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales que contenía 2 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 32.5 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 2.5 mg/L P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. Los medios de cultivo

artificiales presentaron una mayor tasa de crecimiento (0.377 1/día para *C. vulgaris* y 0.401 1/día para *S. obliquus*), en comparación con cultivos en aguas residuales (0.186 1/día para *C. vulgaris* y 0.285 1/día para *S. obliquus*). Estos valores son menores que los aportados aquí para los medios SWW y SWW-RW debido a una menor disponibilidad de nutrientes, además de una menor irradiancia en el estudio de Ruiz-Marín *et al.* (2010), en comparación con este estudio.

En el experimento de Kim *et al.* (2010), realizado con agua residual procedente de una planta de tratamiento, no se especificó el valor de  $\mu$  máxima, para *C. vulgaris*, aunque este puede ser calculado, a partir de la pendiente de los valores de Cb *versus* tiempo. De esta manera, se calculó un valor de  $\mu$  máxima de 0.46 1/día, siendo este valor menor a los presentados en el presente estudio para los medios SWW y SWW-RW y debido a la baja disponibilidad de nutrientes ensayada (7.7 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

#### Rendimiento fotosintético (Fv/Fm)

Según Baker (2008) se puede definir Fv/Fm como la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (PSII). Su relevancia fisiológica radica en que es la máxima eficiencia a la cual se utiliza la luz absorbida por el PSII para reducir el electrón aceptor primario de la quinona del PSII. Según Campbell y Tyystjärvi (2012) un centro de PSII fotoinactivado pierde la capacidad de mediar la transferencia fotoquímica de electrones. Para la mayoría de los estudios de fitoplancton, el método preferido es monitorear los cambios en el rendimiento fotoquímico del PSII a lo largo del tiempo, midiendo el ratio variable de fluorescencia de la clorofila al máximo de fluorescencia. Bajo un conjunto de supuestos generales, el parámetro Fv/Fm es igual al máximo rendimiento fotoquímico del PSII (Butler, 1978). La medida de Fv/Fm funciona bien para plantas con sistemas de antena Chl *a/b* en los que la fluorescencia *in vivo* está dominada por la emisión de Chl *a* asociado con el PSII. Las diferencias taxonómicas en Fv/Fm pueden resultar de contribuciones a la fluorescencia mínima (F<sub>o</sub>) de pigmentos fuera del PSII. Debido a la fluorescencia de tales pigmentos, los valores medidos de Fv/Fm pueden resultar de la excitación y emisión de longitudes de onda (Simis, Babin, Huot, Metsamaa, Seppälä, como se citó en Campbell y Tyystjärvi (2012)).

El estudio del estado del aparato fotosintético es importante, ya que permite saber si el cultivo presenta estrés y, por tanto, saber si la capacidad fotosintética del cultivo se ve limitada. Si el cultivo presenta limitaciones fotosintéticas, su crecimiento se limitará y, además, el consumo de los nutrientes será ineficiente. Según Rizzo *et al.* (2014) los valores máximos de Fv/Fm fueron obtenidos en el rango de 0.70 a 0.72 en la ventana de 650-685 nm, donde estos valores son cercanos a aquellos que se obtienen en las clásicas técnicas de fluorescencia por inducción (Baker, 2008). Por tanto, se puede considerar que para valores cercanos a 0.70 el cultivo no presenta estrés en el aparato fotosintético.

En la Figura 7 se puede observar que los medios de cultivo SWW-RW-C y SWW estaban estresados al principio del ensayo (Fv/Fm de 0.4), mientras que el medio SWW-RW y el control presentaban un estrés menor (Fv/Fm de 0.6 a 0.7). El día 5 todos los cultivos se aproximaban a un valor de Fv/Fm de 0.7, indicando ausencia de estrés. Hacia el final del cultivo en modo discontinuo, los nutrientes se van agotando y los cultivos comienzan a estresarse, tal como muestra la ligera bajada en los valores de Fv/Fm medidos (valores de 0.5 a 0.6).

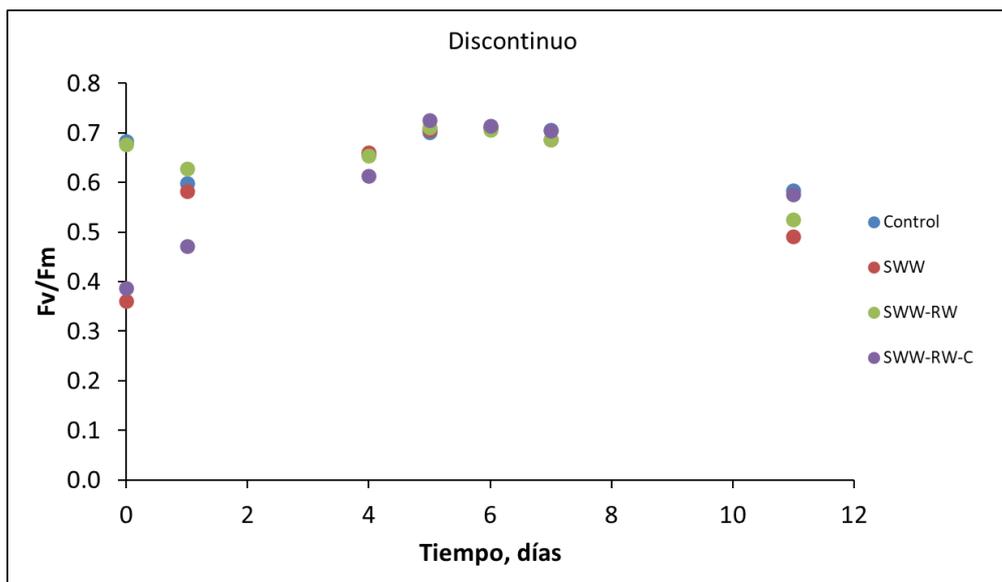


Figura 7. Rendimiento fotosintético ( $F_v/F_m$ ) respecto al tiempo durante el modo operativo discontinuo para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

#### 4.1.1.2 Consumo de nutrientes

Como ya es sabido, las microalgas son una alternativa biológica para eliminar N y P de las aguas residuales. Así pues, se ha analizado su capacidad de eliminación en los distintos medios ensayados en el cultivo discontinuo de *C. vulgaris*. La Figura 8 a muestra que el  $P-PO_4^{-3}$  ha sido eliminado en la misma medida en SWW y SWW-RW (aproximadamente 60%). Pero en el medio SWW-RW-C la eliminación de  $P-PO_4^{-3}$  fue menor (16%). El medio Arnon (control) tiene una entrada de  $P-PO_4^{-3}$  bastante más elevada (30 mg/L) con respecto al resto de medios, cuyos valores varían de 4.3 a 6.8 mg/L. Las aguas residuales urbanas normalmente se caracterizan por un bajo contenido en materia orgánica e inorgánica y un elevado contenido en P (Gómez Serrano, 2017), aunque en este caso dicho contenido no es muy alto. El lixiviado, añadido al medio SWW-RW-C se caracteriza por un mayor contenido en materia orgánica y especialmente en amonio, aunque la concentración de fósforo es baja (Gómez Serrano, 2017). He *et al.* (2013) observaron en discontinuo que un consorcio de *C. vulgaris* y bacterias consumió el fósforo total rápidamente en 10 días con una eficiencia de eliminación de 98% en las aguas residuales no esterilizadas, porcentaje mucho mayor que el presentado en este estudio, ya que un consorcio de microalgas-bacterias tiene una mayor eficiencia de eliminación de nutrientes que un cultivo monoalgal. No obstante, empleando el medio Arnon, se eliminó más del 90% del fósforo aportado con el mismo.

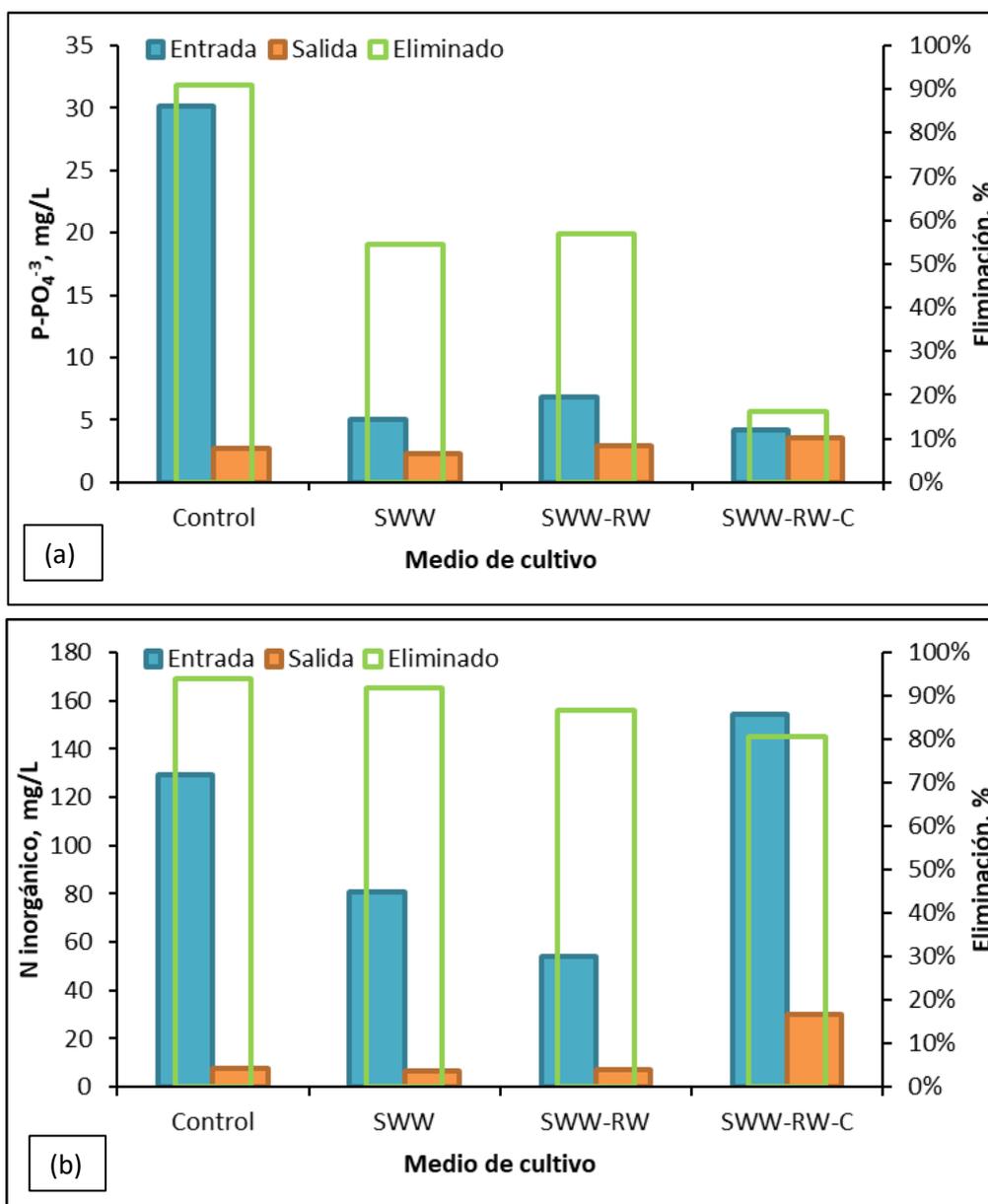


Figura 8. Fósforo (a) y nitrógeno inorgánico total (b) para la entrada, salida y total eliminado para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

