

Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento

• César Carlos García-Gozalbes* •
Universidad de Cádiz, España

*Autor de correspondencia

• Zouhayr Arbib •
Aqualia, España

• José Antonio Perales-Vargas-Machuca •
Universidad de Cádiz, España

Resumen

García-Gozalbes, C.C., Arbib, Z. & Perales-Vargas-Machuca, J. A. (enero-febrero, 2015). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(1), 49-68.

El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio de la velocidad de crecimiento y de consumo de nitrógeno y fósforo de un *bloom* de microalgas cultivadas en aguas residuales urbanas con diferente nivel y tipología de tratamiento. Para ello se han cultivado las microalgas por duplicado en discontinuo bajo condiciones controladas de temperatura, luz y aireación, en cuatro medios de ensayo, consistentes en cuatro aguas residuales: (1) salida de pretratamiento; (2) efluente de decantación secundaria; (3) efluente de un reactor anaerobio de flujo ascendente denominado UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), y finalmente, (4) mezcla de efluente del UASB y agua de secundario, todas de la misma estación depuradora de aguas residuales urbanas. La modelización cinética para el análisis de resultados con los modelos de Verhulst y el Photobiotreatment model indica una evolución temporal diferente de la concentración de biomasa, N y P total disueltos, respectivamente, en los diferentes medios de ensayo. La productividad es mayor en los ensayos con agua procedente del biorreactor UASB ($0.094 \text{ g SS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$). En este medio de cultivo, la velocidad de eliminación del nitrógeno no presenta diferencia con el resto de aguas residuales utilizadas en el ensayo, mientras que en el caso del fósforo, la eliminación es la menor de entre todos los medios estudiados.

Palabras clave: aguas residuales urbanas, eliminación de nutrientes, microalgas, fotobiorreactor, modelo cinético.

Abstract

García-Gozalbes, C.C., Arbib, Z. & Perales-Vargas-Machuca, J. A. (January-February, 2015). Growth Kinetics and Nutrient Uptake of Microalgae in Urban Wastewaters with Different Treatment Levels. *Water Technology and Sciences (in Spanish)*, 6(1), 49-68.

The main objective of this work was to study the speed of growth and nitrogen and phosphorus uptake in a bloom of cultured microalgae in urban wastewater receiving different levels and types of treatment. To this end, microalgae were cultured in duplicate with discontinuity under controlled temperature, light and aeration conditions. Four test media were used consisting of four wastewater effluents: (1) pretreatment, (2) secondary clarifier, (3) UASB bioreactor (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) and (4) mixture of UASB and secondary wastewater. All were obtained from the same urban wastewater treatment station. Verhulst and Photobiotreatment models were used to analyze the results. The study found different temporal evolutions of the biomass concentration and total dissolved N and P with the different media tested. Productivity was greater in tests with water from the UASB reactor ($0.094 \text{ g SS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$). In this culture medium, the speed at which nitrogen was removed was similar to the rest of the wastewater tested while phosphorus removal was slower than the other media studied.

Keywords: Urban wastewater, nutrient removal, microalgae, photo-bioreactor, kinetic model.

Recibido: 15/01/14
Aceptado: 26/08/14

Introducción

El continuo deterioro del medio ambiente debido a la incorporación de contaminantes de origen antropogénico, y más concretamente en los sistemas acuáticos, tiene un impacto negativo directo en la calidad del agua. Una de las principales fuentes de contaminación del agua son las aguas residuales urbanas. En este sentido, el aumento de la urbanización y la expansión de la población urbana han dado lugar a una mayor cantidad de aguas residuales municipales.

La composición de las aguas residuales es un reflejo de los estilos de vida y las tecnologías para la producción de la sociedad (Gray, 1989). El agua residual contiene sustancias indeseadas, como materia orgánica, sólidos en suspensión, compuestos inorgánicos (principalmente nitrógeno y fósforo) y/o compuestos xenobióticos. Se estima que más de 80% del agua utilizada en todo el mundo no se recoge ni se trata (UNEP, 2010). Por tanto, existe la necesidad de inversión y mejora en los procesos de recogida, tratamiento y eliminación de aguas residuales.

El estado del arte en las tecnologías de tratamiento se ha visto reforzado de manera positiva por el apoyo científico y el interés público. El proceso de tratamiento de aguas residuales urbanas convencional consiste básicamente en cuatro etapas: pretratamiento (desbaste, desarenado y desengrasado); tratamiento primario; tratamiento secundario (en la mayoría de las estaciones depuradoras convencionales, esta etapa consiste en un proceso biológico aerobio denominado lodos activos, aunque también en algunos países como Brasil se está generalizando el uso de tratamientos anaerobios, como los reactores UASB, Upflow Anaerobic Sludge Blanket); y finalmente, la etapa de tratamiento de los lodos generados, que suele incluir un proceso de concentración, otro de estabilización vía biológica o química, y por último, una deshidratación del mismo. Los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales urbanas no se concibieron para eliminar los

compuestos inorgánicos como el nitrógeno y el fósforo; para conseguir eliminar estos dos compuestos hasta niveles aceptables de vertido, se necesitan métodos avanzados tanto biológicos (AO: anaerobio aerobio; A2O: anaerobio anóxico aerobio; Bardenpho, etc.) como químicos (precipitación química del fósforo). La Directiva 91/271/CEE establece niveles de vertido de nitrógeno y fósforo muy estrictos cuando se vierte en zona sensible, debido de manera fundamental a que estos dos compuestos son los principales causantes de los procesos de eutrofización. El concepto de eutrofización está definido por la Comisión Europea en su Directiva 91/271/CEE (European Commission Directive, 1998) como: “«eutrofización» se entenderá como el aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno o de fósforo, que provoca un crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta”. Así, la eutrofización se presenta como uno de los principales problemas a los que se enfrenta hoy en día la gestión de las aguas superficiales (Smith & Schindler, 2009) y una amenaza grave a largo plazo para la salud y el funcionamiento de los ecosistemas hídricos de todo el mundo (Kennish & De Jonge, 2012). La reducción en el uso de compuestos de nitrógeno y fósforo, cuando sea posible, seguido de la disminución de la concentración de estos nutrientes en efluentes de depuradoras de aguas residuales mediante tratamientos adecuados son medidas para frenar la eutrofización de los sistemas acuáticos a nivel global. La tecnología de microalgas para la eliminación de N y P es una alternativa potencial a las tecnologías biológicas convencionales (Ruiz *et al.*, 2011).

El cultivo de microalgas tiene aplicaciones prácticas significativas a corto plazo, porque permite eliminar nutrientes (nitrógeno y fósforo) de manera eficiente y por lo tanto puede desempeñar un papel importante en el tratamiento terciario de aguas residuales (Arbib *et al.*, 2013). En la práctica, en un fotobiorreactor

con microalgas se han conseguido eficacias superiores a 90% de eliminación de nitrógeno y/o fósforo (De Pauw, Bruggeman, & Persoone, 1978; Shelef, Azov, Moraine, & Oron, 1980; Martin, Picard, & De la Noüe, 1985; Arbib *et al.*, 2013). En comparación con los actuales procesos convencionales, con el cultivo de microalgas se genera biomasa susceptible de convertirse en materia prima para la producción de una elevada variedad de combustibles biológicos, tales como biogás (Brune, Lundquist, & Benemann, 2009), biodiesel (Gouveia & Oliveira, 2009) o biohidrógeno (Rashid *et al.*, 2013). Además, se oxigena el agua del efluente de la estación depuradora y se reducen gases de efecto invernadero emitidos a la atmósfera (Velan & Saravanane, 2013). Esta tecnología también permitiría el reciclaje de los nutrientes como fertilizantes (Dawson & Hilton, 2011), con importantes beneficios ambientales y económicos. Sin embargo, esta tecnología todavía requiere un esfuerzo considerable en investigación, desarrollo e innovación (I+D+I), que facilite el avance científico y tecnológico, para pasar de las plantas piloto a escala comercial (Benemann, 2009).

La diferente bibliografía revisada en este estudio mantiene que no existe un acuerdo sobre la ubicación más adecuada del fotobiorreactor de microalgas dentro del diagrama de flujo de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR). Algunos autores (Cabanelas *et al.*, 2013) proponen un proceso anaerobio para la reducción de materia orgánica del agua residual seguido de un fotobiorreactor de microalgas para la reducción de nutrientes. Otros (Arbib *et al.*, 2013) proponen el uso de fotobiorreactores como tratamiento “fin de línea” a continuación del tratamiento secundario del agua residual, e incluso hay autores (Liang, Sarkany, & Cui, 2009) que proponen el uso de cultivos mixotróficos de bacterias-microalgas y localizar este tipo de sistemas después del tratamiento primario.

Los modelos cinéticos son una herramienta indispensable para el estudio de la producti-

vidad de microalgas. Estos modelos no sólo proporcionan una base para el diseño del reactor, sino también para la mejora de procesos a través de facilitar la exploración de diversas condiciones ambientales y de funcionamiento (Ruiz *et al.*, 2012). Recientemente, el modelo de Verhulst (Verhulst, 1838) se ha utilizado como un modelo de crecimiento fundamental en estudios con fotobiorreactores (Ruiz *et al.*, 2013) debido a su simplicidad matemática y definición biológica sencilla.

Partiendo de la hipótesis inicial de que las microalgas pueden ser cultivadas empleando aguas residuales urbanas y que la productividad volumétrica de biomasa algal puede depender del grado de tratamiento que hubiese sufrido el agua, puesto que a su vez en función de éste así será el contenido en nutrientes y la turbidez del medio, el presente trabajo tiene el propósito de estudiar la cinética de crecimiento y de consumo de nutrientes de un *bloom* natural de microalgas cultivadas en aguas residuales urbanas sometidas a diferentes tipos de tratamiento, con el objeto de aportar datos que permitan decidir la mejor disposición de este tipo de biotecnología en el diagrama de flujo de una estación depuradora de aguas residuales urbanas convencional.

Material y métodos

Microalga empleada

Como inóculo para la realización de los ensayos se empleó un *bloom* de microalgas (95% de dominancia de *Coelastrum* sp.), procedentes de un fotobiorreactor piloto tipo Raceway de 9.6 m³, alimentado en continuo con el efluente de un reactor anaerobio piloto UASB de 20 m³, alimentado con agua residual procedente de la salida de pretratamiento de la EDAR de El Torno (Chiclana de la Frontera, Cádiz; 36° 25' 38.15" N, 6° 9' 23.9" W) y que forma parte de la infraestructura del proyecto del VII Programa Marco de la Unión Europea, denominado ALL-GAS (<http://www.all-gas.eu/Pages/default.aspx>).

