



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

*Máster en Biotecnología Industrial  
y Agroalimentaria*

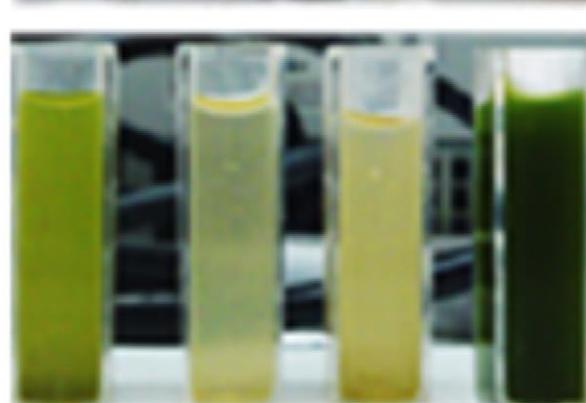
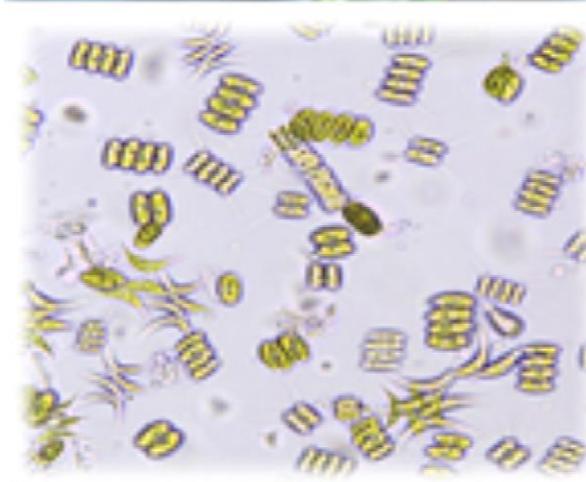
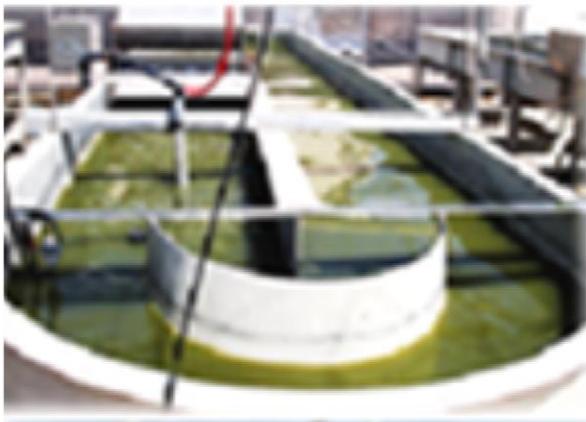
## DEPURACIÓN DE PURINES EN FOTOBIORREACTORES ABIERTOS

**AUTOR:** JIMÉNEZ VEUTHEY, Mariana

**DIRECTOR:** MOLINA GRIMA, Emilio

**CO-DIRECTOR:** ACIÉN FERNÁNDEZ, F. Gabriel

ALMERÍA, 23 DE JULIO DE 2015



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer infinitamente a mis directores del trabajo fin de máster: Dr. Emilio Molina Grima y Dr. F. Gabriel Acién Fernández por la eterna paciencia que me han tenido, por enseñarme día a día y acompañarme en la elaboración de este trabajo de investigación. Agradecer al Dr. José María Fernández Sevilla por brindarme siempre una mano cuando la necesité. También felicitar al Dr. Francisco García Camacho por su correcto desempeño como coordinador del Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria, quién en todo momento se preocupó en atender nuestras consultas y tratar de solucionarlas.

Gracias a la Fundación Cajamar por permitirme realizar las prácticas en las instalaciones de la Estación Experimental “Las Palmerillas”, y a todo el personal de la misma por su colaboración y amabilidad.

A mi familia y a mi novio Alexis por haberme apoyado y acompañado en la decisión de venir a España para continuar perfeccionándome.

Y por último, agradecer a todos los docentes que impartieron este máster por todas las experiencias y conocimientos que me supieron transmitir a lo largo del año.

A todos ustedes: Gracias.

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. RESUMEN.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>3. OBJETIVO .....</b>   | <b>9</b>  |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL.....  | 9         |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                      | 9         |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>                                 | <b>9</b>  |
| 4.1. MICROORGANISMO Y MEDIO DE CULTIVO .....                         | 9         |
| 4.2. SISTEMAS DE CULTIVO .....                                       | 11        |
| 4.3. CONDICIONES DE OPERACIÓN.....                                   | 14        |
| 4.4. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO .....                                 | 15        |
| 4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS .....  | 16        |
| 4.5.1. <i>Cuantificación de biomasa y propiedades ópticas</i> .....  | 16        |
| 4.5.2. <i>Análisis químico de los medios de cultivo</i> .....        | 17        |
| 4.5.3. <i>Análisis microbiológico de los medios de cultivo</i> ..... | 19        |
| 4.6. PRODUCTIVIDAD Y EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES .....      | 19        |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                | <b>20</b> |
| 5.1. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....                       | 20        |
| 5.2. CONCENTRACIÓN Y PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA .....                  | 22        |
| 5.3. PROPIEDADES ÓPTICAS DEL CULTIVO Y DISPONIBILIDAD DE LUZ.....    | 24        |
| 5.4. EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES .....                      | 28        |
| <b>6. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>7. REFERENCIAS .....</b>  | <b>36</b> |

## 1. RESUMEN

Los efluentes producidos por la actividad ganadera, principalmente purines, han sido tradicionalmente aplicados en agricultura como fertilizantes. Sin embargo, el progresivo desarrollo de la ganadería intensiva y la saturación de la superficie agrícola han provocado que dichos efluentes pasen de ser un abono a un residuo que hay que gestionar adecuadamente, ya que pueden provocar, no sólo contaminación en las aguas superficiales y subterráneas, sino también afectar la calidad atmosférica y poner en peligro la salud de las personas. Por ello se está realizando un gran esfuerzo en la búsqueda de reducir la contaminación provocada por esta clase de residuos. Una alternativa a las tecnologías convencionales para el tratamiento de aguas residuales es la ficoremediación, que se propone como una tecnología más económica, versátil y tecnológicamente sencilla.

En este estudio se evaluó la capacidad de remoción de nutrientes en purines de cerdo digeridos anaeróbicamente (PDA) y sin digerir (PF), previamente diluidos al 5% con agua de riego. Para ello se emplearon cuatro fotobiorreactores raceways (tres convencionales y uno de capa fina) inoculados con microalgas del género *Scenedesmus* sp. Se operaron con tres velocidades de dilución (D) distintas según fotobiorreactor: RW1=0.15 día<sup>-1</sup>, RW2= 0.3 día<sup>-1</sup>, RW3= 0.4 día<sup>-1</sup> y RI= 0.3 día<sup>-1</sup>. Los tiempos de retención hidráulica (inversa de la velocidad de dilución, 1/D) según las velocidades de dilución impuestas en los fotobiorreactores fueron los siguientes: 6.66 días, 3.33 días, 2.5 días y 3.33 días, respectivamente. Los valores de productividad de biomasa alcanzados con medio PF estuvieron entre 4.32 y 26.66 g/m<sup>2</sup>\*d, mientras que con PDA entre 8.39 y 25.84 g/m<sup>2</sup>\*d, a un TRH de 6.66 días (D=0.15 días<sup>-1</sup>). De los dos medios de cultivo empleados, con PDA fue con el que se consiguió mayor productividad de biomasa y eficiencia de remoción de nutrientes. De los cuatro fotobiorreactores ensayados, el reactor inclinado de capa fina (RI) fue el que mejor resultado arrojó en cuanto a productividad de biomasa y eficiencia de remoción de nutrientes, seguido por RW1, RW2 y por último RW3. En general, la tasa de remoción de DQO varió desde un 79% a 98%, la de amonio entre un 44% y 99%, la de nitrato entre un 39% y 98%, la de fosfato entre un 65% y

94%. y por último la de TOC entre un 69% y 99%. En cuanto al recuento de bacterias aerobias totales, los resultados indicaron que tanto en PF como en PDA la remoción fue del 100%. Para el caso de *Escherichia coli*, se observó ausencia en medio PDA, mientras que en medio PF, se detectaron concentraciones comprendidas entre 13000 y 20000 UFC/100 mL.