Para comparar la eliminación de N en los diferentes medios de cultivo se va a estudiar el grado de eliminación del N inorgánico total, y posteriormente se especificará la forma en la que se encuentra (nitrato o amonio). La eliminación de N total fue de 94 y 92% para el control y para el medio SWW, respectivamente (Figura 8 b). Este también fue eliminado eficientemente para SWW-RW (87%) y SWW-RW-C (81%). En comparación con otros autores, Molazadeh *et al.* (2019) demostraron que *C. vulgaris* absorbe tanto N como P en el rango de 70 a 95%. En el presente estudio, la eliminación de N se encuentra dentro de este rango, demostrando cómo puede existir una limitación del crecimiento en todos los medios por falta de nitrógeno.

En cuanto a la eliminación de N y P, los porcentajes de eliminación de nutrientes en porcentaje de este estudio pueden parecer considerablemente menores en comparación con los valores descritos por Magnotti *et al.* (2016). Sin embargo, si se analizan los datos de concentración (mg/L) se puede observar cómo se eliminó una mayor cantidad de ambos en el presente estudio. Magnotti *et al.* (2016) cultivaron *C. vulgaris* en discontinuo durante 10 días y vieron que asimilaba el 83% de 19.3 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$  (16 mg/L) y el 100% de 2.5 mg/L de ortofosfato y presentes en el agua residual. En el presente trabajo, se eliminó en el medio SWW-RW un 72% de 25.9 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$  (18.7 mg/L) y 57% de 6.7 mg/L de  $\text{P-PO}_4^{-3}$  (3.8 mg/L).

Lim *et al.* (2010) trabajaron en discontinuo cultivando *C. vulgaris* durante 12 días en un estanque (40 L) utilizando aguas residuales procedentes de la industria textil, consiguiendo una menor eliminación en comparación con el presente estudio. Así, depuraron un 45% de 6.5 mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$  (2.9 mg/L) y un 33% de 7.1 mg/L de  $\text{P-PO}_4^{-3}$  (2.3 mg/L).

En el estudio de Ruiz-Marín *et al.* (2010) también trabajaron con *C. vulgaris* en discontinuo en biorreactores de 2.5 L, con una irradiación de 135  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ . Emplearon un medio artificial que simulaba la composición de un efluente de secundario procedente de una planta de tratamiento, que contenía 2 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$ , 32.5 mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$  y 2.5 mg/L de  $\text{P-PO}_4^{-3}$ . En dicho medio, *C. vulgaris* eliminó un 74% de 32.5 mg/L  $\text{N-NH}_4^+$  (24.1 mg/L). Por otra parte, en aguas residuales urbanas naturales se eliminó un 60% de 48 mg/L  $\text{N-NH}_4^+$  (28.8 mg/L). Ambos valores son inferiores al presentado en este trabajo en el medio SWW-RW (47.2 mg/L).

Volviendo a los resultados de este trabajo, si la fuente de nitrógeno se desglosa en amonio y nitrato, para el  $\text{N-NH}_4^+$  (Figura 9 b) se observa cómo fue eliminado en su totalidad (100%) para todos los medios de cultivo estudiados (excepto en el medio Arnon donde el nitrógeno es suministrado exclusivamente en forma de nitrato). La entrada de  $\text{N-NH}_4^+$  tuvo un valor de 78 mg/L para el medio SWW y de casi el doble, 123 mg/L, para el SWW-RW-C, debido a que en este medio el N es suplementado en forma de amonio en el lixiviado. Para el medio procedente del raceway, la entrada de  $\text{N-NH}_4^+$  fue menor, de 28 mg/L. Esto se debe a la variabilidad del agua de primario que se suministra tanto a la EDAR como al raceway, y a la capacidad de depuración de sendos tratamientos secundarios.

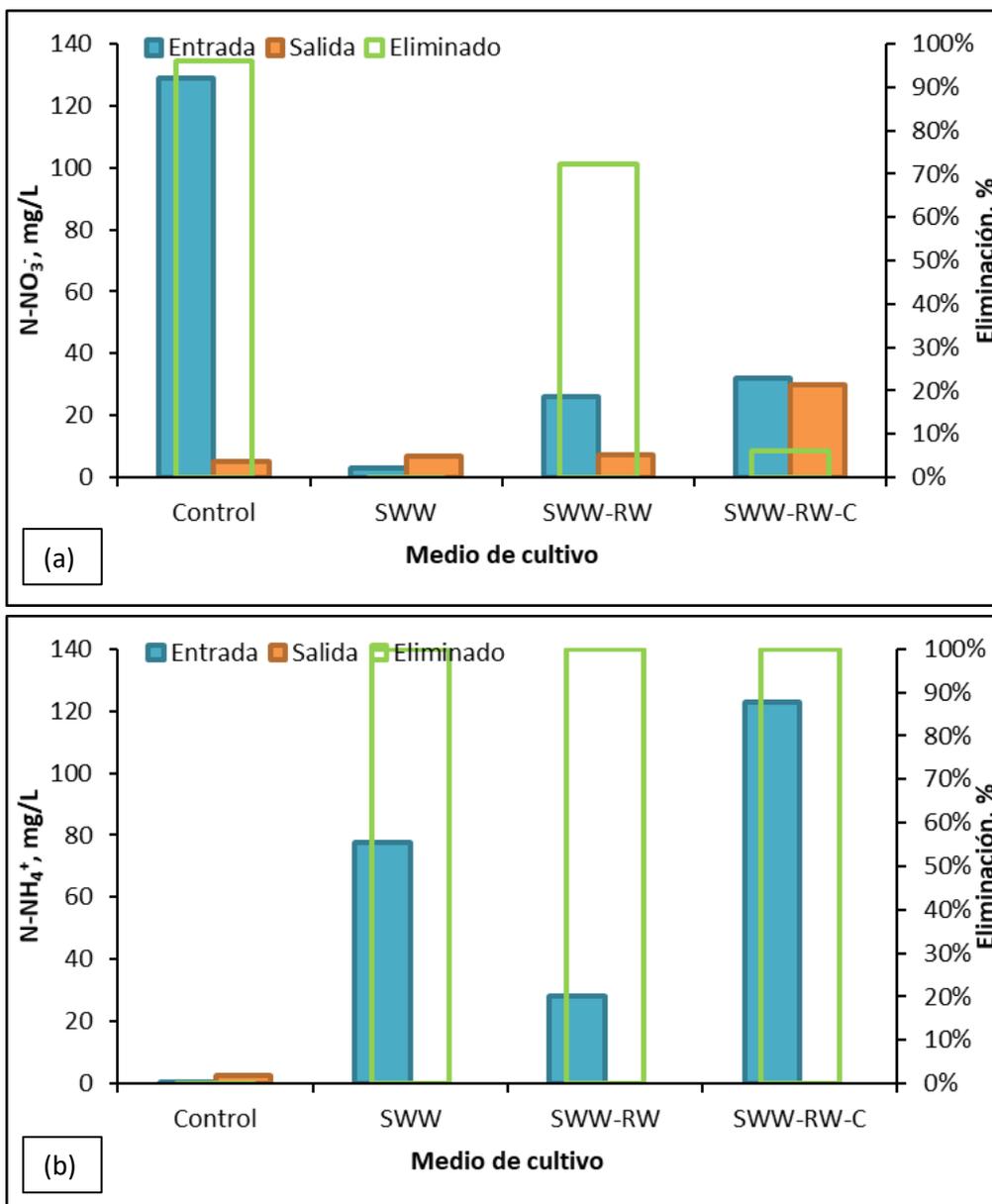


Figura 9. Nitrógeno en forma de nitrato (a) y de amonio (b) para la entrada, salida y total eliminado para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

En cuanto al nitrato, la entrada de  $\text{N-NO}_3^-$  para el control es elevada, ya que el medio Arnon modificado aquí utilizado está suplementado en nitrato. En este ensayo se eliminó casi en su totalidad (96%). En el medio SWW se detectó un valor muy bajo para la entrada de nitrato, y algo mayor para los medios SWW-RW y SWW-RW-C. El porcentaje de eliminación para el medio SWW fue 0% porque no había casi nada presente, mientras que para el medio SWW-RW-C fue 6%, pero recordemos que en estos dos medios había una mayor entrada de nitrógeno amoniacal que es consumido. En el medio SWW-RW, más pobre en nitrógeno amoniacal, se consigue una eliminación del  $\text{N-NO}_3^-$  presente del 72%. Esto muestra que las microalgas asimilan primero el N presente en forma de amonio. La eliminación de las diferentes formas de N (nitrato, amonio y nitrito) tiene un comportamiento secuencial, el nitrito (producto intermedio e inestable en el proceso de nitrificación) y el nitrato no son absorbidos por las microalgas hasta que el amonio es consumido en su gran mayoría (Kim *et al.*, 2010).

Durante el experimento de Kim *et al.* (2010) la concentración inicial de amonio (7.7 mg/L) fue mucho más baja que las concentraciones iniciales de este trabajo. Según este autor la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  no disminuyó durante la fase lag inicial, pero luego disminuyó bruscamente de 7.7 mg/L a 3.4 mg/L, al mismo tiempo que disminuyó la concentración total de carbono inorgánico durante la fase de crecimiento exponencial (24 a 96 h). Finalmente, el día 9 disminuyó su concentración a 1 mg/L, siendo el porcentaje de eliminación de 86%. En el presente trabajo se ha conseguido la completa eliminación del nitrógeno amoniacal, incluso aunque las concentraciones a la entrada fueran mucho mayores.