Condiciones de ensayo

Para la realización de los experimentos se emplearon como fotobiorreactores frascos de borosilicato PYREX® de 2 000 ml de capacidad, los cuales contenían un volumen de 2 l de medio de cultivo, que fue inoculado con un volumen adecuado de inóculo preconcentrado por centrifugación (3 000 g durante un minuto), de modo que todos los experimentos partían de una concentración de biomasa similar y próxima a los 350 mg SS l⁻¹. Las condiciones de operación fueron las siguientes: aireación constante de 2 l min⁻¹ (proporcionada por un compresor de membrana Phoenix MKC-510V); fotoperiodo de 14:10 horas de luz:oscuridad; intensidad de luz de 175 μmol m⁻² s⁻¹ (proporcionada por dos lámparas fluorescentes FSL T8 36W/865), y una temperatura de 24 ± 1 °C. En la figura 1 se muestra el dispositivo experimental.

Medios de cultivo y diseño experimental

Se tomaron tres muestras de efluentes de la planta de tratamiento de El Torno: en un punto localizado entre el pretratamiento y el tratamiento primario; a la salida de tratamiento secundario y del efluente del reactor UASB. Las muestras se conservaron a 4 °C hasta su uso.

A partir de estas muestras de agua residual se obtuvieron los cuatro medios de cultivo empleados en el experimento. Cada medio

constituyó un reactor y su réplica ('). El primero de ellos (Medio 1, M1 – reactor TPM1 y TPM1') se obtuvo después de dejar decantar el agua procedente de pretratamiento durante 16 horas. La razón de realizar esta operación y no usar directamente agua procedente de la salida de los decantadores primarios se debe a que en la EDAR de El Torno se dosifica sulfato férrico al agua residual antes del tratamiento primario y la presencia de este coagulante podría interferir en los resultados del ensayo. El segundo medio de cultivo (Medio 2, M2 – reactor TSM2 y TSM2') estaba constituido por agua efluente del decantador secundario. El tercer medio de cultivo (Medio 3, M3 – reactor UASB y UASB') estaba constituido por el agua del efluente de la unidad UASB. Por último se preparó un cuarto medio de cultivo (Medio 4, M4 – reactor TSM2 + UASB y TSM2 + UASB'), consistente en una mezcla de agua procedente del efluente del UASB y del decantador secundario, en una proporción 1/1, al objeto de diluir el efluente del UASB que podría contener una excesiva concentración de amonio que inhibiese al crecimiento de las microalgas (Wang, Wang, Chen, & Ruan, 2010).

Métodos analíticos

Temperatura y pH

Diariamente se tomaron muestras y se midieron electroquímicamente los valores de pH (pH-metro GLP 32, CRISON®); asimismo, se realizó un registro de la temperatura tanto en el exterior de la cámara de cultivo como en el interior de los reactores (utilizando un termómetro digital de sonda HI 98509). Además, se realizó un seguimiento diario de la evolución de las especies de microalgas en el bloom por observación al microscopio.

Biomasa

La concentración de la biomasa se determinó diariamente tanto de forma indirecta por densidad óptica (680 nm) como de forma



Figura 1. Fotografía de los ocho fotobiorreactores.

directa mediante medida gravimétrica de los sólidos en suspensión. Para la medida por densidad óptica, las muestras fueron diluidas en las proporciones adecuadas, para garantizar que los valores medidos estuvieran dentro del rango de detección del espectrofotómetro. Para la medida de sólidos en suspensión se utilizó el método normalizado APHA-2540 D (APHA-AWWA-WEF, 1992), determinando el peso seco por gravimetría mediante filtros de fibra de vidrio (GF/F CAT núm. 1825-047, Whatman™).

Para determinar la composición elemental del inóculo, se centrifugó (3 000 g durante un minuto) un volumen adecuado para obtener aproximadamente 1 g de pellet de biomasa, cantidad necesaria para realizar, previo secado por liofilización, un análisis elemental de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre mediante un analizador CHNS-932 Leco® (Anon, 1991) y de fósforo mediante espectrometría de emisión atómica ICP-AES (EPA, 2008), previa digestión por microondas con un sistema Speedwave® (Berghof, 2008). Cada uno de los elementos analizados se determinó por triplicado, excepto en el caso del fósforo, que se realizó por duplicado.

Determinación de DQO, nitrógeno y fósforo total

La determinación del contenido en materia orgánica y nutrientes durante el ensayo se realizó a muestras previamente filtradas (GF/F CAT núm. 1825-047, Whatman™). La DQO₅ se determinó al inicio y al final del ensayo por oxidación ácida en caliente con dicromato de acuerdo con el método normalizado APHA-5220 D (APHA-AWWA-WEF, 1992). La concentración de nitrógeno en forma de nitratos (N-NO₃), amonio (N-NH₄) y nitritos (N-NO₂) se midió al inicio y al final del ensayo colorimétricamente de acuerdo con los métodos de Müller y Weidemann (1955), APHA 4500-NH₃ D y APHA 4500-NO₂ B (APHA-AWWA-WEF, 1992), respectivamente. La concentración de fósforo en forma de fosfatos (P-PO₄) se midió al inicio y al final del ensayo colorimétricamente

de acuerdo con el método normalizado APHA 4500-P-E (APHA-AWWA-WEF, 1992). Por último, la concentración de fósforo y nitrógeno total fue medida diariamente por oxidación previa de la muestra filtrada con Oxysolve® (Köthe & Bitsch, 1992), y posterior análisis de fosfatos y nitratos, respectivamente.

Análisis estadístico

Con los datos de evolución temporal de la concentración de biomasa, nitrógeno y fósforo, se modeló tanto la cinética de crecimiento de biomasa como el consumo de nutrientes de acuerdo con los modelos de Verhulst (1838) utilizado por Ruiz *et al.* (2013) y el *Photobiotreatment model* (PhBT) desarrollado por Ruiz *et al.* (2012). Para esta modelización se emplearon técnicas de regresión no lineal, empleando la herramienta *Microsoft Excel Solver* (versión 7.0 Microsoft®) (Walsh & Diamond, 1995), que utiliza el código de optimización no lineal GRG propuesto por Ragsdell (1975), y Fallahi, Hall y Ragsdell (1981), y después utilizado por Mariappan y Krishnamurty (1996) en algunas aplicaciones.

Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica de los medios de cultivo

Las principales características fisicoquímicas de los medios de cultivo antes de empezar el experimento, es decir, antes de ser inoculado con la microalga se muestran en el cuadro 1.

Evolución del pH

Tal y como puede observarse en la figura 2, el pH inicial promedio en los ocho reactores fue de 7.4 ± 0.2 . Al cabo de 24 horas, el pH sufrió un acusado ascenso en todos los reactores, siendo TSM2' y TSM2 + UASB' los ensayos en los que esta subida fue más acusada, alcanzándose valores de pH de 10. Por otro lado, también se observa cómo al final del ensayo se produce un

Cuadro 1. Características medias de los cuatro medios de cultivo.

Parámetros	M1	M2	M3	M4
pH	7.45	7.23	7.47	7.43
Sólidos en suspensión, SS (mg l^{-1})	130	39	41	42
Sólidos en suspensión volátiles, SSV (mg l^{-1})	98	35.5	39	40
N- NO_3 (mg l^{-1})	1.12	15.34	0.83	8.56
N- NH_4 (mg l^{-1})	21.30	4.15	18.91	13.59
N- NO_2 (mg l^{-1})	0.09	1.38	0.01	0.92
Nitrógeno total disuelto, N (mg l^{-1})	24.75	19.01	23.63	13.24
P- PO_4 (mg l^{-1})	5.34	0.17	5.32	2.40
Fósforo total disuelto, P (mg l^{-1})	5.02	0.23	4.80	2.43
N/P	5.0	82.65	4.9	5.5
DQO ₅ (mg l^{-1})	158	104.5	170	186

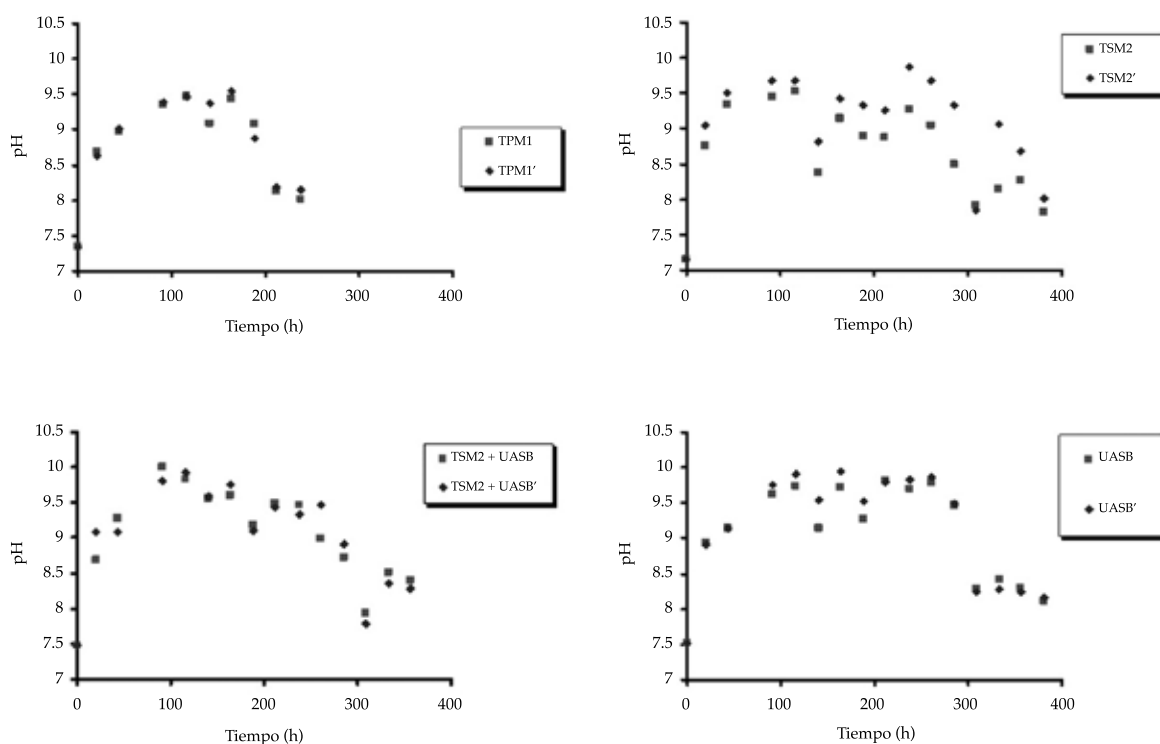
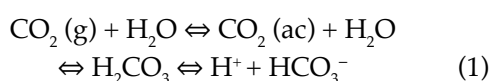


Figura 2. Evolución del pH en los diferentes medios de cultivo.

descenso del pH hasta valores en torno a ocho, valor que en el caso de los reactores TPM1 y TPM1' se alcanza aproximadamente a las 200 horas de ensayo y en el resto de reactores al cabo de unas 300 horas. El descenso del pH indica una parada de la actividad fotosintética.