Si bien la ficoremediación es una de las mejores alternativas para lograr la valorización de purines de cerdo, se necesita aún más investigación para conseguir mejorar esta tecnología.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los efluentes producidos en granjas porcinas, denominados purines, están compuestos por altos contenidos en nitrógeno, fósforo y materia orgánica. La generación y composición de purines por unidad de cerdo puede ser muy variable ya que depende de diversos factores como son la época del año, la zona de procedencia, el sistema de crianza, el estado fisiológico del animal, entre otros. Tradicionalmente, los purines de cerdo se han utilizado solos o compostados con paja y otros residuos como material fertilizante para abonado de los terrenos agrícolas próximos a las granjas. Estos excrementos no sólo emiten un olor muy desagradable, sino que generan metano que junto con el anhídrido carbónico y otros gases son los responsables del efecto invernadero. En España se producen 50 millones de toneladas anuales de purines, que equivalen a 500000 toneladas anuales de nutrientes agrícolas. Además, la ganadería intensiva ha concentrado la cría de animales en determinadas zonas geográficas (principalmente en Andalucía, Aragón, Castilla La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Murcia y Valencia) produciendo contaminación ambiental por el vertido excesivo de los purines en los recursos acuíferos. Por ello, la Unión Europea aprobó los decretos 91/676/CE y RD 261/96 que regulan la manipulación y tratamiento de los residuos ganaderos. En la actualidad las estaciones depuradoras de agua residual cuentan con distintos tratamientos para disminuir la materia orgánica presente en el agua de desecho. Sin embargo tienen dificultad en la remoción de nitrógeno y fósforo, los cuales se encuentran en concentraciones de hasta 3 veces o más de lo normal (Rawat et al. 2011). Por lo que, la eliminación de estos nutrientes requiere de procesos adicionales que implica mayores costos energéticos, pero si no se realiza se contribuye a la eutrofización.

Una mejor alternativa a las tecnologías convencionales para el tratamiento de aguas residuales es la ficoremediación, la cual se propone como una tecnología más económica, versátil y tecnológicamente sencilla (Sánchez, 2007). Esta se puede definir como el uso de macro o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes, xenobióticos y CO<sub>2</sub> del agua residual. La importancia y aplicación de las

microalgas en el tratamiento de aguas residuales tienen sus antecedentes en la época de Caldwell (1946), y más tarde de Oswald (1953), quienes sugirieron la utilización de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y producción de proteína simultáneamente. Es en el año 1960, en California, cuando se plantea el sistema de cultivo más grande de los Estados Unidos, llegándose a alcanzar una producción de biomasa de microalgas de 12-18 g/m<sup>2</sup>d. Es a partir de este cultivo a gran escala que se desencadenó en diferentes países del mundo, el desarrollo de cultivos masivos de microalgas en sistemas tanto abiertos como cerrados.

Para evaluar la calidad de los efluentes es necesario considerar su composición y especialmente el contenido en DQO, nitrógeno y fósforo. La relación N:P óptima para la producción de microalgas está comprendida entre 6.8 y 10 (Olguín, 2012). El nitrógeno es el segundo nutriente más importante para las microalgas después del carbono, ya que constituye el 10% de la biomasa (Larsdotter, 2006). Las formas del nitrógeno que prefieren las microalgas son el amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y el nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Oliver and Ganf, 2000), sin embargo, la urea y el nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) también pueden ser utilizados como fuentes de nitrógeno (Larsdotter, 2006). Estas son las principales formas de N que están presente en los purines de cerdo. El fósforo es otro macronutriente esencial para el crecimiento de las microalgas, éste es asimilado como fosfato (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>). Las microalgas son capaces de asimilar el fósforo en exceso, que se almacena dentro de las células en forma de gránulos de polifosfatos (Larsdotter, 2006). Además, las microalgas tienen la capacidad de proporcionar, a través de la fotosíntesis, el oxígeno necesario para sustentar a las bacterias aerobias durante la degradación de la materia orgánica a CO<sub>2</sub> y otros compuestos minerales (Oswald et al., 1953).

Un consorcio de microalgas y bacterias puede ser adecuado para el tratamiento de aguas residuales (Figura 1) porque disminuye los costos energéticos derivados de la inyección mecánica de oxígeno en los procesos convencionales. Se estima que los consumos de energía asociados a la depuración de aguas residuales ascienden a 0.5 kWh/m<sup>3</sup>, con un costo aproximado de 0.2 €/m<sup>3</sup>.

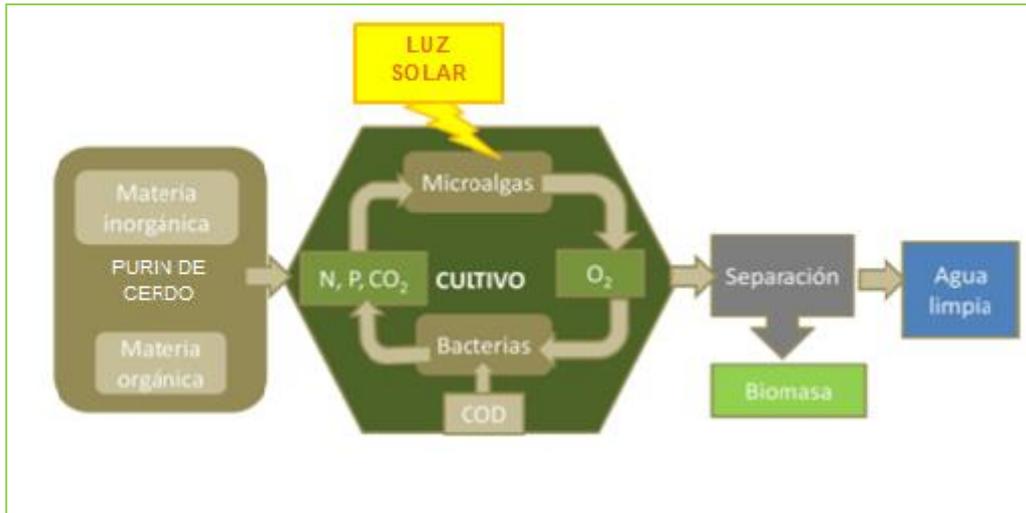


Fig. 1. Simbiosis microalga-bacteria en el tratamiento de purines de cerdo.

Las microalgas empleadas para ficoremediación deben cumplir con 3 condiciones: elevada tasa de crecimiento; alta tolerancia a las variaciones estacionales y diurnas, y buena capacidad para formar agregados para un cosechado por simple gravedad (Park et al. 2011). Algunas especies de microalgas presentes en aguas contaminadas (especies autóctonas) son utilizadas en tratamientos de aguas residuales debido a su elevada tolerancia a las condiciones del medio. Microalgas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como algunas del grupo de las cianobacterias, se han usado en el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, destacando las provenientes de plantas de tratamiento convencionales, de origen industrial, urbano y las derivadas de purines de animales (Baumgarten et al., 1999). De todas formas es conveniente el estudio previo del agua a tratar y del comportamiento de las distintas especies a utilizar, antes de avanzar en el desarrollo de cualquier bioproceso.