El experimento de Chawla *et al.* (2020) se realizó en discontinuo durante 12 días con *C. vulgaris*, consiguiendo una elevada eficiencia de eliminación: 95% de 14 mg/L  $\text{N-NO}_3^-$  (13.3 mg/L), 97% de 46.8 mg/L  $\text{N-NH}_4^+$  (45.4 mg/L) y 99% de 15.5 mg/L  $\text{P-PO}_4^{3-}$  (15.3 mg/L). En el presente estudio se eliminó para el medio SWW-RW el 72% de 25.9 mg/L  $\text{N-NO}_3^-$  (18.6 mg/L), el 100% de 28.3 mg/L  $\text{N-NH}_4^+$ , y el 57% de 6.8 mg/L  $\text{P-PO}_4^{3-}$  (3.9 mg/L). En comparación, la eliminación de  $\text{N-NO}_3^-$  fue más favorable en el presente estudio para el medio SWW-RW, mientras que la eliminación de  $\text{N-NH}_4^+$  fue menor en el presente estudio con respecto a los resultados de Chawla *et al.* (2020). Por su parte, la eliminación de  $\text{P-PO}_4^{3-}$  fue menor en el presente estudio para el medio SWW-RW.

Ge *et al.* (2018) realizaron un estudio en discontinuo utilizando aguas residuales con aporte de lixiviado y *C. vulgaris*, y comprobaron que en condiciones que presentan una alta producción de biomasa, el nitrógeno y el fósforo fueron eliminados casi completamente. Se obtuvieron porcentajes de eliminación de más de 99%, tanto para nitrógeno total como para  $\text{P-PO}_4^{3-}$ , con una entrada de 80.3 mg/L y 2.9 mg/L, respectivamente. Estos resultados para eliminación de N total son comparables a los obtenidos con el medio SWW, en el que se observó un porcentaje de eliminación de nitrógeno total de 92%, con una entrada de 80.5 mg/L, si bien la eliminación de P fue solo de 55 % (entrada de 5 mg/L).

Araujol y Morales (2004) realizaron un tratamiento similar al realizado en este trabajo para el medio SWW-RW. Observaron una eliminación total de  $\text{N-NH}_4^+$  al final del experimento en todos los cultivos con agua residual, valores similares a los aquí presentados. Por otra parte, la eliminación máxima en agua esterilizada para *Chlorella* sp. fue del 44% de 5.5 mg/L  $\text{P-PO}_4^{3-}$ , eliminando 2.4 mg/L, valor en el rango de los obtenidos en el presente estudio para los medios SWW (2.8 mg/L) y SWW-RW (3.9 mg/L).

## 4.1.2 Cultivo semicontinuo

### 4.1.2.1 Crecimiento del microorganismo

#### Concentración de biomasa y productividad de biomasa

Una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento en el cultivo discontinuo se iniciaron los ensayos en semicontinuo con una velocidad de dilución de 0.3 1/día. Como muestran los resultados (Figura 10), tras dos semanas de cultivo se había alcanzado el estado estacionario. Hay que tener en cuenta que el estado estacionario se alcanzaría en menos días, pero puesto que las instalaciones del IFAPA están cerradas en fin de semana, los ensayos se alargaron para demostrar la consecución del estado estacionario. Se puede observar que con el medio SWW-RW-C se alcanzó una mayor concentración (1.06 g/L) y productividad de biomasa (0.32 g/(L·día)) respecto a los demás medios, con los que se alcanzaron valores algo más bajos (Figura 10), si bien fueron similares en todos ellos. Esto probablemente se deba a que todos los cultivos podrían tener limitación de nutrientes, pues en el control se elimina prácticamente el 100% del fósforo y en el resto de los medios el 100% de nitrógeno (ver sección 4.1.2.2 sobre consumo de nutrientes). En cualquier caso, lo principal es que se ha demostrado que se puede obtener un cultivo estable con una productividad de biomasa superior a 0.25 g/(L·día) con cualquiera de los medios empleados. Además, esto lleva a pensar que un mayor aporte de lixiviado podría permitir alcanzar mejores resultados debido al mayor aporte de nitrógeno. Esto llevaría a plantear posteriormente una segunda serie experimental en la que ensayaríamos distintos aportes de lixiviado con objeto de optimizar la dosis del mismo.

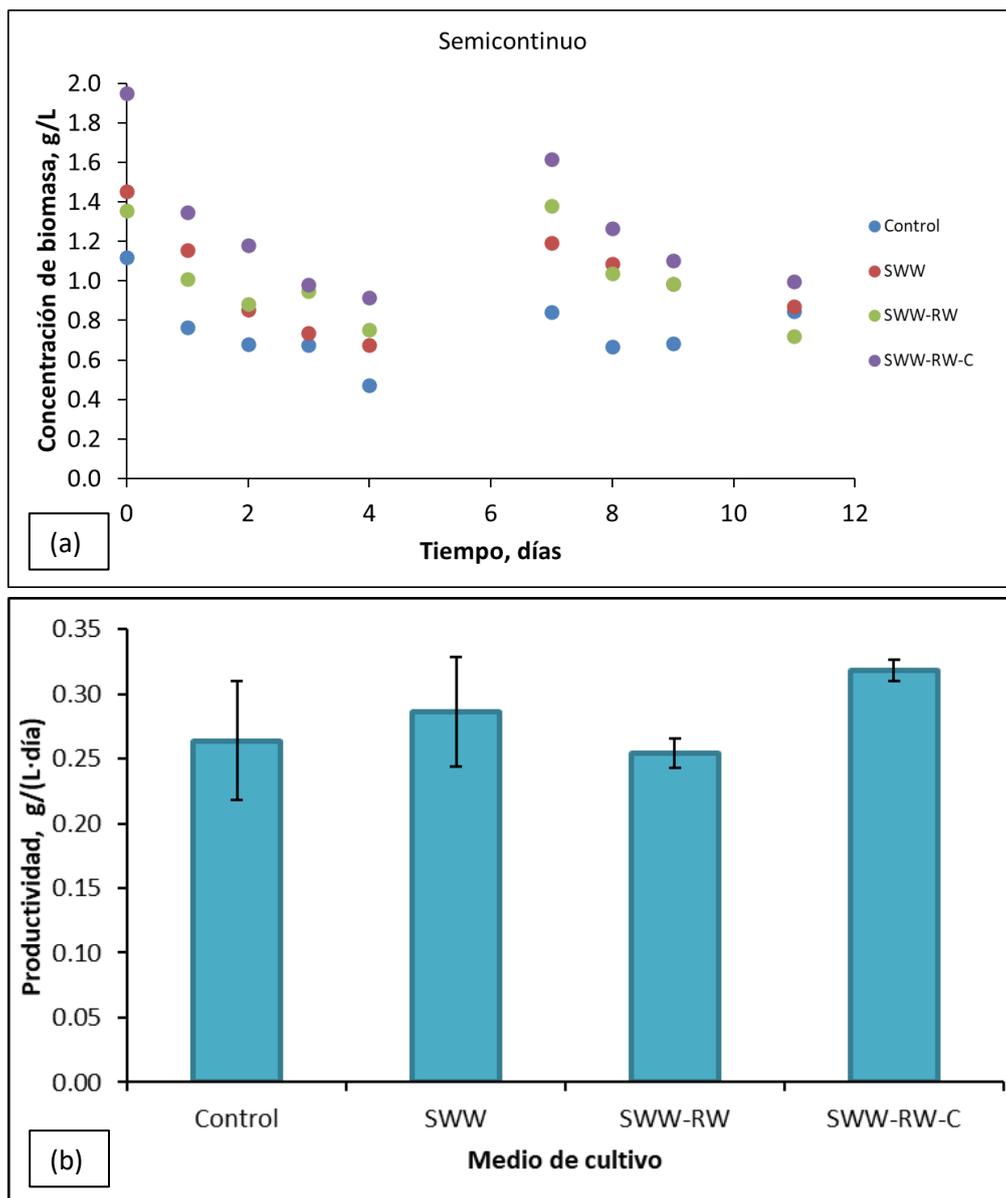


Figura 10. Concentración de biomasa en estado estacionario (a) y productividad de biomasa (b) para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

Si se realiza una comparación con otros autores, se puede ver que Gómez Serrano *et al.* (2015) realizaron un experimento análogo al aquí presentando a una velocidad de dilución de 0.3 1/día. Los medios de cultivo utilizados fueron Arnon modificado y agua de secundario tratada obtenida de una planta de tratamiento, filtrada y no esterilizada. Usando medio Arnon modificado (N 150 mg/L y P 145 mg/L) alcanzaron una concentración de biomasa superior a 1.5 g/L para *C. vulgaris*. En el trabajo aquí presentado el medio Arnon modificado tiene menores concentraciones de N (129 mg/L) y P (30 mg/L). Este bajo valor de P parece limitar el crecimiento del cultivo (ver sección 4.2.2.1), lo que explicaría que hayamos alcanzado una menor concentración de biomasa, de 1 g/L, en comparación con estos autores.

Las concentraciones de biomasa logradas por Gómez Serrano *et al.* (2015) fueron el doble cuando se utilizó medio Arnon (1.5 g/L) en comparación con agua de secundario tratada (0.7 g/L); se observó que era debido a la limitación de nutrientes cuando se utiliza agua residual. En el presente estudio se alcanzaron valores

de concentración de biomasa de hasta 0.95 y 0.85 para los medios SWW y SWW-RW, respectivamente, algo mayores a los alcanzados por estos autores, debido a que los medios SWW y SWW-RW utilizados tenían una mayor concentración de N en comparación con el estudio de Gómez Serrano *et al.* (2015). En el presente estudio los medios SWW y SWW-RW presentaban 273 mg/L y 88 mg/L, respectivamente, de N a la entrada en el medio.

Gómez Serrano *et al.* (2015) alcanzaron una productividad de biomasa de 0.6 g/(L·día) en medio Arnon. En el presente estudio fue menor, alcanzado 0.26 g/(L·día), quizás debido a una limitación por fosfato en el medio Arnon modificado aquí empleado. Por otro lado, estos autores obtuvieron una productividad de biomasa de 0.20 g/(L·día) empleando agua residual. En el presente estudio se observaron valores superiores debido a una mayor disponibilidad de nutrientes en los medios análogos empleados: 0.29 g/(L·día) para el medio SWW, y 0.25 g/(L·día) para el medio SWW-RW. Los mencionados autores observaron además que los valores de productividad de biomasa obtenidos utilizando agua de secundario fueron mayores de 0.50 g/(L·día) empleando *Muriellopsis sp.* y *S. subpicatus*, indicando que estas cepas son más productivas que *C. vulgaris*.