Algunos trabajos, como el de Tang, Han, Li, Miao y Zhong (2011) muestran el mismo comportamiento del pH que se observa en el presente experimento, en el cual la actividad fotosintética de las microalgas en un medio de cultivo de aguas residuales conduce a un

aumento gradual en el pH debido al efecto sobre el equilibrio de especies carbonatadas en el agua. Durante la fase luminosa de la fotosíntesis, las microalgas asimilan CO_2 . El CO_2 , al disolverse en agua, forma moléculas de ácido carbónico (H_2CO_3). Este ácido se encuentra en una fracción 10^3 veces menor que el CO_2 disuelto (ac) debido a que en el agua se disocia con gran facilidad en protones H^+ e iones bicarbonato HCO_3^- , como se muestra en la ecuación (1):



A su vez, el ión bicarbonato, en presencia de agua, se disocia en iones H^+ e iones carbonato CO_3^{2-} (ecuación (2)):



De este modo, cuando un cultivo de microalgas se encuentra en fase exponencial de crecimiento, el consumo de carbono inorgánico disuelto (CID) (bien en forma de CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- o CO_3^{2-}) provoca un desplazamiento de los equilibrios, indicados en las ecuaciones (1) y (2), hacia una reducción de la concentración de protones H^+ y, por ende, un incremento del pH (Tang et al., 2011). La mayoría de especies de microalgas presentan un óptimo pH alrededor de la neutralidad. Sin embargo, especies como *C. littorale* (Schnackenberg, Ikemoto, & Miyachi, 1996) muestra las velocidades más altas de crecimiento en condiciones ácidas (pH ~ 4). Otras especies, como *Spirulina platensis* (Qiang, Zarmi, & Richmond, 1998), tienen su óptimo alrededor de nueve.

Crecimiento de la biomasa

En un cultivo en discontinuo, la curva de crecimiento de microorganismos más frecuente es de tipo logístico, como obtienen en sus estudios diversos autores, como Peleg, Corradini y Normand (2007). Esto mismo sucede en nuestro ensayo. En la figura 3 se

muestra la evolución del *bloom* de microalgas en los diferentes medios de cultivo. En cada curva se observan dos de las cuatro fases típicas del cultivo en discontinuo: fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria. La fase de adaptación es casi inexistente, debido a que el inóculo fue obtenido de un cultivo empleando también agua residual de la misma estación depuradora como medio. El ensayo se consideró finalizado cuando se alcanzó el estado estacionario, esto es, cuando los valores de concentración obtenidos en días consecutivos fueron similares. Como se puede observar en los datos experimentales representados por símbolos en la figura 3, en los reactores TPM1 y TPM1', el ensayo se finalizó a las 240 h, mientras que el resto de reactores se estabilizaron al cabo de unas 400 h de ensayo.

Si comparamos las figuras 2 y 3, vemos cómo los periodos donde el pH se mantiene en valores elevados coinciden con periodos en los que los cultivos se encuentran en fase exponencial de crecimiento. En todos los reactores, este periodo comienza en torno a las 100 h de ensayo, prolongándose desde las 190 h en el caso de TPM1 y TPM1' hasta las 270 h en el caso de UASB y UASB'. Esto parece confirmar la hipótesis de que la subida de pH ocurre por el consumo de CO_2 por parte de las microalgas.

Para cuantificar el crecimiento, los datos experimentales fueron ajustados al modelo logístico de Verhulst (1838). El modelo de Verhulst es un modelo cinético de crecimiento basado en los tiempos de generación de microorganismos (fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria), que se caracteriza por ser un modelo no mecanicista, ampliamente utilizado por otros autores (Peleg et al., 2007; Ruiz et al., 2012; Ruiz et al., 2013; Arbib et al., 2013).

El modelo de Verhulst (1838) se expresa matemáticamente según la ecuación (3):

$$\frac{\delta X(t)}{\delta t} = \mu X(t) \left[1 - \frac{X(t)}{X(m)} \right] \quad (3)$$

donde $\delta X(t)/\delta t$ es la velocidad de cambio de concentración de microorganismos; X_m , la

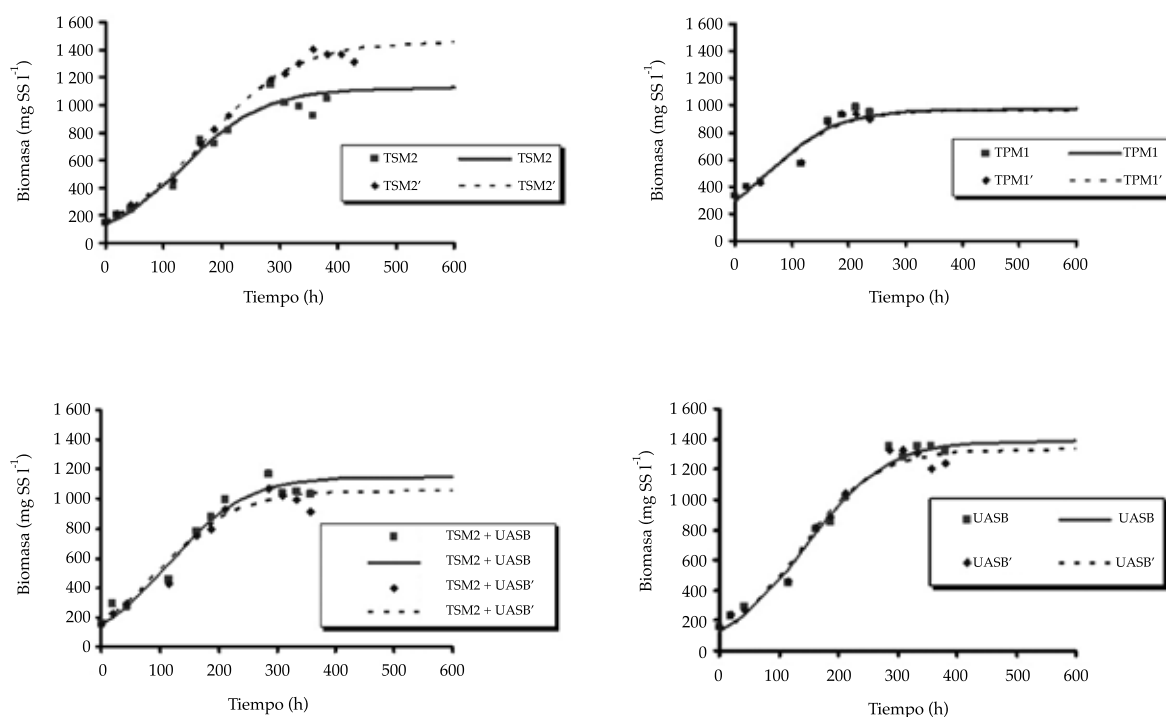


Figura 3. Evolución de la biomasa del *bloom* de microalgas en los diferentes medios de cultivo. Los símbolos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos previstos por el modelo.

concentración celular máxima que el sistema puede alcanzar en *discontinuo*, y μ es la tasa máxima específica de crecimiento.

La forma integrada de la ecuación sujeta a valor inicial $X_0 = X(t = 0)$ (ecuación (3)), se utilizó para describir los datos experimentales (ecuación (4)):

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}} \quad (4)$$

donde X es la concentración momentánea de microalgas y X_0 es la concentración inicial de biomasa.

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir del modelo se muestran en el cuadro 2. Podemos comprobar tanto en la figura 3 como en el cuadro 2 (valores del coeficiente de regresión R^2 superiores a 0.9) cómo el ajuste de los datos experimentales al modelo es bastante bueno, lo que sugiere una predicción fiable a partir de los datos experimentales.

En el cuadro 2 vemos cómo los parámetros X_0 , X_m y μ presentan valores muy similares entre sus réplicas, excepto en el caso de TSM2 y TSM2', sin que se hayan encontrado diferencias en las condiciones experimentales de ambos reactores que justifiquen esta diferencia.

Los valores de X_0 se encuentran comprendidos entre 130 y 160 mg SS l⁻¹, excepto en TPM1 y TPM1', donde se alcanzan valores de casi 300 mg SS l⁻¹. Si observamos el cuadro 1, vemos cómo el medio de cultivo M1 contiene alrededor de 130 mg SS l⁻¹, mientras que M2, M3 y M4 tienen alrededor de 40 mg SS l⁻¹. Esto es, TPM1 y TPM1' presentan de base un medio de cultivo con una concentración mayor en SS que el resto de reactores.

Por otro lado, en el cuadro 2 se observa también cómo X_m tiene una mayor variabilidad que μ , siendo los coeficientes de variación 0.16 y 0.09, respectivamente. Los valores de μ obtenidos tienen un promedio de 0.015 h⁻¹, del mismo orden de magnitud que los obtenidos

Cuadro 2. Parámetros cinéticos del crecimiento del *bloom* de microalgas por el modelo de Verhulst.