En cuanto al diseño del fotobiorreactor y modo de operación, se emplean reactores abiertos tipo raceway por su bajo costo, bajo consumo energético, facilidad de construcción y operación, así como alta durabilidad. El tiempo de retención hidráulico (TRH) en estos sistemas es usualmente alto, de hasta 10 días, y está determinado por los requisitos de eliminación de nitrógeno, fósforo y materia orgánica. En cuanto al control de pH, la mayoría de los sistemas operan sin control de pH, sin embargo esto hace que el pH alcance valores alcalinos, superiores a 10, perjudicando no sólo a las bacterias sino también

favoreciendo el fenómeno de “stripping” (eliminación de amonio por desorción). Como desventajas cabe destacar la baja accesibilidad de las células a la luz, pérdidas de agua por evaporación, necesidad de grandes extensiones de terreno y exposición a contaminación por parte de organismos heterótrofos de rápido crecimiento y/o depredadores (tales como rotíferos, cladóceros, etc.) (Park et al. 2011).

La eficiencia del proceso depende básicamente del tipo de agua residual y del diseño y modo de operación del biorreactor (profundidad, mecanismos de agitación, temperatura, intensidad luminosa, entre otras). La finalidad del empleo de efluentes procedentes del tratamiento primario, secundario o terciario de aguas residuales como medio de cultivo de microalgas es, por un lado, mejorar la calidad del efluente, a través de un mecanismo de bajo costo energético y por otro lado, obtener sub-productos como fertilizantes, biocombustibles, y eventualmente pienso para animales. Sin embargo, a pesar del alto potencial de la ficoremediación para la valorización de efluentes agropecuarios aún queda mucho por investigar para conseguir optimizar esta tecnología.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad depuradora de un cultivo de microalgas *Scenedesmus* sp. para la remoción de nutrientes presentes en purines de cerdo digeridos anaeróbicamente (PDA) y sin digerir (PF) empleando fotobiorreactores raceways.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el efecto de la velocidad de dilución (D) sobre la productividad de biomasa y eficiencia de remoción de nutrientes.
- ✓ Evaluar el efecto de la configuración de los fotobiorreactores sobre la productividad de biomasa y eficiencia de remoción de nutrientes.
- ✓ Evaluar el efecto de los medios de cultivo (PDA y PF) sobre la productividad de biomasa y facilidad de eliminación de nutrientes.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Microorganismo y medio de cultivo

El género de microalga empleada en este trabajo fue *Scenedesmus* sp. Esta microalga de agua dulce pertenece a la división *Chlorophyta*, clase *Chlorophyceae*, orden *Chlorococcales*, familia *Scenedesmaceae* (Villasmil, 2004) y puede encontrarse solitaria o en parejas formando cenobios de 2-4-8 células ovales, elipsoidales, cilíndricas a fusiforme (tamaño promedio de 19,1-29,2 x 4,5-8,8  $\mu\text{m}$ ), ordenadas en paralelo, alineadas o alternas, con pared celular lisa o con verrugas o acostilladas (Fig. 2).

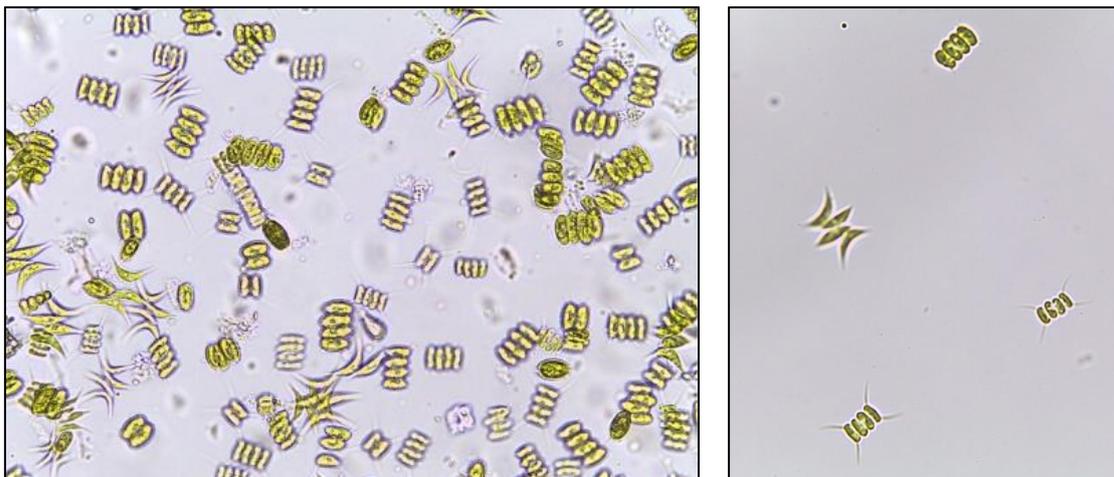


Fig.2. Microfotografías 40x con luz visible de *Scenedesmus* sp. empleada en la investigación.

Bajo las condiciones medioambientales existentes en Almería, *Scenedesmus* sp. se caracteriza por ser un género de microalga idónea para el cultivo en reactores abiertos con aguas residuales debido a su capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en esas aguas, poseer actividad metabólica elevada (González, 2006) y capaz de resistir temperaturas de hasta 35 °C (Fernández et al., 2014). Por otro lado, Kesaano y Sims (2014), también han reportado que *Scenedesmus* es una especie de microalga fácil de encontrar en fotobiorreactores donde se lleva a cabo el tratamiento de aguas residuales domésticas.

Para la preparación del medio de cultivo se emplearon purín de cerdo fresco (PF) sin digestión anaeróbica proveniente de Níjar y purín de cerdo digerido anaeróticamente (PDA) de Castilla La Mancha (Tabla 1). Los mismos fueron transportados desde su lugar de producción hacia la Estación Experimental “Las Palmerillas” (Almería, España). Debido a la alta carga contaminante de estos purines para la preparación del medio de cultivo los purines fueron diluidos con agua al 95% (250 litros de purín y 4750 de agua), de forma que la composición final se aproxima a la de los medios de cultivo estándar utilizados para la producción de microalgas.

Tabla 1. Composición química de los purines empleados, de cerdo fresco sin digestión anaeróbica (PF) proveniente de Nijar (Almería, España) y de cerdo digerido anaeróbicamente (PDA) de Castilla La Mancha (España).

| COMPOSICIÓN QUÍMICA |  |   |              |
|---------------------|--|---|--------------|
| Medio de cultivo    | N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup><br>mg/L | P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> ,<br>mg/L | DQO,<br>mg/L |
| PF                  | 7602                                   | 451                                       | 22260        |
| PDA                 | 4604                                   | 1680                                      | 169800       |

Se comenzó el ensayo experimental con el PF y una vez terminado éste, se continuó con el tratamiento de PDA. Cada medio de cultivo se almacenó en un tanque de 10000 litros de capacidad (Fig. 3) desde cual se transportaba con una bomba sumergible de 1.5 HP (Pedrollo, Italia), según demanda, hacia otro tanque de 5000 litros (Fig. 4). En este último tanque se realizaba la dilución de los purines de cerdo para luego alimentar los distintos FBRs.



Figuras 3 y 4. Izq. Tanque de almacenamiento de medios de cultivo. Drcha. Tanque de dilución y alimentación de medios de cultivo.