Por otra parte, Ge y Champagne (2016) emplearon agua residual de secundario para cultivar la microalga *C. vulgaris* en fotobiorreactores con 1.8 L de cultivo, añadiendo cuatro porcentajes diferentes de lixiviado (4.1%, 9.5%, 17.2% y 36.2%), siendo las concentraciones de nitrógeno total de 57.4, 129.3, 229.9 y 478.7 mg/L, respectivamente. Realizaron ensayos en semicontinuo reemplazando el 66% del cultivo, y comprobaron que la concentración de biomasa era similar (0.42-0.51 g/L) para todas las concentraciones de lixiviado ensayadas. Además, obtuvieron valores de productividad de biomasa que se encontraban en el rango de 0.18 a 0.31 g/(L·día), y determinaron que la productividad de biomasa disminuía conforme aumentaba el porcentaje de lixiviado suministrado. En todos los ensayos realizados en el presente trabajo se obtuvieron valores mayores de concentración de biomasa debido a que en el estudio de Ge y Champagne (2016) la velocidad de dilución aplicada fue muy alta, más del doble de la aquí ensayada.

Gómez Serrano (2017) cultivó *Muriellopsis sp.* en columnas de burbujeo de 250 ml en semicontinuo con una tasa de dilución de 0.3 1/día. Emplearon agua residual de secundario suplementada con nutrientes que podrían limitar el crecimiento por encontrarse presentes en baja concentración (N, P y Fe), con el objetivo de descartar la presencia de cualquier sustancia tóxica en el agua residual de secundario. Los resultados mostraron valores iguales de producción, tanto empleando el medio identificado como óptimo (33% de agua residual de secundario), como agua residual de secundario (100%) suplementada con nutrientes adicionales. Así se descartó la presencia de cualquier tóxico en el agua utilizada. Para confirmar que esto es así para cualquier microalga, se realizaron ensayos con otras especies (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella fusca*, *Chlorella sp.* y *Scenedesmus subspicatus*). Demostraron así que el agua residual de secundario puede usarse directamente como medio de cultivo para una amplia variedad de microalgas dulceacuícolas, aunque su baja concentración de nutrientes puede provocar un descenso de la productividad de biomasa. Esto nos permite incidir en la recomendación de suplementar con lixiviado el agua residual a tratar, con objeto de obtener mayor productividad de biomasa y, además, contribuir a depurar este residuo.

### Rendimiento fotosintético (Fv/Fm)

Se puede observar en la Figura 11 que los cultivos comenzaban a estar estresados al final del cultivo discontinuo, lo que se corresponde con el día 0 de cultivo semicontinuo. Sin embargo, al iniciar el cultivo en modo semicontinuo estos se recuperaron casi de inmediato alcanzando un valor de Fv/Fm próximo a 0.70 que se mantuvo durante todo el ensayo.

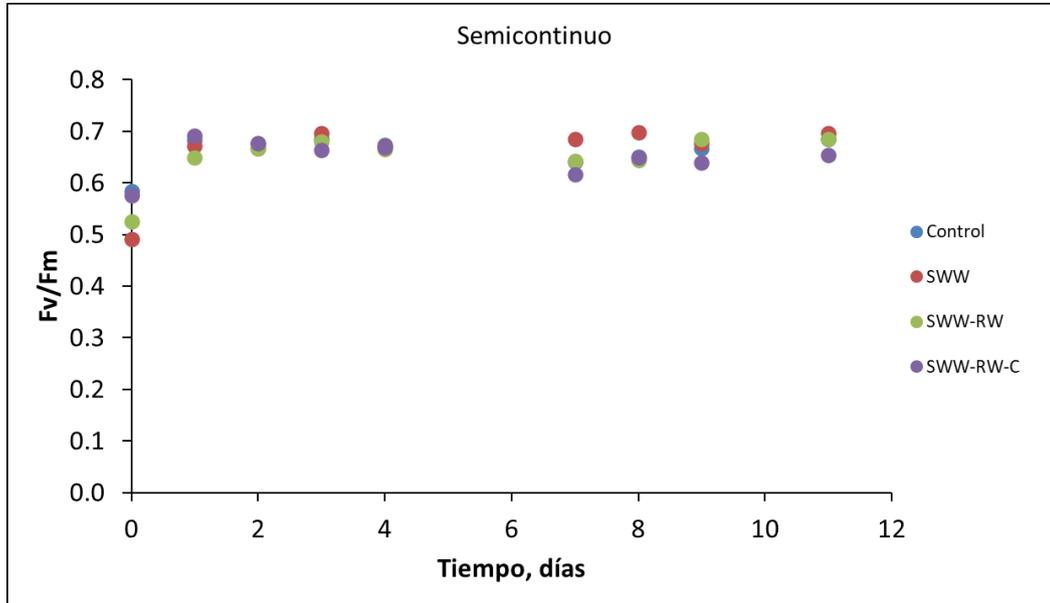


Figura 11. Rendimiento fotosintético (Fv/Fm) respecto al tiempo durante el modo operativo semicontinuo para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

Gómez Serrano *et al.* (2015) comprobaron en semicontinuo que los valores de Fv/Fm permanecieron constantes, y con un valor superior a 0.65 para *C. vulgaris* cultivada en medio Arnon. Sin embargo, los valores observados de Fv/Fm cuando se trabajó con agua residual de secundario, comparable a los medios SWW y SWW-RW, fueron de 0.45 debido a las condiciones de cultivo adversas, ya que las aguas residuales utilizadas en dicho experimento eran escasas en nutrientes. Sin embargo, en el presente estudio, las aguas utilizadas eran más ricas en nutrientes, por lo que el valor de Fv/Fm no resultó perjudicado.

En otro estudio, realizado por Morales Amaral *et al.* (2015) el valor de fluorescencia de las clorofilas en semicontinuo para medio Arnon se encontró alrededor de 0.6 para *Muriellopsis* sp. y *P. subcapitata*. Se utilizó lixiviado como única fuente de nutrientes, pero diluido bajo diferentes porcentajes de lixiviado (10-60%). Dicho lixiviado tenía una concentración de 1.6 mg/L de nitrato, 35.3 mg/L de fósforo y 406 mg/L de amonio, concentraciones que disminuyeron con las diluciones realizadas. Concretamente, dichas medidas de Fv/Fm mostraron que *Muriellopsis* sp. no estaba estresada a ningún porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo, mientras que *P. subcapitata* se estresó con porcentajes de lixiviado mayores de 40%: las medidas realizadas en los cultivos de *P. subcapitata* mostraron que los valores de Fv/Fm disminuyeron desde 0.60, cuando se utiliza un medio de cultivo Arnon o porcentajes de lixiviado inferiores a 30%, a 0.49 cuando se utiliza el 60% de lixiviado. Esto indica que ha de tenerse precaución si se desea incorporar altos porcentajes de lixiviado al cultivo, estableciendo para cada cepa y condiciones de cultivo cuál es el máximo permitido sin que el cultivo resulte estresado.

#### 4.1.2.2 Consumo de nutrientes

En lo que respecta al consumo de nutrientes en los ensayos en semicontinuo, el control presenta un contenido en  $P-PO_4^{3-}$  a la entrada de 30 mg/L, que fue eliminado en un 98%. En el resto de medios el mayor porcentaje de eliminación para  $P-PO_4^{3-}$  fue de 79% en el medio SWW-RW, seguido del medio SWW-RW-C con un valor de 59%, y finalmente un valor de 9% para SWW (Figura 12 a), si bien tanto entradas como salidas en todos estos ensayos fueron muy bajas (menor a 7 mg/L). Por su parte, el N inorgánico (Figura 12 b) fue eliminado casi en su totalidad en todos los casos, mostrando así una deficiencia en este nutriente que hará que el crecimiento de los cultivos esté limitado. Los porcentajes de eliminación de N total obtenidos fueron de 93-98% para SWW, SWW-RW y SWW-RW-C. En el medio control se obtuvo una eliminación un poco menor, del 73%.

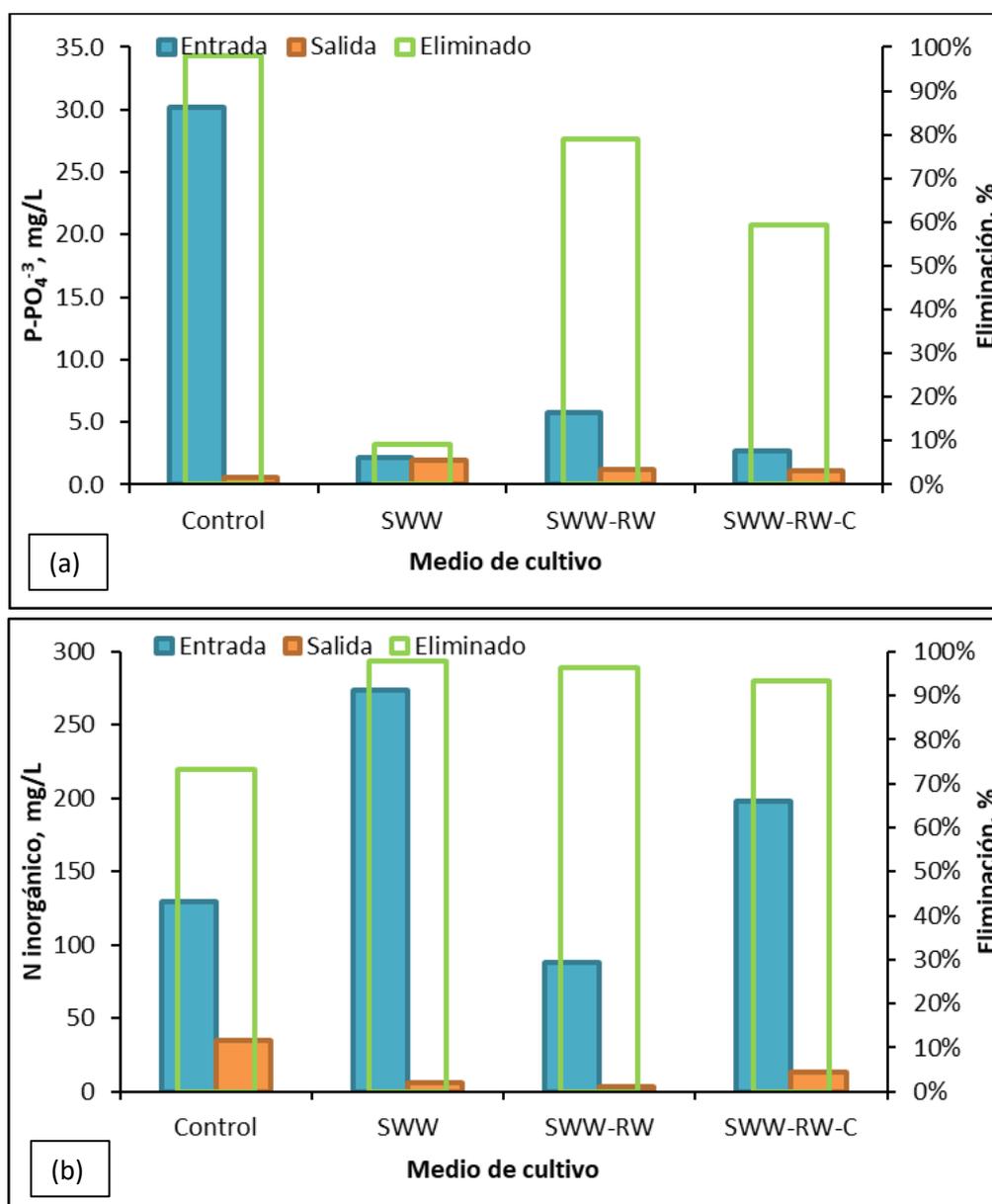


Figura 12. Fósforo (a) y nitrógeno inorgánico total (b) para la entrada, salida y total eliminado para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