Nomenclatura	TPM1	TPM1'	TSM2	TSM2'	TSM2 + UASB	TSM2 + UASB'	UASB	UASB'
X_0 (mg SS l ⁻¹)	295.3	297.4	137.2	158.7	154.4	166.6	135.9	129
X_m (mg SS l ⁻¹)	971.6	967.4	1 126.3	1 469.3	1 150.8	1 054	1 392.5	1 332.1
μ (h ⁻¹)	0.016	0.016	0.014	0.012	0.016	0.016	0.015	0.016
R^2	0.95	0.96	0.96	0.99	0.97	0.95	0.99	0.98

por otros autores. Así, Samorì, Samori, Guerrini y Pistocchi (2013) obtuvieron valores de μ de 0.015 h⁻¹ para *Desmodesmus communis* utilizando agua residual efluente de tratamiento primario, rico en amonio (~ 30 mg N-NH₄ l⁻¹) y con unas condiciones de cultivo muy parecidas a las utilizadas en nuestro ensayo, excepto por la intensidad de luz, que fue más baja (88 μ mol m⁻² s⁻¹), y la adición controlada de CO₂ (2 %). Otros autores, como Ruiz *et al.* (2012) obtuvieron valores de μ alrededor de las 0.035 h⁻¹ para *Chlorella vulgaris* en aguas residuales, excepto el caso en el que utilizaron un medio sintético rico en amonio, donde se alcanzaron valores de μ de 0.06 h⁻¹. En la revisión de Griffiths y Harrison (2009) se recogen datos de tasas de crecimiento para 55 especies de microalgas, incluyendo *Chlorophytas*, cianobacterias y otros taxones, y se obtuvieron valores de μ de entre 0.028 h⁻¹ y 0.04 h⁻¹, en una amplia gama de configuración, diseño y escala del reactor bajo diversas condiciones de suministro de nutrientes.

Los valores obtenidos para X_m se encuentran comprendidos entre 967 y 1 469 mg SS l⁻¹ (cuadro 2). Otros autores, como Ruiz *et al.* (2012) obtuvieron resultados de entre 700 y 1 300 mg SS l⁻¹ en sus experimentos con *Chlorella vulgaris* en aguas residuales; Tang *et al.* (2011) obtienen como resultado de su estudio valores de X_m de entre 700 y 1 800 mg SS l⁻¹ para *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella pyrenoidosa*, experimentando en diferentes medios de cultivo con distintas dosificaciones de CO₂. Por otro lado, Patel, Barrington y Lefsrud (2012) obtienen resultados de entre 200 y 600 mg SS l⁻¹, experimentando en este caso en medio sintético con diferente

concentración de fósforo de partida, en especies de microalgas tanto de agua dulce (*Chlorella* sp., *Monoraphidium minutum* sp., y *Scenedesmus* sp.) como marinas (*Nannochloropsis* sp., *N. limnetica* sp. y *Tetraselmis suecica* sp.). Si comparamos los valores de X_m medios entre réplicas en nuestro ensayo, el valor medio más bajo registrado es de 969.5 mg SS l⁻¹, correspondiente al reactor TPM1, seguido de TSM2 + UASB (1 102 mg SS l⁻¹), TSM2 (1 298 mg SS l⁻¹); finalmente, el reactor en el que se alcanzó una mayor concentración de biomasa fue en el UASB, con un valor medio entre réplicas de 1 362.3 mg SS l⁻¹.

Entre los factores que influyen en el crecimiento de un cultivo de microalgas se encuentra la temperatura (T^a), como apuntan en sus trabajos Shelef, Moraine y Oron (1978), Heussler (1985), y Talbot, Thébault, Dauta y De la Noüe (1991), pero que descartamos porque la T^a se mantuvo constante durante todo el ensayo. Otro factor influyente es la intensidad de luz (Talbot *et al.*, 1991; Barbosa, Hoogakker, & Wijffels, 2003). A priori podríamos descartar la luz, porque todos los experimentos se han hecho con la misma intensidad de luz, pero aun siendo la misma la intensidad de luz incidente en los reactores, la disponibilidad de luz por parte de las microalgas depende además de la trayectoria de luz (ésta fue la misma en todos los reactores, pues todos tenían el mismo diámetro) y de la turbidez del medio de cultivo. Si se observan los valores de contenido en sólidos en suspensión de los medios de cultivo (cuadro 1), los datos sugieren que la turbidez del medio puede ser una característica determinante en el crecimiento máximo que alcanzan las microalgas del

cultivo en discontinuo. Para comprobarlo, se han correlacionado la concentración de sólidos en suspensión registrada al inicio del ensayo en todos los reactores (datos experimentales) con los valores de X_m (cuadro 2), y el resultado muestra una probabilidad próxima a 95% de correlación ($r = -0.69$, $p < 0.06$). De la misma manera, se han correlacionado los parámetros X_0 y X_m (calculados ambos por el modelo de Verhulst), y se ha encontrado que la correlación es significativa, e inversa ($r = -0.71$, $p < 0.05$), por lo que se puede afirmar que existe correlación entre la turbidez del medio de cultivo de los reactores y la máxima concentración alcanzada en discontinuo.

Otro factor influyente es la presencia de nutrientes como nitrógeno y fósforo. El nitrógeno y el fósforo son dos nutrientes necesarios en la mayoría de los escenarios de crecimiento, debiendo de existir para ello una correlación fuerte y directa entre concentraciones de nutrientes y parámetros cinéticos de crecimiento. Del mismo modo que con X_0 , se han correlacionado las concentraciones iniciales de nitrógeno y de fósforo total (datos experimentales) con X_m , no obteniéndose correlaciones significativas tanto para el nitrógeno ($r = -0.19$, $p < 0.66$) como para el fósforo ($r = -0.15$, $p < 0.73$). Otro factor limitante del crecimiento, y que puede afectar a X_m , es la presencia de oligoelementos (Hecky & Kilham, 1988), pero como el agua residual es una matriz muy compleja, en comparación con los medios sintéticos, partimos de que todos los medios poseen micronutrientes en concentraciones no limitantes.

Con el fin de comparar los diferentes reactores de nuestro ensayo bajo un único parámetro, se ha calculado la productividad en discontinuo. De acuerdo con Ruiz *et al.* (2012), a partir de los parámetros cinéticos del modelo de crecimiento de Verhulst en la fase de crecimiento exponencial, se puede calcular la productividad (P) de los reactores en discontinuo, definida como el tiempo transcurrido entre el instante en que se alcanza una concentración de biomasa de un 10%

superior a la inicial y el tiempo transcurrido en alcanzar un 90% de la máxima concentración de biomasa alcanzada en el reactor (ecuación (5)):

$$P = \frac{\mu(0.9X_m - X_0)}{\ln\left(\frac{9(X_m - 1.1X_0)}{1.1X_0}\right)} \quad (5)$$

donde P es la productividad volumétrica de la biomasa.

En la figura 4 se han representado los valores medios de P entre las réplicas (*). Podemos observar cómo el valor medio más bajo se alcanzó en el reactor TPM1* (0.071 g SS l⁻¹ d⁻¹) y el más alto se alcanzó en UASB* (0.094 g SS l⁻¹ d⁻¹). Además, se observa de manera gráfica que los reactores TPM1*, TSM2* y TSM2 + UASB* forman un conjunto con unas productividades en torno a 0.077 g SS l⁻¹ d⁻¹, mientras que el UASB* presenta una productividad diferenciada y un 10% más elevada.

Otros autores, como Ruiz *et al.* (2012), obtienen valores de productividad para *Chlorella vulgaris* del orden de 0.10 g SS l⁻¹ d⁻¹ en aguas residuales y 0.15 g SS l⁻¹ d⁻¹ en aguas residuales enriquecidas con nitrógeno, fósforo y micro nutrientes. Esta diferencia de productividad, con respecto a los valores obtenidos en nuestro

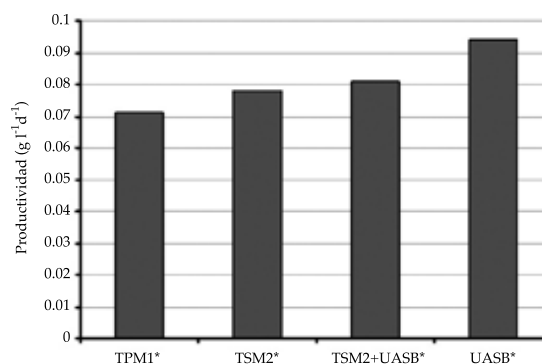


Figura 4. Representación de los valores medios de productividad de biomasa (g SS l⁻¹ d⁻¹), según el medio de cultivo en los diferentes reactores.

ensayo, podría deberse a que Ruiz *et al.* (2012) inyectaron gases de combustión con una proporción de un 5% de CO₂, para asegurar la disponibilidad de carbono disuelto. Además, las microalgas crecieron con una irradiancia un 40% superior a la empleada en nuestro ensayo. En otros trabajos, como el de Samorì *et al.* (2013), se obtienen productividades similares a las nuestras, siendo la más baja 0.018 g SS l⁻¹ d⁻¹ en un cultivo de *Desmodesmus communis* en un efluente primario, con una irradiancia de 88 µmol m⁻² s⁻¹, mientras que la más alta fue de 0.227 g SS l⁻¹ d⁻¹, que se registró en el mismo medio de cultivo, pero con alta irradiancia (440 µmol m⁻² s⁻¹) y un contenido en nitrógeno amoniacal superior a 80 mg N-NH₄ l⁻¹. En este caso, la adición de un 2% de CO₂ y las distintas intensidades de luz empleadas pueden explicar el rango de valores de productividad. Otros autores, como Cabanelas *et al.* (2013), trabajaron con *Chlorella vulgaris* cultivada en efluentes de diferentes procesos de tratamiento, con una irradiancia parecida a la empleada en nuestro ensayo y sin adición de CO₂. En este trabajo también se obtienen productividades similares a las nuestras, siendo el valor de productividad más bajo de 0.039 g SS l⁻¹ d⁻¹, en un efluente del decantador primario, que contiene de base 400 mg SS iniciales l⁻¹, mientras que el valor más alto es de 0.195 g SS l⁻¹ d⁻¹, en un efluente de centrado con una concentración de SS iniciales de 140 mg l⁻¹, 125 mg l⁻¹ de nitrógeno amoniacal y cerca de 60 mg l⁻¹ de fósforo total.

Eliminación de nutrientes

En un cultivo de microalgas, tanto en aguas residuales como en medios sintéticos, la eliminación de nutrientes se debe a la actividad de las microalgas (Ruiz *et al.*, 2012) directa e indirectamente. Directamente por asimilación de los nutrientes por las células para su incorporación a los procesos metabólicos e indirectamente a través de los procesos abióticos, como el aumento de pH por encima de nueve, como consecuencia de la metabolización del CO₂ por las microalgas. Si

comparamos la figura 3 con las figuras 5 y 6, vemos cómo los periodos en los que la biomasa algal crece de forma exponencial coinciden con los periodos en los que hay mayor eliminación de nutrientes. Esto parece confirmar que los procesos biológicos asociados con las microalgas juegan un papel importante en la eliminación de nutrientes.