## 4.2. Sistemas de cultivo

Los ensayos se llevaron a cabo en cuatro fotobiorreactores raceways de polipropileno (FBRs): tres raceways convencionales (RWs) (RW1, RW2, RW3) (Fig. 5) y uno de capa fina (RI), localizados en la Estación Experimental “Las Palmerillas” de la Fundación CAJAMAR (Almería, España). Los tres primeros FBRs (RW1, RW2 y RW3) se diseñaron de tal manera que un tabique divide a cada RW en dos canales de 6 m de largo y 0.6 m de ancho, conectados por

una curva de 180° en cada extremo. Ambas curvas están acompañadas de una paleta construida del mismo material que los RWs, que sirve de guía para el flujo (Fig. 6). Tienen una superficie de 8.33 m<sup>2</sup> y una profundidad de 0.12 m. El volumen total de trabajo en RW1, RW2 y RW3 fue 750, 810 y 850 litros, respectivamente. La principal diferencia entre los volúmenes se debe a la existencia de un foso de 1 metro de profundidad presente solamente en RW2 y RW3, para mejorar la transferencia de CO<sub>2</sub>. Los volúmenes de los fosos en RW2 y RW3 fueron 100 y 150 litros, respectivamente. Para mantener el pH a 8.0 ± 0.5, se suministró CO<sub>2</sub> a una razón de 20 L/min desde la parte inferior de los sumideros, y en el caso de RW1 desde la parte inferior del reactor, a través de difusores de polietileno de 25 mm de diámetro. El suministro de CO<sub>2</sub> a los diferentes FBRs, se efectuó a partir de CO<sub>2</sub> puro (99,9 %) adquirido de la firma Abello Linde (España). La agitación del cultivo en cada RW se efectuó a través de una rueda de 6 paletas de 0.56 m de largo y 0.02 m de alto, accionada por un motor eléctrico (Motovario, Italia). Se trabajó a una velocidad de circulación del cultivo de 0.2 m/s.

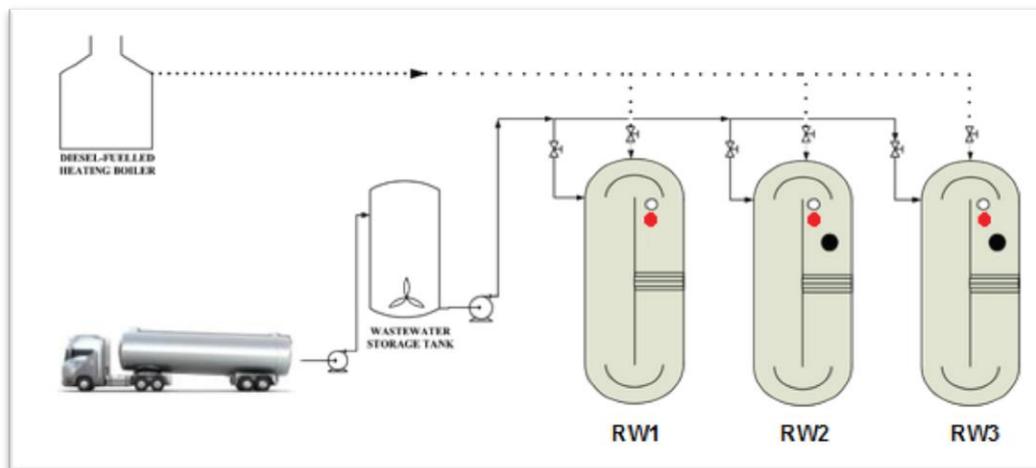


Fig. 5. Esquema de los tres fotobiorreactores raceways (RW1, RW2 y RW3). Los círculos blancos en los RWs representan los sensores de pH, los círculos rojos hacen referencia a los sensores de oxígeno disuelto (O.D.) y temperatura y los círculos negros a los fosos. Las líneas continuas y discontinuas indican suministro de purines de cerdo y distribución de CO<sub>2</sub>, respectivamente.

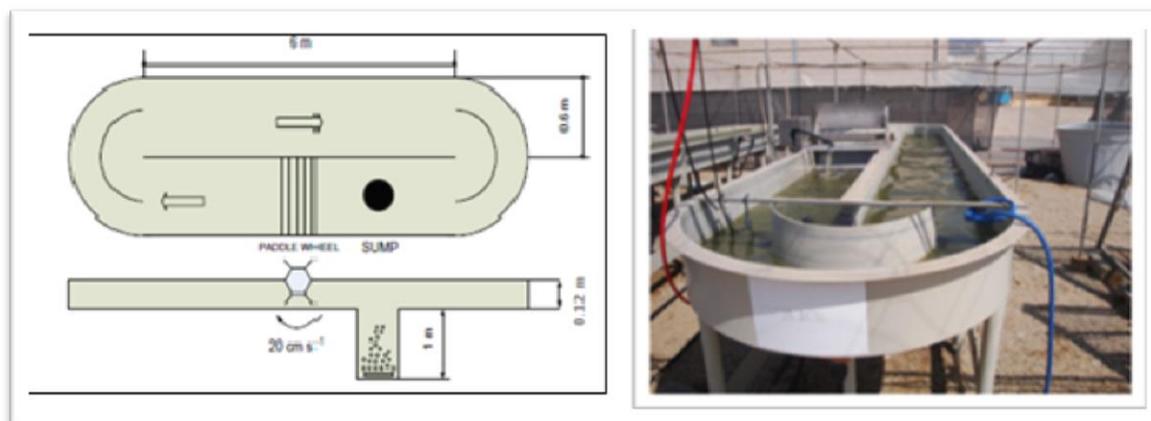


Fig. 6. Izq. Esquema de un raceways indicando: dimensiones características, agitador (rueda de paletas) y foso (círculo negro). Drcha. Fotografía de RW en Estación Experimental “Las Palmerillas”.

El cuarto FBR (RI) consistía en un sistema de bandejas de capa fina dispuestas en cascadas (Fig. 7), con una superficie total de  $33 \text{ m}^2$  y una profundidad de 2.5 cm. El volumen total de trabajo fue 1200 litros. A través del foso, de 1000 litros de capacidad, se burbujeaba aire a un caudal de 60 L/min o  $\text{CO}_2$  puro a 20 L/min para mantener el pH a  $8 \pm 0.5$ . La velocidad de circulación del cultivo fue de 0.2 m/s, lo cual se consiguió mediante el empleo de una bomba Prinze SE-200-M 2 CV (España) situada en la parte inferior del foso que impulsaba el líquido hasta la bandeja superior.

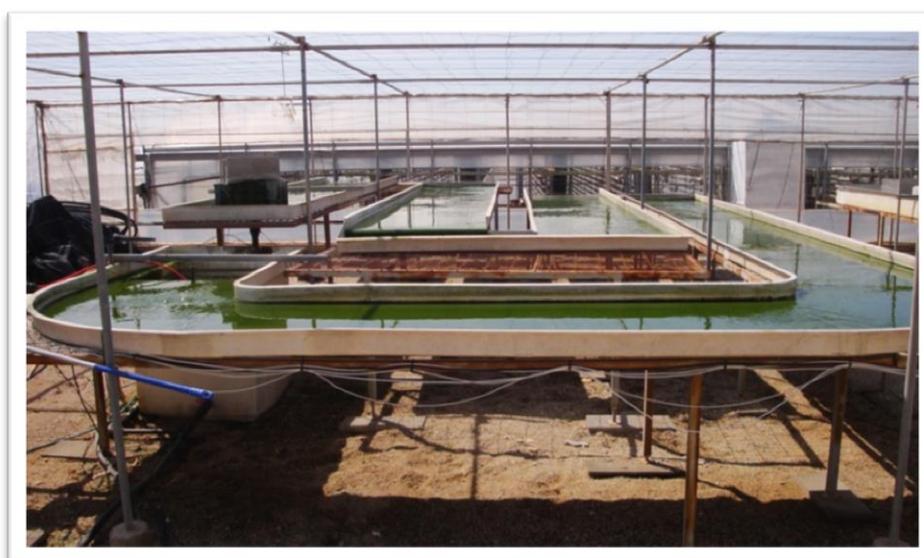


Figura 7. Fotobiorreactor abierto de capa fina de 1200 litros de capacidad.