Si se distingue la procedencia del nitrógeno entre  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NH}_4^+$ , se puede ver cómo el N amoniacal se elimina completamente en todos los medios que lo contienen, quedando tan solo un pequeño porcentaje del N aportado en forma de nitrato en dichos medios. Aun así, la eliminación de nitrato presente en el agua residual fue elevada para todos los casos estudiados: 94% para SWW-RW, y alrededor de 70% para el control, y para los medios SWW y SWW-RW-C.

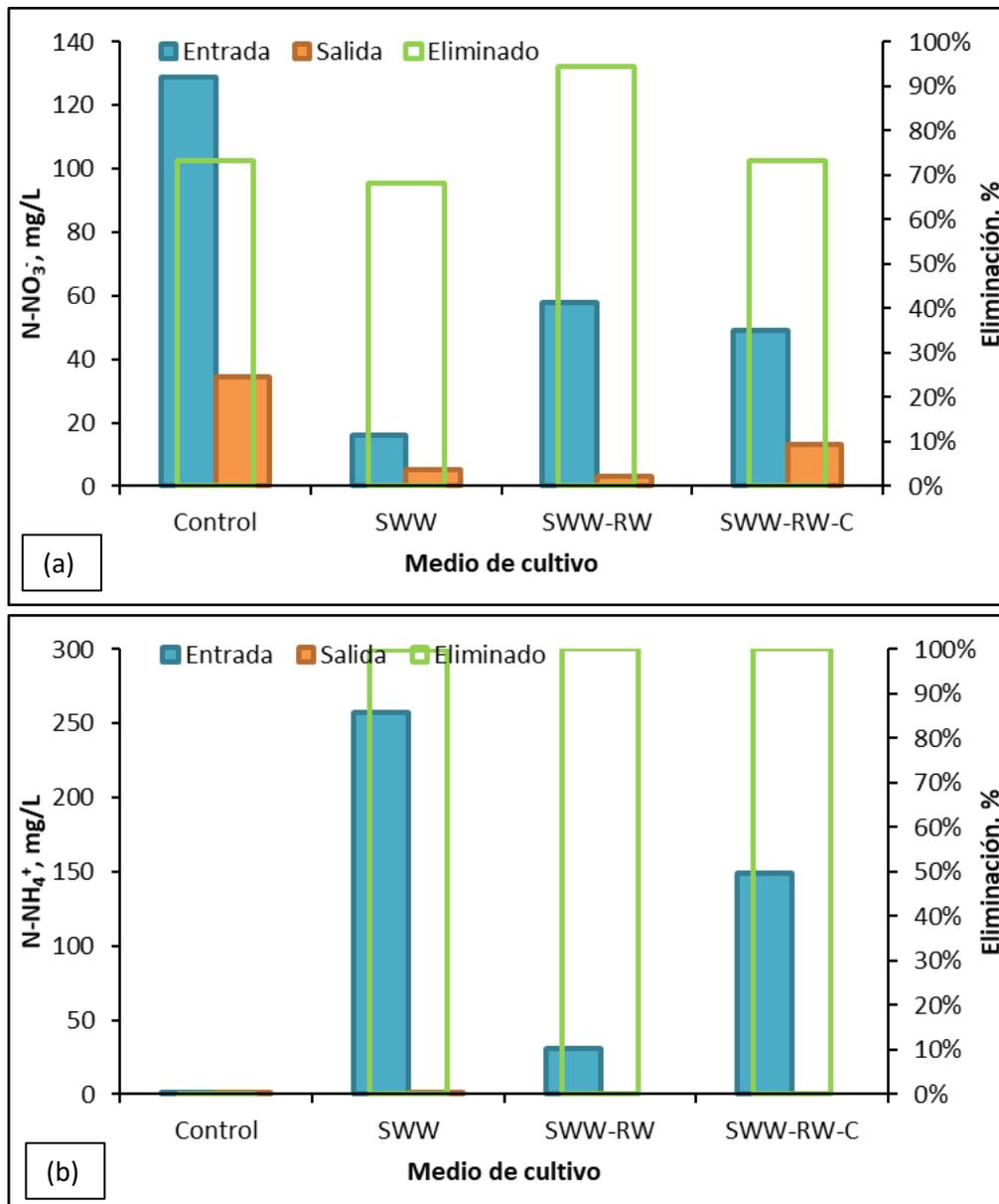


Figura 13. Nitrógeno en forma de nitrato (a) y en forma de amonio (b) para la entrada, salida y total eliminado para los distintos medios de cultivo ensayados: control (Arnon modificado), SWW (efluente de secundario de EDAR), SWW-RW (efluente de secundario de raceway) y SWW-RW-C (efluente de secundario de raceway suplementado con lixiviado).

El estudio de Morales Amaral *et al.* (2015) fue realizado en semicontinuo con una tasa de dilución de 0.3 1/día utilizando columnas de burbujeo de 250 ml idénticas a las aquí empleadas. El medio Arnon modificado empleado en el estudio de Morales Amaral *et al.* (2015) contenía 140 mg/L de nitrógeno total y 39 mg/L de fósforo (valores similares a los ensayados en este trabajo para el control). Para *Muriellopsis* sp. y *P. subcapitata* se consiguieron porcentajes de eliminación de N del 79% y 71%, respectivamente, y

porcentajes de eliminación de P del 27% y 21%, respectivamente. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en el presente estudio con el medio Arnon modificado, aunque se trata de diferentes microalgas.

En el estudio de Orfanos y Manariotis (2019) se trabajó con agua residual filtrada en un tanque de 50 L que contenía agua procedente de la industria textil de algodón. Este fue inoculado con un precultivo de *Chlorococcum* sp. y fue alimentado con un efluente secundario (con 14.6 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 3.2 mg/L P total) para examinar el crecimiento de microalgas. En el interior del tanque, la concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> disminuyó un 60% (desde 10 hasta 4 mg/L), mientras que la concentración de P disminuyó un 93% (desde 3 a 0.2 mg/L). En el presente estudio se eliminó en el medio SWW-RW un 94% de 57.7 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (54.2 mg/L) y un 79% de 5.8 mg/L P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (4.6 mg/L). La eliminación de N y P en el presente estudio en el medio SWW-RW fue mayor en comparación con el estudio de Orfanos y Manariotis (2019), debido a que el aporte de N en el ensayo de estos autores fue mucho más bajo.

En el estudio de Souza Celente *et al.* (2019) se cultivó *C. vulgaris* en biorreactores con un volumen de 200 L empleando agua residual de secundario con concentraciones de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 96 mg/L, 119 mg/L de N total y 4.8 mg/L de P soluble. Se eliminó hasta 99%, 70% y 44% para N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N total y P Soluble, respectivamente, lo que se corresponde con 95 mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 83.3 mg/L de N total y 2.1 mg/L de P-soluble. Este medio es análogo al SWW-RW empleado en el presente trabajo. Si se comparan, se observa cómo para el medio SWW-RW se eliminaron 4.6 mg/L de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> y 84 mg/L de N total, valores similares en ambos estudios.

Los resultados obtenidos por Gómez Serrano *et al.* (2015) en cuanto a la capacidad de eliminación de nutrientes confirman que *Muriellopsis* sp. y *S. subpicatus* fueron capaces de eliminar completamente el nitrógeno y el fósforo contenidos en un el medio en ensayos con una velocidad de dilución de 0.3 1/día. El medio era agua residual urbana de secundario suplementada con purines y filtrada, presentando 17 mg N/L (principalmente en forma de amonio) y 10 mg P/L. Estas concentraciones de entrada de nutrientes están por debajo de las presentadas en el presente trabajo para todos los medios ensayados, de ahí que se consiga la completa eliminación de ambos.

Ge y Champagne (2016) cultivaron *C. vulgaris* en aguas residuales ensayando cuatro diferentes porcentajes de lixiviado (4.1%, 9.5%, 17.2% y 36.2%) en fotobiorreactores autoclavables con un volumen de cultivo de 1.8 L. Entre ellos, el medio más similar a SWW-RW-C es el que posee un 17.2% de lixiviado, y que presentaba 230 mg/L de N total y 47 mg/L de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. Se eliminó un 89% de N total y un 95% de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, lo que equivale a 204.7 mg/L de N total y 44.7 mg/L de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. En el presente estudio, se eliminó para el medio SWW-RW-C un 93% de 198 mg/L de N total (184 mg/L) y un 59% de 2.7 mg/L de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (1.6 mg/L). La eliminación de nitrógeno fue similar a la alcanzada en el presente estudio, si bien la eliminación de fósforo fue mayor porque en nuestro estudio la entrada de este nutriente es muy baja.

Por otra parte, el medio de Ge y Champagne (2016) más similar a SWW-RW es el que tiene 9.5% de lixiviado, y que presenta 112 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 119 mg/L de N total y 17.8 mg/L P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. Consiguieron eliminar un 99% de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, un 98% de N total y un 99% de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, lo que equivale a 110.9 mg/L N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 116.6 mg/L de N total y 17.6 mg/L P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. En el medio SWW-RW del presente estudio (con 88.4 mg/L de N total y 5.8 mg/L de P) se eliminó una mayor cantidad de N total (85 mg/L) y de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (30.7 mg/L) pero una menor cantidad de fósforo (4.6 mg/L) por la misma razón antes comentada.