Nitrógeno

En la figura 5 se muestra la curva de eliminación del nitrógeno total disuelto en los diferentes medios de cultivo. En los datos experimentales representados por símbolos se observa cómo se reduce la concentración de estos nutrientes en todos los reactores a lo largo del ensayo.

Como puede verse en la figura 5, los datos experimentales muestran que en todos los reactores, el contenido en nitrógeno total disuelto fue reducido a niveles por debajo de 10 ppm debido a la asimilación rápida de las algas entre los 3 y 5 días del inicio del cultivo. También se observa que partiendo de una concentración inicial muy parecida en todos los reactores, de alrededor de 29 ± 1 mg N l⁻¹, el porcentaje de eliminación medio entre réplicas fue de 74% para los reactores TSM2, TSM2 + UASB y UASB, mientras que para TPM1, el porcentaje de eliminación fue de 81%. Puesto que la pendiente de eliminación de N en TPM1 y TPM1' es la más pronunciada y los mayores porcentajes de eliminación se han alcanzado también en estos reactores, se sugiere que, en este caso, la eliminación de N no ha sido por asimilación sino por volatilización y que la parada del crecimiento ha podido deberse a otros factores, como que en estos reactores se partió de mayor concentración inicial de SS, se alcanzó la menor X_{máx} y sufrieron la subida más brusca de pH.

Para cuantificar la eliminación de nutrientes, los datos experimentales fueron ajustados al modelo PhBT (*Photobiotreatment*) (Ruiz *et al.*, 2012). El modelo PhBT es una herramienta sencilla y útil para describir experimentos en

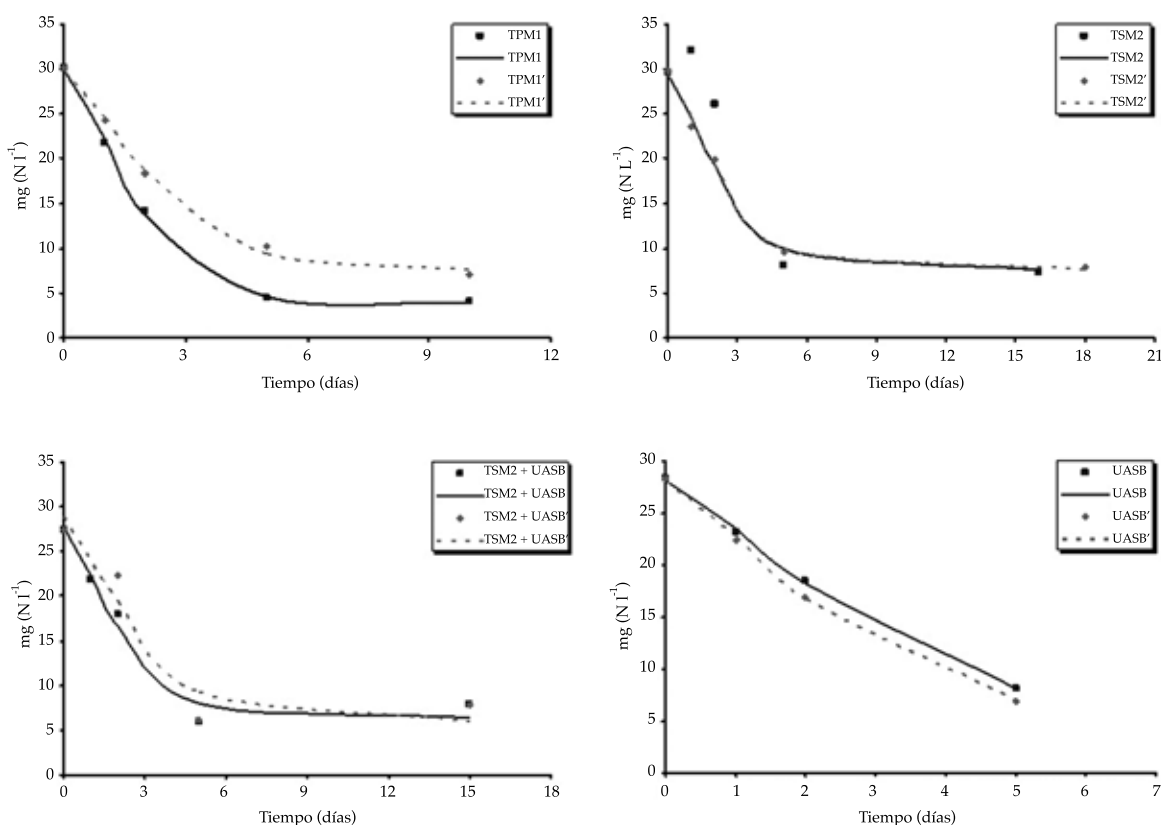


Figura 5. Eliminación de nitrógeno total disuelto de diferentes medios de cultivo por el bloom de microalgas. Los símbolos son los datos experimentales y las líneas representan la concentración de nutrientes prevista de acuerdo con el modelo.

discontinuo de eliminación de nutrientes por las microalgas. El modelo ha sido validado con experimentos de *Chlorella vulgaris* cultivadas en aguas residuales y en diferentes medios sintéticos (Ruiz et al., 2012).

En la ecuación (6) se expresa la cinética de consumo de sustrato por microorganismos (Quiroga, Perales, Romero, & Sales, 1999):

$$\frac{-\delta S}{\delta t} = kY \left[-S^2 + (S_{T0} + S_{na})S - S_{T0}S_{na} \right] \quad (6)$$

donde $\delta S(t)/\delta t$ es la velocidad de asimilación de sustrato; k , la constante cinética; Y , la relación de cantidad de biomasa producida por cantidad de sustrato consumido; S_{T0} la cantidad total inicial de sustrato (nutrientes

disueltos en el medio de cultivo junto con los nutrientes presentes en el inóculo), y S_{na} es la concentración de sustrato no asimilado.

Si se integra la ecuación anterior, considerando que $(A_0/Y) + S_0 = S_{T0}$ la expresión matemática del modelo PhBT se puede describir con la siguiente ecuación (7):

$$S = \frac{\left(\frac{A_0}{Y} + S_0 \right) (S_0 - S_{na}) - S_{na} \left(S_0 - \left(\frac{A_0}{Y} + S_0 \right) \right) e^{ut}}{(S_0 - S_{na}) - \left(S_0 - \left(\frac{A_0}{Y} + S_0 \right) \right) e^{ut}} \quad (7)$$

donde S_0 es la cantidad inicial de sustrato del medio de cultivo; A_0 , la cantidad de biomasa inicial, y $1/Y_0$ es el contenido en sustrato del inóculo, por lo que A_0/Y es la cantidad de sustrato incorporado con el inóculo.

Para cuantificar la eliminación del nitrógeno, los datos experimentales de concentración de nutrientes se utilizaron como S . El valor de $1/Y_0$ se obtuvo al analizar la composición del inóculo, mostrando un contenido de nitrógeno de 6.2% ($0.062 \text{ mg N mg}^{-1} \text{ SS}^{-1}$). El valor de A_0 fue calculado por diferencia entre la concentración de sólidos en suspensión al comienzo del experimento y la concentración de sólidos en suspensión en el medio de cultivo, antes de ser inoculado. De esta manera se obtuvieron dos valores para A_0 (cuadro 3); uno a partir de los valores experimentales ($A_{0\text{exp}}$) y otro a partir de los valores predichos por el modelo de Verhulst, X_0 (A_{0V}).

En el cuadro 3 se observan valores de biomasa inicial $A_{0\text{exp}}$ de entre 113 y 198 mg l^{-1} en TSM2 y TPM1, respectivamente, y con una media entre reactores de 136.5 mg l^{-1} . Para A_{0V} , los valores se encuentran entre 88 y 167.4 mg l^{-1} en los reactores UASB' y TPM1', respectivamente, y con una media de 121.8 mg l^{-1} . Como se observa en el cuadro 4, los valores de los parámetros cinéticos son muy similares, con independencia del valor de A_0 que utilizamos. Por todo ello, se eligió el valor medio entre las medias de $A_{0\text{exp}}$ y A_{0V} para los diferentes reactores, con un valor de 129.2 mg l^{-1} y que define, junto a $1/Y_0$ y S_0 , el ahora factor fijo S_{T0} sin afectar la modelización. Además, a la hora de aplicar el modelo, contamos con un parámetro menos de ajuste (S_{T0}), lo que simplifica el cálculo y ajusta mejor el resto de parámetros. De hecho, el ajuste fue muy bueno, como se puede observar en la figura 5, siendo el coeficiente de determinación mayor de 92% en todos los experimentos (cuadro 5). Asimismo, todos los parámetros cinéticos presentan valores con sentido físico (cuadro 5).

En el cuadro 5 se observa que ninguno de los valores para S_{na} en los distintos reactores supera el límite establecido (10-15 ppm) por la normativa europea en materia de depuración de aguas residuales urbanas (Directiva 98/15/CEE) al final del ensayo, siendo el valor más bajo 3.92 mg N l^{-1} en el reactor TPM1 y el más alto 7.65 mg N l^{-1} en TSM2'. Se alcanzaron porcentajes de reducción de alrededor de 80% en todos los medios de cultivo. Ruiz *et al.* (2012) obtienen eficiencias de eliminación de 100% en cultivos de *Chlorella vulgaris*, con concentraciones de sustrato no asimilados (S_{na}) por debajo de los límites de detección en todos sus experimentos, excepto en el caso del medio sintético rico en nitrógeno amoniacal, donde la inhibición de pH detiene el consumo de nutrientes y hace que este valor sea más alto ($14.9 \pm 1.1 \text{ mg N l}^{-1}$) y el porcentaje de reducción sea tan sólo del 50%. Otros autores, como Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa y Stephenson (2010), en condiciones muy parecidas a las de nuestro ensayo, obtienen para *Scenedesmus obliquus* eficiencias de eliminación de nitrógeno del 80-100%, partiendo de concentraciones iniciales de 27 mg N l^{-1} .

Con el fin de comparar la eliminación de nutrientes en los diferentes reactores de nuestro ensayo bajo un único parámetro, a partir de los parámetros cinéticos del modelo PhBT se ha calculado la velocidad de consumo de nutrientes ($-dS/dt$) para lo cual empleamos la siguiente ecuación:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{S_{90} - S_f}{t_{90} - t_f} \quad (8)$$

donde t_{90} es el tiempo transcurrido entre el comienzo del ensayo y el instante en que

Cuadro 3. Valores de biomasa inicial calculados a partir de los datos experimentales ($A_{0\text{exp}}$) y de los obtenidos por el modelo de Verhulst (A_{0V}), y los valores medios de cada series.