Al igual que los RWs, este reactor estaba equipado con pH-metros, sondas de oxígeno disuelto y medidor de temperatura. Estas variables estaban

monitorizadas por un ordenador con tarjeta de adquisición de datos (Labjack U12) para registrar en línea los valores de temperatura, oxígeno disuelto y pH. Además se registró la radiación solar mediante un piranómetro G-54 (LI-COR, EE.UU.) que mide radiación PAR a nivel del suelo. Mediante el software DAQFactory 8.85, se llevó a cabo el control de las variables mencionadas anteriormente y de la dilución de los reactores.

### 4.3. Condiciones de operación

Los ensayos se realizaron primero para PF y luego para PDA. Cada fotobiorreactor raceway (RW1, RW2 y RW3) fue inoculado con la microalga de agua dulce *Scenedesmus* sp. hasta una concentración aproximada de sólidos suspendidos totales (TSS) de 250 mg/L. La inoculación se realizó desde el fotobiorreactor de capa fina (RI) en el cual las microalgas fueron previamente cultivadas (Fig. 8).



Figura 8. Llenado de RW con medio de cultivo e inoculación con *Scenedesmus* sp.

La aclimatación de las microalgas y la compensación de las pérdidas por evaporación se realizaron mediante la alimentación de los cuatro RWs con el medio de cultivo operando en modo semi-continuo. La misma tuvo lugar durante los primeros tres días del ensayo utilizando para ello una bomba modelo S-561 82 Husqvarna AB (Suecia). El valor de pH se mantuvo a  $8.0 \pm 0.5$  mediante el burbujeo con CO<sub>2</sub> puro controlado automáticamente.

Una vez sobrepasado el período de aclimatación, se instalaron en los FBRs válvulas de control automático (Cepex, L10, España) del caudal de alimentación. Los FBRs fueron alimentados diariamente en modo continuo durante 12 horas, desde las 8:00 am hasta las 20:00 pm (correspondiente al período solar), hasta que el cultivo alcanzase el estado estacionario (valores constantes de absorbancia del cultivo a 680 nm. y de concentración de biomasa). Las velocidades de dilución (D) para RW1, RW2, RW3 y RI fueron  $0.15 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.3 \text{ día}^{-1}$ ,  $0.4 \text{ día}^{-1}$  y  $0.3 \text{ día}^{-1}$ , respectivamente. La operación en continuo se mantuvo durante al menos dos semanas en cada ensayo, con el objetivo de garantizar un estado estacionario estable.

Los parámetros monitoreados en línea y registrados cada 6 minutos fueron: pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto (OD) e irradiación incidente sobre la superficie de los RWs. El pH se midió mediante sondas de pH (Crison, España), la temperatura y OD se determinaron con sensores de oxígeno In Pro 6050/120 (Mettler Toledo, España) y la irradiancia incidente con un piranómetro G-54 (LI-COR, EE.UU.). El caudal de alimentación del medio de cultivo se registró cada día usando un medidor de flujo (Cepex, España), mientras que el caudal de salida se calculó teniendo en cuenta las pérdidas por evaporación de agua en cada FBR. Los valores de evaporación en  $\text{L/m}^2$  así como temperatura externa promedio fueron registrados en la estación meteorológica local de la “Las Palmerillas”. El número de horas de sol diarias se obtuvo a partir de mediciones de radiación solar en el lugar.

#### 4.4. Procedimiento de muestreo

El seguimiento de la evolución de los cultivos en los RWs se realizó mediante la extracción diaria de 500 ml de muestra. En cada muestra extraída se determinó: concentración de biomasa mediante peso seco y evolución del cultivo mediante medida de absorbancia a 680 y 750 nm. La medida de absorbancia a 680 nm permite determinar de forma más rápida la concentración de biomasa presente en el cultivo. Una vez alcanzado el estado estacionario, además de los análisis de rutina, se realizaron análisis químicos, microbiológicos y espectros de absorción de los cultivos en el rango del visible. El análisis químico permite conocer la composición del medio de cultivo, tanto

de las corrientes de entrada como de las de salida, para estudiar el consumo de nutrientes, las posibles carencias y evaluar la calidad del agua del efluente de salida. El análisis microbiológico de las corrientes de salidas permite cuantificar el contenido en bacterias aerobias totales y *Escherichia coli*. El barrido de las muestras en el rango del visible (400-800 nm.) permite determinar el coeficiente de extinción de la biomasa ( $K_a$ ) y conocer la influencia del medio de cultivo en las propiedades ópticas de la biomasa. El rendimiento del proceso se ha caracterizado por la eficiencia de remoción, una vez alcanzado el estado estacionario, de DQO, TOC, TIC, TN,  $N-NH_4^+$ ,  $N-NO_3^-$ , TP, *Escherichia coli*, aerobios totales y productividad de biomasa.

#### 4.5. Métodos analíticos

##### 4.5.1. Cuantificación de biomasa y propiedades ópticas

Para la cuantificación de la concentración de biomasa se realizaron medias de peso seco. Se emplearon filtros de 0.7  $\mu m$  de Machenery-Nagüel previamente introducidos en la estufa FED53 Binder (Tuttlingen, Germany) a 80°C durante 24 horas para eliminar la humedad que pudiesen tener. A continuación se filtran 250 ml de cultivo de cada muestra con una bomba de vacío Neuberger modelo N035 1.2. AN.18 (USA) (Fig. 9) y se dejan secar los filtros en la estufa a 80°C durante 24 horas. La diferencia entre el peso del filtro y el peso del filtro con biomasa, corresponde al peso seco de la biomasa en 250 ml. de cultivo, que al multiplicarlo por 1000 ml. permite obtener la concentración de biomasa expresada en g/L.

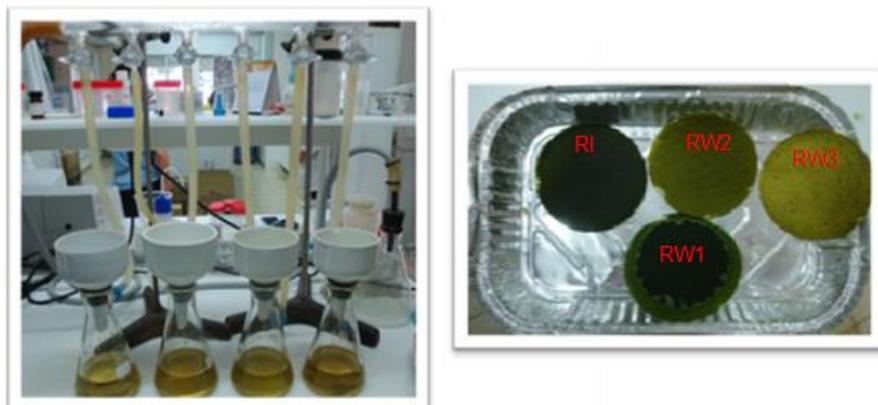


Figura 9. Izq. Sistema de filtración correspondiente a muestras RW1, RW2, RW3 y RI (de drcha. a izq.). Drcha. Papel de filtro de 0.7  $\mu m$  con biomasa de cada FBR.