Todos estos resultados ponen de manifiesto el gran potencial de los cultivos de microalgas para depurar aguas residuales y la necesidad en muchos casos de la suplementación con lixiviado, de manera que con un mayor aporte de nutrientes se puedan obtener mayores productividades de biomasa a la vez que se depura un residuo resultante del proceso de tratamiento de agua residuales o incluso otro tipo de residuos, como pueden ser los purines o efluentes de otro tipo de industrias.

## 4.2 Optimización del aporte de lixiviado al medio. Resultados esperables

La suplementación con lixiviado puede permitir alcanzar mejores resultados debido al mayor aporte de nutrientes. Esto nos llevaría a plantear una segunda serie experimental en la que ensayaríamos distintas dosis de lixiviado aportado con el objetivo de optimizarla. La crisis del Cov-SARS-2 no ha permitido la realización de esta segunda serie experimental, por lo que se presentan a continuación los resultados esperados en base a una búsqueda bibliográfica.

En el estudio de Ge y Champagne (2016) *C. vulgaris* fue cultivada en fotobiorreactores de 1.8 L. Esta microalga fue cultivada en agua residual con cuatro porcentajes de lixiviado (4.1%, 9.5%, 17.2% y 36.2%) tanto en discontinuo (día 0 a 16) como en semicontinuo (día 16 a 34) a una velocidad de dilución de 0.66 1/día. En lo que se refiere a depuración de nutrientes, estos autores reportan porcentajes depuración de N y P superiores al 90% en todos los casos, excepto para el ensayo en semicontinuo al 36.2% donde la depuración de N total baja al 84%, valor igualmente elevado. Los valores de concentración de biomasa se encontraron en el rango de 0.42-0.51 g/L. La productividad de biomasa descendía con el porcentaje de lixiviado añadido desde valores de 0.31 hasta 0.18 g/(L·día) (Tabla 4). Comparando la concentración inicial de nutrientes en el medio en estos ensayos con los del presente estudio para el medio SWW-RW-C, se observa que dicho medio podría situarse entre los ensayos al 9.5% y al 17.2% de Ge y Champagne (2016). Los datos de productividad de biomasa en semicontinuo presentados en la Tabla 4 se han calculado a partir de los datos presentados en el estudio de Ge y Champagne (2016), aplicando  $Pb=D \cdot Cb$ .

Tabla 4. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: depuración de nutrientes en semicontinuo, y productividad de biomasa obtenida al finalizar el semicontinuo (día 16 a 34) cultivando *C. vulgaris* (Ge y Champagne, 2016).

Lixiviado (%)	Nutrientes en el medio (mg/L)			Depuración (%)		Pb (g/(L·día))
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	Nitrógeno	Fósforo	
4.1	4.6	52.7	10.7	99.3	99.6	0.31
9.5	6.8	112.5	17.8	97.7	99.2	0.28
17.2	9.1	220.9	47.0	89.4	95.0	0.21
36.2	14.0	468.8	85.8	84.0	96.6	0.18

En el trabajo de Morales Amaral *et al.* (2015) se estudió la producción de las microalgas *Muriellopsis* sp. y *Pseudokirchneriella subcapitata* en columnas de burbujeo de 250 ml utilizando lixiviado como única fuente de nutrientes, con una irradiancia incidente de 800  $\mu$ moles de fotones/(m<sup>2</sup>·s) que conllevó irradiancias promedio en los cultivos de 30 a 50  $\mu$ moles de fotones/(m<sup>2</sup>·s). Se realizaron ensayos con diferentes

porcentajes de lixiviado diluido en agua con el fin de establecer la concentración óptima en el medio de cultivo. No se detectaron cantidades de nitrato relevantes a la salida en experimentos utilizando lixiviado, por lo que no se observó nitrificación (el amonio es consumido principalmente por las microalgas). Se operó en modo discontinuo durante 5 días y se pasó a modo semicontinuo con una tasa de dilución del 30% usando diferentes medios de cultivo: Arnon modificado (control) o mezclas de agua dulce y lixiviado en diferentes porcentajes (10-60%). El medio de cultivo Arnon fue autoclavado, mientras que las mezclas de lixiviado y agua dulce fueron utilizadas directamente, sin pretratamiento. Los resultados obtenidos por estos autores (Tabla 5) demostraron que la productividad de biomasa fue máxima para concentraciones de lixiviado de 40-50%, logrando valores similares a los alcanzados con el control (medio Arnon). Por encima del 50% de lixiviado (160 mg N/L) se presentó toxicidad, por lo que el rendimiento del cultivo disminuyó, marcando de esta forma un 50% de lixiviado como el límite tolerable para el cultivo. En cuanto a la eliminación de nutrientes, con *Muriellopsis* sp. se lograron valores mayores de eliminación de nutrientes (96.5-97.6% de N; y 52.4-100% de P), en comparación con *P. subcapitata* (12.9-96.5% de N; 14.3-100% de P).

Tabla 5. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: productividad de biomasa obtenida para *P. subcapitata* y *Muriellopsis* sp. (Morales Amaral et al., 2015).

Lixiviado (%)	Nutrientes en el medio (mg/L)		Pb (g/(L·día))	
	Nitrógeno	Fósforo	<i>P. subcapitata</i>	<i>Muriellopsis</i> sp.
0 (Arnon)	121	39	1.00	1.18
10	57	3.5	0.79	0.85
20	87.5	7	0.82	0.9
30	118	10.5	0.90	1.01
40	122	14.	1.02	1.11
50	145	18	0.99	1.13
60	166	22	0.85	1.12

Tabla 6. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: depuración de nutrientes obtenida para *P. subcapitata* y *Muriellopsis* sp. (obtenida a partir de los datos de Morales Amaral et al., 2015).

Lixiviado (%)	Depuración <i>P. subcapitata</i> (%)		Depuración <i>Muriellopsis</i> sp. (%)	
	Nitrógeno	Fósforo	Nitrógeno	Fósforo
0 (Arnon)	68.3	23.1	83.3	25.6
10	95	100	96.6	100
20	96.5	100	97.6	100
30	60.9	72.7	96.5	100
40	57.6	57.1	96.8	78.6
50	37.9	33.3	96.6	72.2
60	12.9	14.3	96.5	52.4

Sepúlveda *et al.* (2015) cultivaron *Nannochloropsis gaditana* en columnas de burbujeo de 0.5 L con una irradiancia incidente de 500  $\mu\text{moles de fotones}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  en semicontinuo a una velocidad de dilución de 0.25 1/día. Se observó una fuerte reducción de la capacidad de depuración de nitrógeno cuando el porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo aumentó por encima del 50%, debido a un gran exceso de  $\text{N-NH}_4^+$ . En el rango de 30 a 50% la productividad de biomasa fue de 0.40 g/(L·día), al igual que la productividad obtenida en el presente estudio para el medio SWW-RW-C. Los porcentajes de lixiviado menores a 20% restringieron los rendimientos de biomasa debido a la deficiencia de fósforo. En la Tabla 7 se muestran los valores obtenidos. La mayor productividad fue obtenida con una concentración de 334 mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$ . Este dato, superior al ensayado en el presente estudio, hace pensar que un mayor aporte de lixiviado podría hacer aumentar la productividad de biomasa.

Tabla 7. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: depuración de nutrientes y productividad de biomasa obtenida cultivando *N. gaditana* (Sepúlveda *et al.*, 2015).

Lixiviado (%)	Nutrientes en el medio (mg/L)			Depuración (%)		Pb (g/(L·día))
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	Nitrógeno	Fósforo	
30	2.0	145	10.8	40	93	0.38
40	2.6	192	14.4	38	82	0.38
50	4.6	334	25.1	20	80	0.42

En el trabajo de Ledda *et al.* (2015) se pretendía optimizar el porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo para cultivar *N. gaditana*, realizando experimentos a escala piloto en raceways (860 L) y fotobiorreactores tubulares (340 L) en externo en modo semicontinuo con una dilución de 0.3 1/día. Se utilizó medio Algal como control (0% lixiviado) y agua de mar filtrada y esterilizada con diferentes porcentajes de lixiviado (15%, 20% y 30%). Se demostró que la microalga *N. gaditana* puede ser producida utilizando lixiviado con porcentajes inferiores al 30%; a esta dosis se provocó inhibición por exceso de amonio (Tabla 8). Para esta microalga no se observó aumento de la productividad con el porcentaje de lixiviado añadido, siendo máxima para el menor porcentaje ensayado. No obstante, hay que tener presente también que se trata de una cepa marina a la que se añade agua dulce con la suplementación en lixiviado. Por tanto, el máximo a añadir sería del 20%, con concentraciones de N por debajo de 100 mg/L.

Tabla 8. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: productividad de biomasa obtenida en un fotobiorreactor tubular y en raceway cultivando *N. gaditana* (Ledda *et al.*, 2015).

Lixiviado (%)	Nutrientes en el medio (mg/L)			Pb (g/(L·día))	
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	Tubular	Raceway
0	112.0	0	22.4	0.48	0.10
15	0.7	47.9	3.6	0.45	0.09
20	1.3	95.7	7.2	0.4	0.08
30	2.0	145	10.8	0.15	0.04

En términos de depuración de nitrógeno, en reactores tubulares se obtuvo una alta eficiencia de depuración, si bien para el 30% de lixiviado se redujo la depuración de N hasta el 63% debido a la menor productividad de la biomasa (Tabla 9). En reactores raceway se obtienen valores inferiores de depuración debido a la menor productividad de biomasa en este sistema de cultivo.

Tabla 9. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: depuración de nutrientes obtenida en un fotobiorreactor tubular y en un raceway cultivando *N. gaditana* (Ledda et al., 2015).

Lixiviado (%)	Depuración tubular (%)		Depuración raceway (%)	
	Nitrógeno	Fósforo	Nitrógeno	Fósforo
0	85	76	18	20
15	90	94	37	85
20	80	95	33	90
30	63	95	42	78

Las productividades de biomasa obtenidas por Ledda et al. (2015) utilizando lixiviado al 15% y 20% están en el mismo rango que aquellas obtenidas por Sepúlveda et al. (2015) con la misma microalga y suministrando agua de mar con diferentes porcentajes de lixiviado en semicontinuo, aunque en este estudio los autores concluyeron que las productividades máximas tienen lugar usando elevados porcentajes de lixiviado, de 30 a 50%. Esto se debe a que, en el estudio de Sepúlveda et al. (2015) las condiciones eran diferentes: los experimentos se realizaron en el laboratorio utilizando reactores de columna de burbujeo, CO<sub>2</sub> puro y condiciones de cultivo controladas. Esto demuestra la gran importancia de verificar los resultados de laboratorio en condiciones reales de operación.