Nomenclatura	TPM1	TPM1'	TSM2	TSM2'	TSM2 + UASB	TSM2 + UASB'	UASB	UASB'	Media
$A_{0\text{exp}}$ (mg l^{-1})	198	198	113	113	118	118	117	117	136.5
A_{0V} (mg l^{-1})	165.3	167.4	98.2	119.7	114.4	126.6	94.9	88	121.8

Cuadro 4. Parámetros cinéticos del modelo PhBT, según el valor de A_0 utilizado.

Nomenclatura	TPM1		TPM1'		TSM2		TSM2'		TSM2 + UASB		TSM2 + UASB'		UASB		UASB'	
	A_{0exp}	A_{0V}	A_{0exp}	A_{0V}	A_{0exp}	A_{0V}	A_{0exp}	A_{0V}	A_{0exp}	A_{0V}	A_{0exp}	A_{0V}	A_{0exp}	A_{0V}	A_{0exp}	A_{0V}
S_{70} (mg N l ⁻¹)	42.8	40.9	42.8	40.9	56.1	55.2	37.2	37.6	35.7	35.5	36.0	36.8	35.6	34.2	35.63	33.8
S_0 (mg N l ⁻¹)	30.6	30.6	30.5	30.5	49.1	49.1	30.2	30.2	28.4	28.4	28.7	28.7	28.3	28.3	28.4	28.4
S_m (mg N l ⁻¹)	2.8	2.8	5.9	5.9	6.2	6.2	7.1	7.1	6.2	6.2	5.9	5.9	-14.5	-14.4	-7.3	-7.3
μ (h ⁻¹)	0.018	0.018	0.014	0.014	0.019	0.019	0.014	0.014	0.016	0.016	0.013	0.013	0.005	0.005	0.008	0.008

se alcanza un porcentaje de eliminación de sustrato de 10% ($S_{90} = 0.9 \cdot S_0$) (para evitar los fluctuantes periodos de latencia), mientras que t_f es el tiempo transcurrido en alcanzar un 10% de la mínima concentración de sustrato en el reactor ($S_f = 1.1 \cdot S_{ma}$). En el cuadro 5 se observa cómo en todos los reactores la velocidad de consumo del nitrógeno ($-dN/dt$) es muy similar. La velocidad de consumo menor se alcanza en el reactor TSM2 + UASB' (2.82 mg N l⁻¹ d⁻¹) y la mayor en el reactor TPM1 (4.49 mg N l⁻¹ d⁻¹). Si se tienen en cuenta los valores medios entre réplicas, el orden de menor a mayor velocidad de consumo de nitrógeno sería: TSM2 + UASB (3.04 mg N l⁻¹ d⁻¹), muy similar a TSM2 (3.05 mg N l⁻¹ d⁻¹) y a UASB (3.06 mg N l⁻¹ d⁻¹) y, finalmente, TPM1 (3.96 mg N l⁻¹ d⁻¹), donde se da la mayor velocidad de consumo de nitrógeno. Esto sugiere que en un cultivo de microalgas en discontinuo en un medio de cultivo como el utilizado en el reactor TPM1, se eliminaría mayor cantidad de nitrógeno en un volumen y tiempo determinado, con una diferencia de entre 20 y 30%, frente a los otros cultivos estudiados.

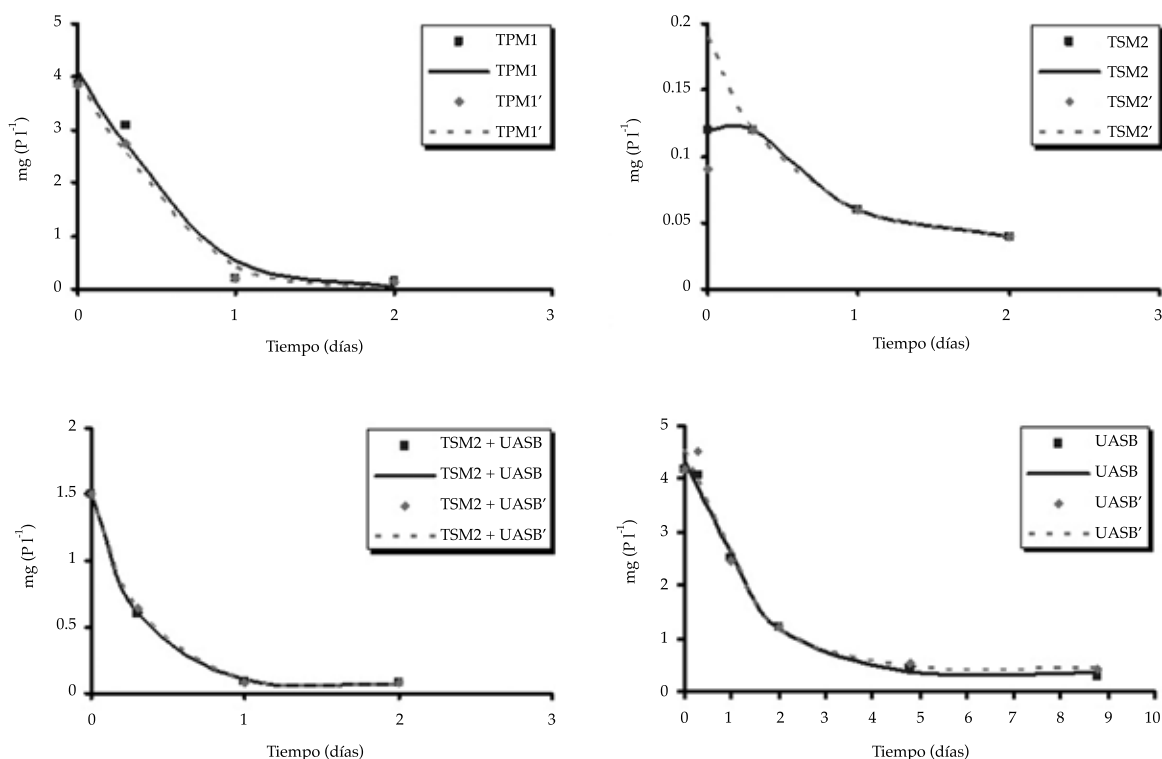
Fósforo

En la figura 6 se muestra la curva de eliminación del fósforo total disuelto en los diferentes medios de cultivo. Se observa que la concentración inicial de fósforo total disuelto no es la misma para cada reactor, excepto en los reactores TPM1 y UASB, y sus réplicas, que son muy similares (~ 4 mg P l⁻¹). También se observa un rápido consumo de fósforo durante los primeros dos días, el cual se relaciona directamente con el incremento en la biomasa. Transcurridas entre 20 y 30 h se eliminó más de 60% del fósforo en todos los reactores, excepto en los reactores UASB y UASB', donde ese porcentaje no se alcanzó hasta las 50 h.

Para cuantificar la eliminación del fósforo total disuelto, se seguirá el mismo proceso analítico que con el nitrógeno. Por lo tanto, los datos experimentales también se ajustaron

Cuadro 5. Parámetros cinéticos de la eliminación del nitrógeno del *bloom* de microalgas por el modelo PhBT y velocidad de consumo del nitrógeno empleando A_0 medio.

Nomenclatura	TPM1	TPM1'	TSM2	TSM2'	TSM2 + UASB	TSM2 + UASB'	UASB	UASB'
S_0 (mg N l ⁻¹)	29.89	29.81	33.51	29.32	27.66	28.9	28.12	28.14
S_{na} (mg N l ⁻¹)	3.92	7.63	5.87	7.65	6.46	6.05	5.23	5.02
μ_N (h ⁻¹)	0.043	0.033	0.026	0.03	0.033	0.028	0.029	0.033
R^2	0.999	0.997	0.928	0.996	0.975	0.929	0.999	0.999
$-dN/dt$ (mg N l ⁻¹ d ⁻¹)	4.49	3.43	3.01	3.1	3.27	2.82	2.86	3.27

Figura 6. Eliminación del fósforo total disuelto en los diferentes medios de cultivo por el *bloom* de microalgas. Los símbolos son los datos experimentales y las líneas continuas representan la concentración de nutrientes prevista de acuerdo con el modelo cinético.

al modelo PhBT, pero con una variación en el factor de cantidad de sustrato incorporado con el inóculo (A_0/Y) de la ecuación (7) que, en este caso, viene determinado por el contenido de fósforo en la biomasa del inóculo ($1/Y_0 = 0.0097 \text{ mg P mg}^{-1} \text{ SS}^{-1}$). En el cuadro 6 se muestran los parámetros cinéticos calculados por la eliminación del fósforo para todos los ensayos, incluyendo los datos obtenidos en el

caso de TSM2 y TSM2', en los que fue difícil el ajuste del modelo PhBT, al no detectarse con precisión la reducción de la concentración de fósforo, debido a la baja concentración inicial del medio de cultivo utilizado en estos reactores ($0.04\text{-}0.12 \text{ mg P l}^{-1}$).

En el cuadro 6 se observa que ninguno de los valores para S_{na} en los distintos reactores supera el límite para el fósforo total disuelto

Cuadro 6. Parámetros cinéticos de la eliminación del fósforo del *bloom* de microalgas por el modelo PhBT y velocidad de consumo de fósforo empleando el valor medio de A_0 .

Nomenclatura	TPM1	TPM1'	TSM2	TSM2'	TSM2 + UASB	TSM2 + UASB'	UASB	UASB'
S_0 (mg P l ⁻¹)	4.09	3.96	0.19	0.19	1.5	1.5	4.34	4.54
S_m (mg P l ⁻¹)	0.02	0.02	0.04	0.04	0.07	0.06	0.35	0.46
μ_p (h ⁻¹)	0.142	0.149	0.082	0.082	0.193	0.181	0.059	0.064
R^2	0.974	0.989	0.999	0.999	0.999	0.999	0.990	0.970
$-dP/dt$ (mg P l ⁻¹ d ⁻¹)	1.04	1.08	0.06	0.06	0.98	0.91	0.86	0.99

(1 ppm) establecido por la Directiva 98/15/CEE (European Commission Directive, 1998), siendo el valor más bajo 0.02 mg P l⁻¹ en los reactores TPM1 y TPM1', y el más alto 0.46 mg P l⁻¹ en UASB'. Los porcentajes de reducción fueron superiores a 80% en todos los casos, alcanzando 100% de eliminación del fósforo en los reactores TPM1 y TPM1'. Ruiz *et al.* (2012) obtienen eficiencias de eliminación mayores de 80% en cultivos de *Chlorella vulgaris* en diferentes medios de cultivo con aguas residuales y medios sintéticos, excepto en el caso del medio sintético rico en nitrógeno amoniacal, donde la inhibición de pH detiene el consumo de nutrientes, y el porcentaje de reducción es de 50%. Otros autores, como Ruiz-Marin *et al.* (2010), en condiciones muy parecidas a las de nuestro ensayo, obtienen para *Scenedesmus obliquus* eficiencias de eliminación de fósforo de 50 a 100%, partiendo de concentraciones iniciales de 12 mg P l⁻¹.