Para la determinación de las propiedades ópticas se realizaron espectros de absorción de los cultivos en el rango del visible (400-800 nm.) en un espectrofotómetro de doble haz Helios Genesys (10S UV-VIS; Thermo Scientific, Horsham, England), haciendo diluciones cuando los valores de absorbancia superaban 0.8. Luego se calculó el promedio de las absorbancias en el rango del visible y se normalizó con respecto a la concentración de biomasa ( $C_{b_{RW}}$ ) y al dividirlo por el espesor de la cubeta (P) se obtuvo el coeficiente de extinción ( $K_a$ ) expresado en  $m^2/g$ :

$$K_a = \frac{\overline{Abs}}{C_{b_{RW}} \cdot P}$$

#### 4.5.2. Análisis químico de los medios de cultivo

Se realizó el análisis químico de la corriente de alimentación al fotobiorreactor y el análisis del cultivo, una vez que se alcanzó el estado estacionario. Estos análisis se llevaron a cabo con los líquidos filtrados de las muestras extraídas de los RWs y con el filtrado de la corriente de entrada extraída directamente desde el tanque de alimentación de 5000 litros. Se determinaron la concentración de DQO, carbono orgánico total (TOC), carbono inorgánico total (TIC), carbono total (TC), nitrógeno total (TN),  $N-NH_4^+$ ,  $N-NO_3^-$  y fósforo total (TP). Para ello, cada muestra de los RWs fue previamente filtrada con un filtro de 1  $\mu m$  de Machenery-Nagüel. Las concentraciones de DQO, TC (TOC + TIC) y TN se midieron usando el kits Hack-Lange (LCI 400, LCKI 381 y 238, respectivamente) (Germany). Por otro lado, las concentraciones de  $N-NH_4^+$ ,  $N-NO_3^-$  y TP fueron determinadas de acuerdo con los métodos estándar aprobados por el Ministro Español de Agricultura (1982).

- ✓ **Determinación de fósforo:** en un matraz de 25 ml se preparó una disolución compuesta por: 1 ml de muestra, 4 ml de agua, 1 ml de hidroquinona, 1ml de sulfito sódico al 20% y 1 ml de molibdato amónico. Luego se enrasó el matraz aforado y al cabo de 30 minutos se midió su absorbancia a 430 nm. en el espectrofotómetro de doble haz Helios

Genesys (10S UV–VIS; Thermo Scientific, Horsham, England). El equipo arroja resultados en  $\text{mg P-PO}_4^{-3}/\text{L}$ , aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg P-PO}_4^{-3}/\text{L} = \text{Pendiente} \times \text{Absorbancia}$$

donde  $\text{mg P-PO}_4^{-3}/\text{L}$ : Concentración de fosfato calculada y registrada por el espectrofotómetro, *Pendiente*: Obtenida a partir de la curva de calibración, *Absorbancia*: Lectura realizada por el espectrofotómetro.

Para expresar el resultado como exige la normativa, en  $\text{mg P/L}$  se aplicó la fórmula:

$$0.32614 \times \text{mg P-PO}_4^{-3}/\text{L} = \text{mg P/L}$$

✓ **Determinación de  $\text{N-NH}_4^+$** : en un matraz de 25 ml se colocó 1 ml de muestra, 4 ml de agua, 1 ml de tartrato sódico y 1 ml de Reactivo Nessler. Luego se procedió de la siguiente manera:

- Si se quedaba incoloro no contenía amonio  $< 0.1\text{ppm}$ .
- Si se coloreaba a amarillo se enrasaba, agitaba, y transcurridos 15 min. se leía la absorbancia a 410 nm. en el espectrofotómetro de doble haz Helios Genesys (10S UV–VIS; Thermo Scientific, Horsham, England). El equipo arroja resultados en  $\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$ , aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg N-NH}_4^+/\text{L} = \text{Pendiente} \times \text{Absorbancia}$$

donde,  $\text{mg N-NH}_4^+/\text{L}$ : Concentración de amonio calculado y registrado por el espectrofotómetro, *Pendiente*: Obtenida a partir de la curva de calibración, *Absorbancia*: Lectura realizada por el espectrofotómetro.

Para expresar el resultado como exige la normativa, en  $\text{mg N/L}$  se aplicó la fórmula:

$$0.77649 \times \text{mg N-NH}_4^+/\text{L} = \text{mg N/L}$$

- ✓ **Determinación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**: en un matraz de 100 ml. se añadió 1 ml. de muestra, se enrasó, se agitó y se efectuó la lectura de la absorbancia a A<sub>1</sub>= 220 nm, y A<sub>2</sub>= 275 nm en el espectrofotómetro de doble haz Helios Genesys (10S UV-VIS; Thermo Scientific, Horsham, England). La concentración de nitrato expresada en mg N/L se determinó de la siguiente manera:

$$\frac{(A_1 - 2 \cdot A_2) - b}{m} \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L} \times 0.22590 = \text{mg N/L}$$

Donde m: Pendiente de la curva de calibración, b: Ordenada al origen, A<sub>1</sub>: Absorbancia leída a 220 nm, A<sub>2</sub>: Absorbancia leída a 275 nm.

#### 4.5.3. Análisis microbiológico de los medios de cultivo

Los análisis microbiológicos se hicieron según normativa para recuento de *Escherichia coli* y aerobios totales UNE-EN-ISO 9308-1:2001 (2008) y UNE-EN-ISO 6222:1999 (2008), respectivamente. El análisis consistió en sembrar 2 ml. de cada muestra en placas de Petri con agar nutritivo *Mc. Conkey* (Scharlau, España) e incubar las mismas a 37°C durante 48 horas. Tras la incubación, se contaron las colonias bacterianas formadas en cada placa, cada colonia representa a una unidad formadora de colonia (UFC). Los resultados se expresaron en UFC/100ml. para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC}/100\text{ml.} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonias} \times \text{inverso de la dilución} \times 100 \text{ ml}}{2 \text{ ml.}}$$

#### 4.6. Productividad y eficiencia de remoción de nutrientes

La *eficiencia de remoción* de DQO, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, TOC, TIC, TC, TN, TP, *Escherichia coli* y aerobios totales fue calculada para cada RW, en condición de estado estacionario, según la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de remoción de nutrientes (\%)} = \frac{(Q_E \cdot C_E - Q_S \cdot C_S)}{Q_E \cdot C_E} \cdot 100$$

Donde,  $Q_E$  representa el caudal de entrada de purín de cerdo (L/d) y  $Q_S$  el caudal de salida (L/d) en cada RW.  $C_E$  and  $C_S$  son la concentración de entrada y salida de DQO,  $N-NH^+_4$ ,  $N-NO^-_3$ , TOC, TIC, TC, TN, TP, *Escherichia coli* y aerobios totales, respectivamente (en mg/L ó cfu/100 ml.).

La *productividad por área de biomasa* ( $W$ ) expresada en g/m<sup>2</sup>d se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$W = \frac{Cb_{RW} \cdot Q_S}{S}$$

Donde,  $Cb_{RW}$  corresponde a la concentración de biomasa (g/L) en cada FBR;  $Q_S$  representa el caudal de salida (L/d) en cada RW y  $S$  corresponde a la superficie de los RWS ( $S_{RW1}=S_{RW2}=S_{RW3}= 8.33 \text{ m}^2$  y  $S_{R1}= 33 \text{ m}^2$ ).