Los tres estudios que van a ser presentados a continuación (Romero Villegas et al. (2018a), Romero Villegas et al. (2018b) y Romero Villegas et al. (2017)) operaron en semicontinuo, con una tasa de dilución de 0.3 1/día. Utilizaron distintos porcentajes de lixiviado, el cual, sin diluir, tenía una concentración de 6.6 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 732 mg/L de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 14.1 mg/L de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>.

Tabla 10. Composición de los diferentes medios según los porcentajes de lixiviado ensayados en los estudios de Romero Villegas et al. (2018a), Romero Villegas et al. (2018b) y Romero Villegas et al. (2017)).

Lixiviado (%)	Nutrientes en el medio (mg/L)		
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>
20	1.3	146	4.2
30	2.0	219	4.4
40	2.6	293	5.6
50	3.3	336	7.0

Romero Villegas et al. (2018a) estudiaron la producción de la microalga *Geitlerinema* sp. (98%, cultivo no monoalgal) en externo en fotobiorreactores planos de 400 L y observaron la mayor productividad de biomasa cuando se utilizó un 20% de lixiviado, consiguiendo elevadas capacidades de eliminación de nutrientes para nitrógeno y fósforo. La productividad de biomasa disminuye con la concentración de lixiviado, si bien puede ser debido a la concentración de amonio tan elevada en los ensayos llevados a cabo

a los mayores porcentajes de lixiviado. Los rendimientos de depuración fueron elevados en los ensayos realizados hasta 40% de lixiviado.

Tabla 11. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: depuración de nutrientes y productividad de biomasa obtenida para un cultivo no monoalgal, donde predominaba *Geitlerinema* sp. (Romero Villegas et al., 2018a).

Lixiviado (%)	Depuración (%)		Pb (g/(L·día))
	Nitrógeno	Fósforo	
20	84	80	0.33
30	78	83	0.27
40	80	79	0.21
50	65	42	0.025

Romero Villegas et al. (2018b) trabajaron con raceways con cultivos en los que coexistían cuatro cepas: *Pseudanabaena* sp., *Halamphora* sp., *Geitlerinema* sp. y *Nannochloropsis* sp. (siendo esta última la predominante). De nuevo observaron una reducción de la productividad de biomasa con el incremento del porcentaje de lixiviado, alcanzando elevados porcentajes de depuración en todos los casos.

Tabla 12. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: depuración de nutrientes y productividad de biomasa obtenida cultivando un consorcio de microalgas, siendo *N. gaditana* dominante (Romero Villegas et al., 2018b).

Lixiviado (%)	Depuración (%)		Pb (g/(L·día))
	Nitrógeno	Fósforo	
20	85	80	0.27
30	84	79	0.21
40	79	80	0.19
50	80	86	0.025

Romero Villegas et al. (2017) trabajaron en fotobiorreactores tubulares de 340 L en externo con cultivos de *N. gaditana* en los que coexistían *Geitlerinema* sp., *Chlorella* sp., *Limnothrix* sp. y *Chaetophorales* sp. Una vez más, las condiciones más eficientes para la producción de biomasa y eliminación de nutrientes tuvieron lugar cuando se utilizó un 20% de lixiviado.

Tabla 13. Influencia del porcentaje de lixiviado en el medio de cultivo: depuración de nutrientes y productividad de biomasa obtenida en un consorcio de microalgas, siendo *N. gaditana* dominante (Romero Villegas et al., 2017).

Lixiviado (%)	Depuración (%)		Pb (g/(L·día))
	Nitrógeno	Fósforo	
20	100	99	0.60
30	100	98	0.55
40	98	92	0.41
50	70	81	0.20

Todos estos resultados indican que hay que optimizar el aporte de lixiviado en función de las características del mismo, de manera que no se rebasen los límites de concentración de amonio (y/o otras posibles sustancias presentes en el medio que pudieran resultar tóxicas).

Así pues, comparando todos estos datos con los obtenidos en el presente trabajo, podría haber potencial de aumento de la productividad de biomasa alcanzada si se aumentase el porcentaje de lixiviado suplementado al medio, pues no hemos observado efectos tóxicos y, puesto que prácticamente todo el nitrógeno era consumido, podríamos estar teniendo una limitación por este nutriente. Se ha ensayado un 10% de lixiviado que contenía 148 mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$  en el medio (SWW-RW-C), valor inferior a los ensayados por otros autores como se ha analizado anteriormente. Goto *et al.* (2018) comprobaron que el crecimiento de *C. vulgaris* se inhibió a una concentración de amonio de 239 mg/L. Otros datos encontrados en bibliografía muestran una concentración óptima de  $\text{N-NH}_4^+$  para *C. vulgaris* en torno a 220 mg/L (Ge y Champagne, 2016). Por todo ello, se propondría optimizar la cantidad de lixiviado a aportar llevando a cabo ensayos con concentraciones superiores de lixiviado: 15, 20 y 25%. En principio no se probarían concentraciones superiores por disponer ya de una concentración demasiado elevada de amonio que pudiera ejercer efectos tóxicos.

## 5. CONCLUSIONES

1. Las aguas residuales pueden utilizarse sinérgicamente para eliminar los nutrientes presentes en las mismas, así como para cultivar microalgas. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la utilización de la microalga *C. vulgaris* para la absorción de nutrientes y crecimiento en aguas residuales es factible.
2. Se ha comprobado que el efluente de secundario obtenido en una EDAR (SWW) y el obtenido mediante un tratamiento con microalgas en un raceway (SWW-RW) permiten alcanzar resultados similares en cuanto a productividad de biomasa, demostrando que cualquiera de ellos puede ser utilizado indistintamente.
3. Los datos obtenidos durante la primera serie experimental, llamada “análisis de crecimiento de la microalga y la depuración de agua en cuatro medios diferentes”, demuestran que se puede obtener un cultivo estable de *C vulgaris* con una productividad de biomasa superior a 0.25 g/(L·día) con cualquiera de los medios empleados.
4. La suplementación del medio con lixiviado (SWW-RW-C) permite aumentar la productividad de biomasa desde 0.25 g/(L·día) para el medio sin suplementar (SWW-RW) hasta 0.32 g/(L·día), alcanzando porcentajes de eliminación de nutrientes del 59% para P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> y del 93 % para el N total a 0.3 l/día.
5. El aporte de lixiviado, rico en nutrientes, puede permitir aumentar la productividad de biomasa a la par que depura estos medios. El porcentaje de lixiviado a añadir se debe optimizar, sugiriendo los datos observados en bibliografía ensayar porcentajes de aporte de lixiviado superiores al aquí ensayado (10% v) e inferiores al 25% v.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Acíen Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., Magán, J.J., & Molina Grima, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1344-1353.
- Araujol, I., & Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(2), 94-108.
- Arce Portugal, J.A. (2018). *Caracterización fisicoquímica de biodiesel a partir de la microalga Chlorella vulgaris, obtenida en fotobioreactor tubular*. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú.
- Arnon, D.I., McSwain, B.D., Tsujimoto, H.Y., & Wada, K. (1974). Actividad fotoquímica y componentes de preparaciones de membrana a partir de algas verdeazuladas. La coexistencia de dos fotosistemas en relación con la clorofila a y la eliminación de ficocianina. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 357(2), 231-245.
- Baker, N.R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59(1):89–113.
- Barona Altamirano, A.C. (2014). *Determinación del potencial antimicrobiano de la microalga Chlorella extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Tilulum y el Socavón del cantón Ambato*. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. En Richmond A (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 312-351).
- Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70(1), 313-321.
- Butler, W.L. (1978). Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 345-378.
- Campbell, D.A., & Tyystjärvi, E. (2012). Parameterization of photosystem II photoinactivation and repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(1), 258-265.
- Canovas, S., Picot, B., Casellas, C., Zulkifi, H., Dubois, A., & Bontoux, J. (1996). Seasonal development of phytoplankton and zooplankton in a high-rate algal pond. *Water Science and Technology*, 33(7), 199.
- Carvajal Proaño, M.G. (2017). *Optimización de la hidrólisis enzimática de Scenedesmus almeriensis para la aplicación como biofertilizante*. Universidad de Almería, España.
- Castro Bustamante, J. (2018). *Diseño de una planta piloto para el crecimiento de microalgas heterótrofas*. Universidad de Valladolid, España.
- Cerón García, M.C. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *Cuadernos de estudios agroalimentarios*, (5), 83-101.

- Céspedes Bernal, D.N. (2019). *Tratamiento terciario de aguas residuales no domésticas empleando Chlorella sp. y conversión de la biomasa microbiana por pirólisis lenta*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Chawla, P., Malik, A., Sreekrishnan, T.R., Dalvi, V. & Gola, D. (2020). Selection of optimum combination via comprehensive comparison of multiple algal cultures for treatment of diverse wastewaters. *Environmental Technology and Innovation*, 18, 100758. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100758>
- De la Noüe, J., & Basseres, A. (1989). Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biological wastes*, 29(1), 17-31.
- De Oliveira, C.Y.B, Lima, J., de Oliveira, C.D.L., Lima, P.C., Gálvez, A.O. & de Macedo Dantas, D.M. (2019). Crecimiento de *Chlorella vulgaris* utilizando aguas residuales de la cría de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) en un sistema de biofloc de baja salinidad. *Acta Scientiarum. Tecnología*, 42(1), e46232. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.46232>
- De Souza Celente, G., Colares, G.S., Machado, Ê.L., & Lobo, E.A. (2019). Algae turf scrubber and vertical constructed wetlands combined system for decentralized secondary wastewater treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(10), 9931-9937. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04425-6>
- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J., & Guerrero, M.G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (*Chlorophyta*). *Journal of Biotechnology*, 76(1), 51-59.
- Gamarra Santos, G.J. (2019). *Optimización de la producción de microalgas en fotobiorreactores externos*. Universidad de Almería, España.
- García González, M., Moreno, J., Manzano, J.C., Florencio, F.J., & Guerrero, M.G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of biotechnology*, 115(1), 81-90.
- García, J., Hernández Mariné, M., & Mujeriego Sahuquillo, R. (1998). Tratamiento de aguas residuales urbanas mediante lagunas de alta carga: evaluación experimental. *Ingeniería del agua*, 5(2), 35-50.
- Ge, S. & Champagne, P. (2016). Eliminación de nutrientes, crecimiento de biomasa de microalgas, cosecha y producción de lípidos en respuesta a las cargas de aguas residuales concentradas. *Water research*, 88, 604-612.
- Ge, S., Qiu, S., Tremblay, D., Viner, K., Champagne, P., & Jessop, P.G. (2018). Centrate wastewater treatment with *Chlorella vulgaris*: simultaneous enhancement of nutrient removal, biomass and lipid production. *Chemical Engineering Journal*, 342, 310-320.
- Ghafari, S., Hasan, M., & Aroua, M.K. (2008). Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater-A review. *Bioresource technology*, 99(10), 3965-3974.