En el cuadro 5 también se observa que los valores para la tasa máxima específica de eliminación de fósforo, μ_p , son, en general, más altos que los de nitrógeno. Se sugiere que la absorción del fósforo es mayor que la del nitrógeno en proporción a los requisitos de la biomasa (Ruiz *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta la media entre réplicas, para el reactor TSM2 + UASB, μ_p es un 95% más alta que en UASB y un 25% mayor que en TPM1.

Al igual que se hizo con el nitrógeno, para comparar los reactores bajo un único parámetro, se ha calculado la velocidad de consumo de fósforo ($-dP/dt$). En el cuadro 6 se observa cómo la velocidad de consumo del

fósforo comprende valores entre 0.86 y 1.08 mg P l⁻¹ d⁻¹ en los reactores UASB y TPM1', respectivamente. Si se tienen en cuenta los valores medios entre réplicas: TPM1 (1.06 mg P l⁻¹ d⁻¹), TSM2 + UASB (0.94 mg P l⁻¹ d⁻¹), UASB (0.92 mg P l⁻¹ d⁻¹), se puede afirmar que la velocidad de consumo de fósforo es de un 10% superior en el medio M1, en comparación con los medios M3 y M4, y de un 100% superior con respecto a M2. Esta velocidad de consumo de fósforo es mucho menor que la de consumo de nitrógeno, del orden de tres veces menor, siendo 3/1 la relación en la velocidad de consumo entre el nitrógeno y el fósforo, respectivamente. Esta relación es muy parecida a la que presenta la composición de las muestras de agua utilizadas en este ensayo, siendo la relación N/P próxima a 5/1 en los medios M1 y M3, y 2/1 en el medio M4 (cuadro 1); mientras que en el medio M2, la relación es de 82/1 debido a la baja concentración inicial de fósforo encontrada en este medio de cultivo.

Evaluación de la importancia de los procesos abióticos en la eliminación de nitrógeno y fósforo disuelto de los medios de cultivo estudiados

Dado que el pH durante el ensayo alcanzó valores por encima de 8 (ver figura 2), es posible que junto a la asimilación biológica del nitrógeno y fósforo por parte de las microalgas se diesen procesos abióticos como el *stripping* del amonio (Trussel, 1972) o la precipitación de fosfatos (Larsdotter, Jansen, & Dalhammar, 2007).

Para evaluar la importancia de la eliminación de nitrógeno por *stripping* se ha calculado el contenido teórico de éste en la biomasa al final del ensayo ($N_{\text{teórico}}$) en los ocho reactores (cuadro 7), a partir de la siguiente ecuación y utilizando parámetros cinéticos del cuadro 2 (X_0, X_m) y el cuadro 5 (S_0, S_{na}):

$$N_{\text{teórico}} = \frac{1}{Y_m} = \frac{S_0 - S_{na}}{X_m - X_0} \quad (9)$$

Con este valor se pudo calcular el contenido de nitrógeno eliminado por *stripping* ($N_{\text{stripping}}$) al realizar el siguiente balance de materia:

$$N_{\text{stripping}} = (N_{d,t=0} + N_{p,t=0}) - (N_{d,t=m} + N_{p,t=m}) \quad (10)$$

donde $N_{d,t=0}$ es el nitrógeno disuelto inicial o S_0 ; $N_{p,t=0}$ es el nitrógeno particulado inicial o X_0/Y_0 ; $N_{d,t=m}$ es el nitrógeno disuelto final o S_{na} y $N_{p,t=m}$ es el nitrógeno particulado final o X_m/Y_m . Siendo el tanto por ciento de este nutriente perdido por *stripping*: $\%N_{\text{stripping}} = N_{\text{stripping}} / S_0 + (X_0/Y_0)$. Según los cálculos realizados, se puede afirmar que en un intervalo de 11 a 18%, el nitrógeno es eliminado por procesos de *stripping* (cuadro 7).

En el caso del fósforo y debido a que este componente no tiene fase aérea, en el cuadro

7 se ha calculado el contenido en fósforo en la biomasa al final del ensayo ($P_{\text{teórico}}$) en cada reactor según la ecuación (9) establecida anteriormente para el nitrógeno, pero utilizando los parámetros cinéticos del cuadro 2 (X_0, X_m) y del cuadro 6 (S_0, S_{na}). Los resultados obtenidos muestran que $P_{\text{teórico}}$ se encuentra entre valores de 0.1 a 0.6% (cuadro 7), valores típicos de este nutriente en microalgas (Kaplan, Richmond, Dubinsky, & Aaronson, 1986). Por lo tanto, se puede afirmar que es plausible que la importancia de la eliminación por precipitación de fósforo no haya sido excesivamente relevante.

Conclusiones

Es posible el cultivo de microalgas en aguas residuales urbanas con múltiples niveles de tratamiento.

El agua residual procedente del efluente de una planta UASB es el medio de cultivo con el que se consigue mayor productividad volumétrica de biomasa, cuando se cultiva un *bloom* de microalgas bajo condiciones controladas en laboratorio.

La eficiencia en la eliminación de nitrógeno y el fósforo por parte de las microalgas permite alcanzar concentraciones por debajo de los límites de vertido de estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas, establecidos en

Cuadro 7. Parámetros de contenido en nitrógeno y fósforo para la evaluación de la eliminación de nutrientes debido a procesos abióticos.

Nomenclatura	TPM1	TPM1'	TSM2	TSM2'	TSM2 + UASB	TSM2 + UASB'	UASB	UASB'
$N_{d,t=0}$ (mg l ⁻¹)	29.89	29.81	33.51	29.32	27.66	28.9	28.12	28.14
$N_{p,t=0}$ (mg l ⁻¹)	18.29	18.41	8.49	9.79	9.54	10.29	8.34	7.99
$N_{d,t=m}$ (mg l ⁻¹)	3.92	7.63	5.87	7.65	6.46	6.05	5.23	5.02
$N_{p,t=m}$ (mg l ⁻¹)	37.31	32.03	31.47	24.29	24.49	27.14	25.37	25.60
$N_{\text{teórico}}$ (mg l ⁻¹)	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02
$N_{\text{stripping}}$ (mg l ⁻¹)	6.97	8.59	4.67	7.22	6.29	6.04	5.95	5.52
$\%N_{\text{stripping}}$ (%)	14.46	17.81	11.12	18.43	16.89	15.40	16.28	15.27
$P_{d,t=0}$ (mg l ⁻¹)	4.09	3.96	0.19	0.19	1.5	1.5	4.34	4.54
$P_{d,t=m}$ (mg l ⁻¹)	0.02	0.02	0.04	0.04	0.07	0.06	0.35	0.46
$P_{\text{teórico}}$ (%)	0.60	0.59	0.02	0.01	0.14	0.16	0.32	0.34

la Directiva 98/15/CEE con todas las aguas residuales estudiadas.

La velocidad de consumo de nutrientes no presenta grandes diferencias entre los distintos medios de cultivo ensayados.

Los modelos cinéticos, como son el modelo de Verhulst y el modelo PhBT, son herramientas fiables de predicción a partir de datos experimentales.

Los procesos abióticos de eliminación de N y P contribuyeron en no más de XX y YY%, respectivamente, a la eliminación de estos nutrientes en todos los ensayos, siendo la asimilación biológica el proceso que más contribuyó a su eliminación.

Los resultados obtenidos indican que existen múltiples opciones a la hora de localizar un proceso basado en la biotecnología de microalgas para eliminar nitrógeno y fósforo en el diagrama de flujo de una estación depuradora de aguas residuales urbanas convencional. Si bien, al tenor de los resultados obtenidos en términos de productividad volumétrica de biomasa, la mejor de las opciones sería una disposición de los fotobiorreactores de microalgas como tratamiento terciario después de un proceso de eliminación de materia orgánica mediante un reactor anaerobio tipo UASB.

Referencias

- Anonymous (1991). CHN-900/CHNS-932 *Elemental Analysers for Carbon, Hydrogen, Nitrogen, Sulfur and Oxygen*. Available at: <http://richmondscientific.com/manuals/tm262manual.pdf>.
- Anonymous (2008). *Berghof Application Report: Speedwave Four Microwave Pressure Digestion, Food, Pharma, Cosmetics*. Germany. Available at: http://www.berghof.com/fileadmin/Dateien-Einpflege/Seitenbaum/Home-Downloads/Produkte/Laborgeraete/Aufschlusstechnik/speedwave four/Berghof_Laborgeraete_PR_Mikrowellendruckaufschluss_SpeedwaveFour_EN.pdf.
- APHA-AWWA-WEF (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1). Available at: <http://www.umass.edu/tei/mwwp/acrobat/sm9010-40intro.PDF>.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., & Perales, J. A. (2013). Long Term Outdoor Operation of a Tubular Airlift Pilot Photobioreactor and a High Rate Algal Pond as Tertiary Treatment of Urban Wastewater. *Ecological Engineering*, 52, 143-153. Accessed October 28, 2013. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092585741200451X>.
- Barbosa, M. J., Hoogakker, J., & Wijffels, R. H. (2003). Optimisation of Cultivation Parameters in Photobioreactors for Microalgae Cultivation Using the A-Stat Technique. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 115-123. Accessed October 24, 2013. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389-034403000339>.
- Benemann, J. R. (2009). *Microalgal Biofuels: A Brief Introduction*. Available at: <http://advancedbiofuelsusa.info/wp-content/uploads/2009/03/microalgae-biofuels-an-intro-duction-july23-2009-benemann.pdf>.
- Brune, D. E. J., Lundquist, T., & Benemann, J. R. (2009). *Microalgal Biomass for Greenhouse Gas Reductions; Potential for Replacement of Fossil-Fuels and Animal Feeds*. Available at: http://digitalcommons.calpoly.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1171&context=cenv_fac.
- Cabanelas, I. T. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Alexandre Chinalia, F., Garrido Pérez, C., Rogalla, F., Andrade Nascimento, I., & Perales, J. A. (2013). Comparing the Use of Different Domestic Wastewaters for Coupling Microalgal Production and nutrient Removal. *Bioresource Technology* 131, 429-436.
- Dawson, C. J., & Hilton, J. (2011). Fertiliser Availability in a Resource-Limited World: Production and Recycling of Nitrogen and Phosphorus. *Food Policy*, 36, S14-S22. Accessed November 9, 2013. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306-919210001260>.
- De Pauw, N., Bruggeman, E., & Persoone, G. (1978). Research on the Tertiary Treatment of Swine Manure by Mass Culturing of Algae. *Mitt. Internat. Verin. Limnol*, 21, 490-506.
- EPA (2008). *EPA Method 6010c (2000): Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*. Washington, DC: E. and A. D. (4304) Office of Science and Technology.
- European Commission Directive (1998). Amending Council Directive 91/271/EEC with Respect to Certain Requirements Established in Annex I. *Official Journal of the European Communities*, 98/15/EC, 29-30.
- Fallahi, B., Hall, A. S., & Ragsdell, K. M. (1981). Application of the Generalized Reduced Gradient Method to Selected Mechanisms Synthesis Problems (49-56 pp.). In *International Conference on Software Engineering*. San Diego, California, USA.
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a Raw Material for Biofuels Production. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 36(2), 269-274.
- Gray, N. F. (1989). *Biology of Wastewater Treatment*. Oxford: Oxford University Press.