La irradiancia promedio ( $W/m^2$ ) en el interior del cultivo una vez alcanzado el estado estacionario fue calculada según la siguiente ecuación (Molina et al., 1997):

$$I_{av} = \frac{I_o}{k_a \cdot C_b \cdot L_{eq}} (1 - e^{-k_a \cdot C_b \cdot L_{eq}})$$

Donde,  $I_o$  corresponde a la intensidad espectral incidente ( $W/m^2$ );  $K_a$  representa el coeficiente de extinción de la biomasa ( $m^2/g$ );  $C_b$  es la concentración de biomasa ( $g/m^3$ ) y  $L_{eq}$  corresponde a la longitud equivalente del sistema (m).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Composición de los medios de cultivo

Se han usado como medios de cultivo purín de cerdo sin digestión anaeróbica (PF) y purín de cerdo digerido anaeróticamente (PDA) diluidos con agua al 95%. En la figura 10 se muestran las diferencias en cuanto a la composición de ambos medios de cultivo.

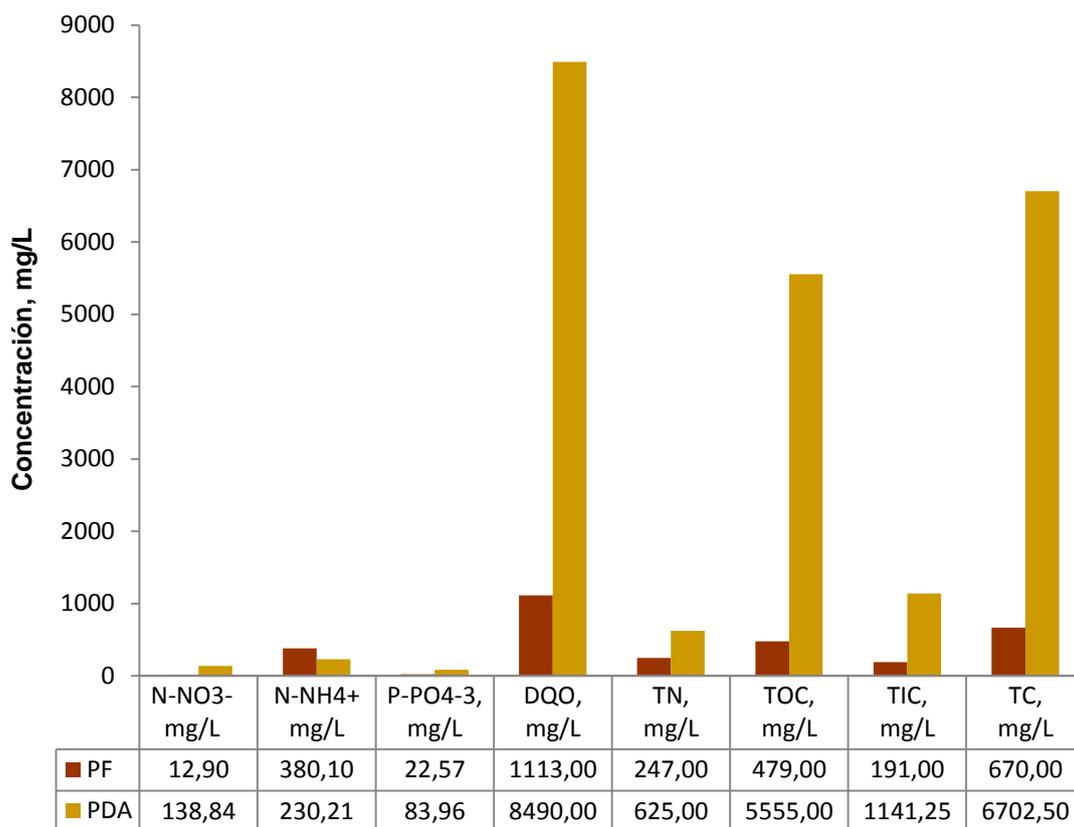


Figura 10. Composición de los dos medios de cultivo (PF y PDA) una vez diluidos con agua de riego hasta una concentración de 5% (P/P).

En ambos medios de cultivo el nitrógeno está principalmente en forma de amonio. En PF la concentración de amonio es 380 mg/L mientras que en PDA es un 60% menor. Según Jongmin et al. (2010) a concentraciones entre 200-500 ppm de  $\text{N-NH}_4^+$  el crecimiento del cultivo puede disminuir hasta un 70%. Otra fuente de nitrógeno para la microalga es el nitrato, en este caso sucede lo contrario al amonio, ya que el PDA tiene un contenido de nitrato 11 veces mayor al contenido en nitrato del PF. Xin (2010) demostró que la microalga *Scenedesmus* sp. LX1 crece más rápidamente con amonio, seguido de urea y finalmente de nitrato. Sin embargo, la eliminación de fósforo y nitrógeno fue más completa en el cultivo donde éste está presente en forma de nitrato y urea que en aquél con amonio.

En cuanto a fósforo, la concentración en PDA es aproximadamente cuatro veces superior a la concentración en PF, 84 mg/L y 23 mg/L, respectivamente. La cantidad necesaria de fósforo es mucho menor que la de nitrógeno para una misma cantidad de biomasa generada. La relación N/P es un valor que permite

conocer el estado nutricional del fitoplancton, valores mayores a 20 indican una deficiencia en fósforo mientras que valores menores de 10, deficiencia en nitrógeno (Reynolds, 1984; Bulgakov & Levich, 1999; Marinho & Moraes, 2002). En los medios de cultivos analizados, la relación N/P son 12 y 9 para PF y PDA, respectivamente. Estos valores estarían indicando una buena relación N/P para PF y una leve deficiencia de nitrógeno en PDA.

En general, el fitoplancton requiere una proporción molar aproximada de 106/16/1 de carbono, nitrógeno y fósforo para un crecimiento balanceado del mismo. Desviaciones de esta proporción pueden sugerir limitación de nutrientes (Lagus, 2009). Para el caso del medio PF este ratio es de 100/37/3 y para el caso de PDA es de 100/9/1. Estos ratios estarían indicando que PDA está limitado en nitrógeno mientras que PF en carbono. Sin embargo, el control de pH del sistema mediante inyección de CO<sub>2</sub> a demanda, descarta al carbono como nutriente limitante durante el cultivo. Por último, la concentración de DQO en PDA es aproximadamente 8 veces mayor a la presente en PF, es decir, que PDA tiene un mayor contenido de materia orgánica susceptible de ser oxidada.

## 5.2. Concentración y productividad de biomasa

Los ensayos se han llevado a cabo en continuo a una velocidad de dilución constante, según tipo de FBR, durante el periodo solar. Los resultados obtenidos de concentración de biomasa en estado estacionario para los diferentes ensayos y reactores se muestran en la figura 11. Se observa como la concentración de biomasa en el reactor inclinado es muy superior a la de los demás fotobiorreactores, para ambos medios de cultivos empleados. Esta diferencia se debe a que en el RI la disponibilidad de luz es mayor por su menor profundidad. Por otro lado, conforme aumenta la velocidad de dilución y disminuye el tiempo de residencia hidráulico, la concentración de biomasa en los raceways RW1, RW2 y RW3 disminuye independientemente del medio de cultivo empleado (PF ó PDA). Sin embargo, se observa que en todos los FBRs se alcanza una mayor concentración de biomasa cuando se emplea como medio de cultivo PDA. El hecho de que la concentración de biomasa sea mayor con PDA que con PF puede deberse a la mayor concentración de amonio presente en este último.