- Gómez Serrano C., Escudero, R., Morales Amaral, M.D.M., Figueroa, F.L., Fernández Sevilla, J.M., & Acién Fernández, F.G. (2013) Use of secondary-treated wastewater for the production of *Muriellopsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(5), 2239-2249.
- Gómez Serrano, C., Morales Amaral, M.D.M., Acién Fernández, F.G., Escudero, R., Fernández Sevilla, J.M., & Molina Grima, E. (2015). Utilization of secondary-treated wastewater for the production of freshwater microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(16), 6931-6944.
- Gómez Serrano, C. (2017). *Producción de microalgas acoplada al tratamiento de aguas residuales. Microalgae production coupled with wastewater treatment*. Universidad de Almería, España.
- Goto, M., Nagao, N., Yusoff, F.M., Kamarudin, M.S., Katayama, T., Kurosawa, N., . . . Toda, T. (2018). High ammonia tolerance on growth rate of marine microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Biology*, 39(5), 843-848. [https://doi.org/10.22438/jeb/39/5\(SI\)/4](https://doi.org/10.22438/jeb/39/5(SI)/4)
- Gouveia, L., & Empis, J. (2003). Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 227-233.
- Guevara Naranjo, G.V. (2019). *Cuantificación de metales pesados de muestras de lixiviado provenientes de residuos sólidos urbanos del relleno sanitario del cantón Baños de Agua Santa*. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- He, P.J., Mao, B.L.F., Shao, L.M., Lee, D.J., & Chang, J.S. (2013). The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, 146, 562-568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.111>
- Hernández, B. (2010). *Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas*. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Hernández Pérez, A., & Labbé, J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Instituto Nacional de Estadística (2008). Estadísticas e indicadores del agua. *Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadística*.
- Kim, J., Lingaraju, B.P., Rheume, R., Lee, J.Y., & Siddiqui, K.F. (2010). Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua science and technology*, 15(4), 391-396.
- Lau, P.S., Tam, N.F.Y., & Wong, Y.S. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, 89(1), 59-66.
- Ledda, C., Romero Villegas, G. I., Adani, F., Acién Fernández, F. G., & Molina Grima, E. (2015). Utilization of centrate from wastewater treatment for the outdoor production of *Nannochloropsis gaditana* biomass at pilot-scale. *Algal Research*, 12, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.002>

- Lewandowski, I., Lippe, M., Montoya, J.C., Dickhöfer, U., Langenberger, G., Pucher, J., ... & Lippert, C. (2018). Primary production. In I, Lewandowski (Ed.), *Bioeconomy: Shaping the transition to a sustainable, biobased economy* (pp. 97-178).
- Lim, S.L., Chu, W.L., & Phang, S.M. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, 101(19), 7314-7322. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.092>
- Magnotti, C., Lopes, R., Derner, R. & Vinatea, L. (2016). Uso de agua residual de un sistema BFT de cultivo de camarones marinos. Parte I: eliminación de nutrientes y producción de biomasa de microalgas marinas. *Investigación sobre acuicultura*, 47(8), 2435-2443.
- Mena Bolaños, D.V. (2019). *Evaluación de la respuesta fisiológica de la microalga Chlorella sp. a la presencia de metal cromo (VI) en aguas sintéticas*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Ecuador.
- Mera, M., Recalde, E., & Lema, K. (2020). Evaluación de soluciones de microalgas (*Scenedesmus* sp.) como bioestimulante natural en el cultivo hidropónico de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista científica Axioma*, 1(21), 53-60.
- Mihelcic, J., & Zimmerman, J.B. (2011). *Ingeniería ambiental: fundamentos, sustentabilidad, diseño*. Alfaomega.
- Ministerio de agricultura (1982). Métodos oficiales de análisis: suelos y aguas. *Ed. Ministerio de Agricultura, Madrid*.
- Molazadeh, M., Danesh, S., Ahmadzadeh, H., & Pourianfar, H.R. (2019). Influence of CO<sub>2</sub> concentration and N:P ratio on *Chlorella vulgaris*-assisted nutrient bioremediation, CO<sub>2</sub> biofixation and biomass production in a lagoon treatment plant. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 96, 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.01.005>
- Molina Grima, E., Camacho, F.G., Perez, J.S., Sevilla, J.F., Fernández, F.A., & Gomez, A.C. (1994). A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology*, 61(2), 167-173.
- Molina Grima, E., Fernández, J., Acien Fernández, F. G., & Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of biotechnology*, 92(2), 113-131.
- Morales Amaral, M.D.M., Gómez Serrano, C., Acien Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., & Molina Grima, E. (2015). Production of microalgae using centrate from anaerobic digestion as the nutrient source. *Algal Research*, 9, 297-305.
- Morales Amaral, M.D.M. (2016). *Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos*. Universidad de Almería, España.

- Naderi, G., Tade, M.O., & Znad, H. (2015). Fotobiorreactor modificado para biofijación de dióxido de carbono por *Chlorella vulgaris* a diferentes intensidades de luz. *Ingeniería Química y Tecnología*, 38(8), 1371-1379.
- Navinta Huashuayo, N.L. (2019). *Tasa de filtración (TF), en juveniles y adultos, de la almeja Anodontites trapesialis para las microalgas Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus y Anabaena sp. a diferentes concentraciones y temperaturas.* Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú.
- Nelson, N., & Yocum, C.F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 521-565.
- Olguín, E.J. (2012). Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1031-1046.
- Orfanos, A.G., & Manariotis, I.D. (2019). Algal biofilm ponds for polishing secondary effluent and resource recovery. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1765-1772.
- Oswald, W.J., & Gotass, H.B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Amer. Soc. Civil Engrs.*, 122(1), 73-105.
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., & Shilton, A.N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Park, K.H., & Lee, C.G. (2001). Eficacia de la luz intermitente para aumentar la eficiencia fotosintética de los cultivos de microalgas sobre una densidad celular crítica. *Biotecnología e Ingeniería de Bioprocesos*, 6(3), 189.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17-25.
- ¿Qué es la demanda biológica de oxígeno? - Lexikon. (2020). Retrieved 26 April 2020, from <https://www.grafiberica.com/depositos-soterrados/como-recuperar-agua-del-luvia/lexico/begriff/demanda-biologica-de-oxigeno-dbo5.html>
- Rajesh, K., Rohit, M.V., & Mohan, S.V. (2017). Microalgae-based carotenoids production. *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology. Elsevier.* (pp. 139-147). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00007-2>
- Ramalho, R.S. (1996). *Introduction to Wastewater Treatment Processes.* Reverté, S.A.
- Ramos, F.D., Díaz, M.S., & Villar, M.A. (2016). Biocombustibles. *Universidad Nacional del Sur-Conicet*, 25(147), 69-73.
- Ramos, R., & Pizarro, R. (2018). Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de biología marina y oceanografía*, 53(1), 75-86.

- Reol, E.M. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Revista Ecosistemas*, 12(1).
- Rizzo, F., Zucchelli, G., Jennings, R., & Santabarbara, S. (2014). Wavelength dependence of the fluorescence emission under conditions of open and closed photosystem II reaction centres in the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Biochimica Et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(6), 726-733. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.02.009>
- Rodríguez González, A.M., & Serrano Luna, F.A. (2012). *Efecto de la relación carbono/nitrógeno en la productividad de biomasa y lípidos en cultivos de Chlorella vulgaris UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala de laboratorio*. Universidad Industrial de Santander, España.
- Romero Villegas, G.I., Fiamengo M., Ación Fernández, F.G., & Molina Grima, E. (2017). Outdoor production of microalgae biomass at pilot-scale in seawater using centrate as the nutrient source. *Algal Research*, 25, 538-548.
- Romero Villegas, G.I. (2018). *Producción de biomasa microalgal en exterior utilizando lixiviado como fuente de nutrientes*. Universidad de Almería, España.
- Romero Villegas, G.I., Fiamengo M., Ación Fernández, F.G., & Molina Grima, E. (2018a). Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at pilot-scale in flat-panel photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 284, 102-114.
- Romero Villegas, G.I., Fiamengo M., Ación Fernández, F.G., & Molina Grima, E. (2018b). Utilization of centrate for the outdoor production of marine microalgae at pilot-scale in raceway photobioreactors. *Journal of Environmental Management*, 228, 506-516.
- Ruiz Marín, A., Mendoza Espinosa, L.G., & Stephenson, T. (2010). Crecimiento y eliminación de nutrientes en algas verdes libres e inmovilizadas en cultivos discontinuos y semicontinuos que tratan aguas residuales reales. *Bioresource Technology*, 101(1), 58-64.
- Santos Montes, A.M., González Arechavala, Y., & Martín Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas.
- Sepúlveda, C., Ación, F.G., Gómez, C., Jiménez Ruiz, N., Riquelme, C., & Molina Grima, E. (2015). Utilization of centrate for the production of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Algal Research*, 9, 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.004>
- Spolaore, P., Joannis Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Aplicaciones comerciales de microalgas. *Revista de biociencia y bioingeniería*, 101(2), 87-96.
- Stolz, P., & Obermayer, B. (2005). Fabricación de microalgas para el cuidado de la piel. Cosméticos y artículos de tocador, 120(3), 99-106.
- Sutherland, D.L., Howard Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., & Craggs, R.J. (2015). Mejora de la fotosíntesis de microalgas y la productividad en el tratamiento de aguas residuales en estanques de algas de alta velocidad para la producción de biocombustibles. *Bioresource Technology*, 184, 222-229.

- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., & Zhong, J. (2011). CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology*, *102*(3), 3071-3076. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.047
- Tebbutt, T.H.Y. (1983). Sampling and Analysis. En *Pergamon Press. UK (Ed.), Principles of water quality control* (pp. 19-28). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-028704-1.50008-4>
- Valdés Santiago, L., Ayala Islas, A., & Colli Mull, J.G. (2018). Hacia el reemplazo de pesticidas químicos: Explorando las microalgas para su uso en control biológico. En Fundación para la Educación Superior Internacional, A.C. (Ed.), *El impacto de la integración disciplinaria de la ingeniería y las ciencias químicas, en la innovación y el desarrollo sostenible* (pp. 366-382).
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., ... & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, *162*(4), 1174-1186.
- Wong, Y.K., Ho, Y.H., Ho, K.C., Leung, H.M., & Yung, K.K.L. (2017). Maximization of cell growth and lipid production of freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by enrichment technique for biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(10), 9089-9101.