- Griffiths, M. J., & Harrison, S. T. L. (2009). Lipid Productivity as a Key Characteristic for Choosing Algal Species for Biodiesel Production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 493-507. Accessed October 19, 2013. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-008-9392-7>.
- Hecky, R. E., & Kilham, P. (1988). Nutrient Limitation of Phytoplankton in Freshwater and Marine Environments: A Review of Recent Evidence on the Effects of Enrichment. *Limnology and Oceanography*, 33, 796-822.
- Heussler, P. (1985). Development and Results of Peruvian-German Microalgae Project. *Ergebn. Limnol.*, 20, 1-8.
- Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z., & Aaronson, S. (1986). Algal Nutrition. In *Crc Handbook of Microalgal Mass Culture*, Richmond. Boca Raton: CRC Press.
- Kennish, M. J., & De Jonge, V. N. (2012). Chemical Introductions to the Systems Diffuse and Nonpoint Source Pollution from Chemicals Nutrients Eutrophication (p. 315). In E. McLusky, & D. Wolanski (Eds.). *Treatise on Estuarine and Coastal Science Human-induced Problems (Uses and Abuses)*. Oxford: Elsevier.
- Köthe, J., & Bitsch, R. (1992). Oxsolv® Plus Microwave – A New Way for Sample Preparation. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 343(9-10), 717-718.
- Larsdotter, K., Jansen, J. L. C., & Dalhammar, G. (2007). Biologically Mediated Phosphorus Precipitation in Wastewater Treatment with Microalgae. *Environ. Technol.*, 28(9), 953-960.
- Liang, Y. N., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella vulgaris* under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions. *Biotechnol Lett.*, 31(7), 1043e9.
- Mariappan, J., & Krishnamurthy, S. (1996). A Generalized Exact Gradient Method for Mechanism Synthesis. *Mechanism and Machine Theory*, 31(4), 413-421.
- Martin, C., Picard, G., & De la Noüe, J. (1985). Epuration Biologique du Lisier de Porc par Production de Biomasses D'algues Unicellulaires. *Mircen J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 173-184.
- Müller, R., & Weidemann, F. (1955). Die Bestimmung des Nitrats in Wasser. *Jahrb. Wasserchem. Wasserreinigungstechnik*. Verlag Chemie 12, 247-271.
- Patel, A., Barrington, S., & Lefsrud, M. (2012). Microalgae for Phosphorus Removal and Biomass Production: A Six Species Screen for Dual-Purpose Organisms. *GCB Bioenergy*, 4(5), 485-495. Accessed October 28, 2013. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1757-1707.2012.01159.x>.
- Peleg, M., Corradini, M. G., & Normand, M. D. (2007). The Logistic (Verhulst) Model for Sigmoid Microbial Growth Curves Revisited. *Food Research International*, 40, 808-818.
- Qiang, H., Zarmi, Y., & Richmond, A. (1998). Combined Effects of Light Intensity, Light-Path and Culture Density on Output Rate of *Spirulina Platensis* (Cyanobacteria). *European Journal of Phycology*, 33, 165-171.
- Quiroga, J. M., Perales, J. A., Romero, L. I., & Sales, D. (1999). Biodegradation Kinetics of Surfactants in Seawater. *Chemosphere*, 39, 1957-1969.
- Ragsdell, K. M. (1975). On the Application of the Generalized Reduced Gradient Method to Mechanism Synthesis (pp. 405-410). *World Congress on the Theory of Mach. and Mech. 4th*. Avtomaticheskaya Svarka.
- Rashid, N., Ur Rehman, M. S., Memon, S., Ur-Rahman, Z., Lee, K., & Han, J. (2013). Current Status, Barriers and Developments in Biohydrogen Production by Microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 22, 571-579.
- Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P. D., Arbib, Z., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., & Perales, J. A. (2011). Effect of Nitrogen and Phosphorus Concentration on their Removal Kinetic in Treated Urban Wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Phytoremediation*, 13(9), 884-896.
- Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P. D., Arbib, Z., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., & Perales, J. A. (2013). Performance of a Flat Panel Reactor in the Continuous Culture of Microalgae in urban Wastewater: Prediction from a Batch Experiment. *Bioresource Technology*, 127, 456-463. Accessed October 28, 2013. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23138070>.
- Ruiz, J., Arbib, Z., Álvarez-Díaz, P. D., Garrido-Pérez, C., Barragán, J., & Perales, J. A. (2012). Photobioreactor Model (Phbt): A Kinetic Model for Microalgae Biomass Growth and Nutrient Removal in Wastewater. *Environmental Technology*, 34(8), 979-991. Accessed October 28, 2013. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2012.724451>.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010). Growth and Nutrient Removal in Free and Immobilized Green Algae in Batch and Semi-Continuous Cultures Treating Real Wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58-64.
- Samorì, G., Samorì, C., Guerrini, F., & Pistocchi, R. (2013). Growth and Nitrogen Removal Capacity of *Desmodesmus Communis* and of a Natural Microalgae Consortium in a Batch Culture System in View of Urban Wastewater Treatment: Part I. *Water Research*, 47(2), 791-801. Accessed October 27, 2013. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211134>.
- Schnackenberg, J., Ikemoto, H., & Miyachi, S. (1996). Photosynthesis and Hydrogen Evolution under Stress Conditions in a CO₂-Tolerant Marine Green Alga *Chlorococcum littorale*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62, 34-59.
- Shelef, G., Azov, Y., Moraine, R., & Oron, G. (1980). Algal Mass Production as an integral Part of a Wastewater Treatment and Reclamation System. In *Algae Biomass*. Amsterdam: Shelef&Soeder, Ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

- Shelef, G., Moraine, R., & Oron, G. (1978). Photosynthetic Biomass Production from Sewage. *Ergebn. Limnol.*, 11, 3-14.
- Smith, V. H., & Schindler, D. W. (2009). Eutrophication Science: Where do We Go from Here? *Trends Ecol. Evol.*, 24, 201-207.
- Talbot, P., Thébault, J. M., Dauta, A., & De La Noüe, J. (1991). A Comparative Study and Mathematical Modeling of temperature, Light and Growth of Three Microalgae Potentially Useful for Wastewater Treatment. *Water Research*, 25(4), 465-472. Accessed October 29, 2013. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043135491900833>.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., & Zhong, J. (2011). CO₂ Biofixation and Fatty Acid Composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in Response to Different CO₂ Levels. *Bioresource technology*, 102(3), 3071-3076. Accessed October 24, 2013. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041075>.
- Trussel, R. P. (1972). The Percent of Un-Ionized Ammonia in Aqueous Ammonia Solutions at Different pH Levels and Temperatures. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 29, 1505-1507.
- UNEP (2010). *Sick Water? The Central Role of Wastewater Management in Sustainable Development. A Rapid Response Assessment*. E. Corcoran et al. (Eds.). Available at: http://www.unep.org/pdf/SickWater_screen.pdf.
- Velan, M., & Saravanane, R. (2013). CO₂ Sequestration and Treatment of Municipal Sewage by Microalgae, *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*. 2(5), 307-310.
- Verhulst, P. F. (1838). Notice Sur la Loi que la Population Suit dans son Accroissement. *Corres. Math. Phys.*, 10, 113-121.
- Walsh, S., & Diamond, D. (1995). Non-Linear Curve Fitting Using Microsoft Excel Solver. *Talanta*, 42, 561-572.

- Wang, L., Wang, Y. K., Chen, P., & Ruan, R. (2010). Semi-Continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for Treating Undigested and Digested Dairy Manures. *Applied Bio-Chemistry and Biotechnology*, 162, 2324-2332.

Dirección institucional de los autores

Lic. César Carlos García Gozalbes

Licenciado en Ciencias Ambientales por la Universidad de Cádiz

Centro Andaluz de Ciencia y Tecnología Marinas (Cacytmar)

Campus Universitario Polígono Río San Pedro 11510, Puerto Real, Cádiz, ESPAÑA

Teléfono: +34 (67) 5307 607

carlos.garciago@alum.uca.es

Dr. Zouhayr Arbib

Investigador de Aqualia, Gestión Integral del Agua S.A.

EDAR de El Torno, Chiclana de la Frontera, España

Campus Universitario Polígono Río San Pedro

11510, Puerto Real, Cádiz, ESPAÑA

Teléfono: +34 (95) 6016 747

zouhayr.arbib@fcc.es

Lic. José Antonio Perales Vargas-Machuca

Profesor del Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente

Universidad de Cádiz

Centro Andaluz de Ciencia y Tecnología Marinas

(Cacytmar)

Campus Universitario Polígono Río San Pedro

11510, Puerto Real, Cádiz, ESPAÑA

Teléfono: +34 (95) 6016 747

joseantonio.perales@uca.es