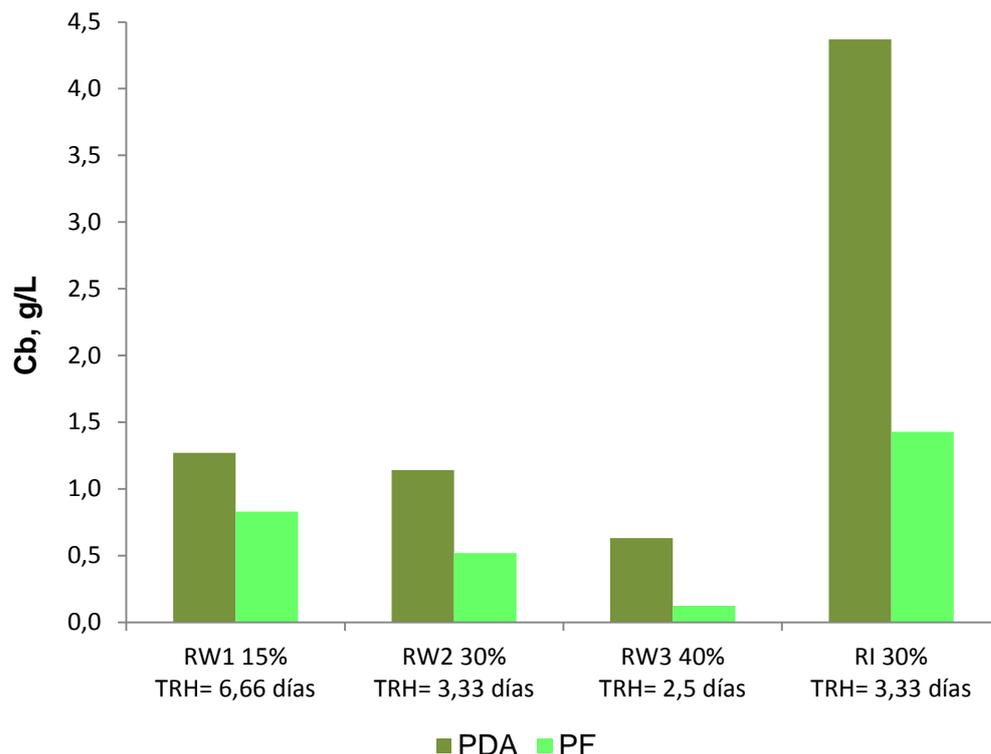


Figura 11. Concentración de biomasa alcanzada en estado estacionario en cada uno de los fotobiorreactores en función de la velocidad de dilución impuesta (inversa del TRH) y medio de cultivo utilizado.

Los resultados obtenidos a partir del peso seco permiten cuantificar la productividad de biomasa en estado estacionario, en función de la composición del medio de cultivo y del tipo de fotobiorreactor empleado (figura 12). Los valores de productividad por unidad de superficie que se obtuvieron usando como medio de cultivo PF están comprendidos entre 4.32 y 26.66  $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$ . Mientras que los obtenidos con PDA están entre 8.39 y 25.84  $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$ . La productividad más alta (26.66  $\text{g/m}^2\cdot\text{d}$ ) se consiguió en el reactor de capa fina RI empleando como medio de cultivo PF, mientras que el nivel más pequeño se obtuvo en el RW3, trabajando con una velocidad de dilución de  $0.4 \text{ días}^{-1}$  (equivalente a un TRH de 2.5 días) con medio PDA. Los valores de productividad anteriormente mencionados, son muy similares con los obtenidos por Fallowfield y Garrett (1985) quienes trabajaron con reactores raceways de 2200 litros para el tratamiento de purines de cerdo.

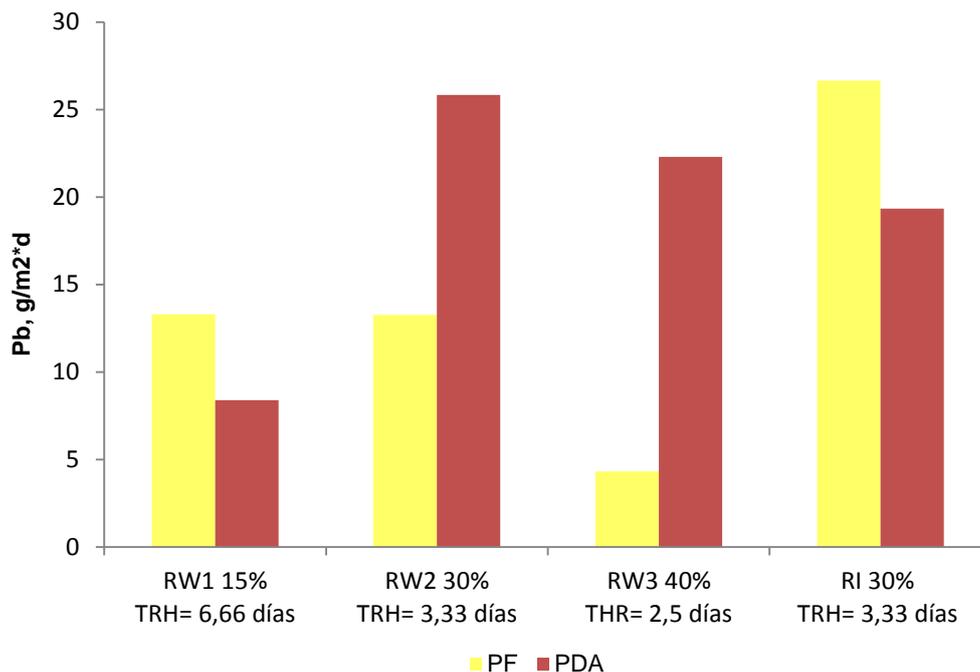


Figura 12. Productividad de biomasa alcanzada en estado estacionario en cada uno de los fotobiorreactores en función de la velocidad de dilución impuesta (inversa del TRH) y medio de cultivo utilizado.

La productividad alcanzada en RW2 (velocidad de dilución de  $0.3 \text{ días}^{-1}$  y TRH de 3.33 días) con medio de cultivo PDA es análoga a la alcanzada en RI (velocidad de dilución de  $0.3 \text{ días}^{-1}$  y TRH de 3.33 días) alimentado con PF, a pesar de que el volumen del RI es muy superior al de RW2, obteniéndose valores de 26.66 y 25.84  $\text{g/m}^2 \cdot \text{d}$ , respectivamente. Estos valores fueron superiores a los reportados por Min et al. (2014) quienes obtuvieron productividades entre 19.15 y 23.19  $\text{g/m}^2 \cdot \text{day}$  empleando como medio de cultivo purín de cerdo digerido anaeróticamente y un fotobiorreactor abierto de similar características. Por otro lado, se observa que conforme aumenta la velocidad de dilución y utilizando como medio de cultivo PF, la productividad por unidad de superficie disminuye, de igual manera que lo hace la concentración de biomasa (Figura 12).

### 5.3. Propiedades ópticas del cultivo y disponibilidad de luz

Para estudiar las propiedades ópticas del cultivo se han realizados barridos de la absorbancia de los mismos una vez alcanzado el estado

estacionario del cultivo (Figura 13). Los resultados indican que la biomasa obtenida en el RI es la que presenta mayor absorbancia y mayor altura del pico en la zona de 680 nm, correspondiente a la longitud de onda de absorción de las clorofilas. Este comportamiento puede ser debido a la menor profundidad que presenta este FBR comparado con los otros tres FBRs estudiados. Por el contrario, las biomases obtenidas en los demás raceways (RW1, RW2 y RW3) presentan menor absorbancia y un perfil más plano a la longitud de onda de las clorofilas, observándose en RW3 ausencia de pico.

La tendencia que se observa es que al aumentar la velocidad de dilución (D) en los FBRs, menor es la absorbancia y la altura del pico a 680 nm. Además se puede ver en la gráfica que los niveles de absorbancias en los cultivos con medio PDA son más altos que con PF, probablemente debido a las diferencias en concentración de DQO en ambos medios de cultivo.

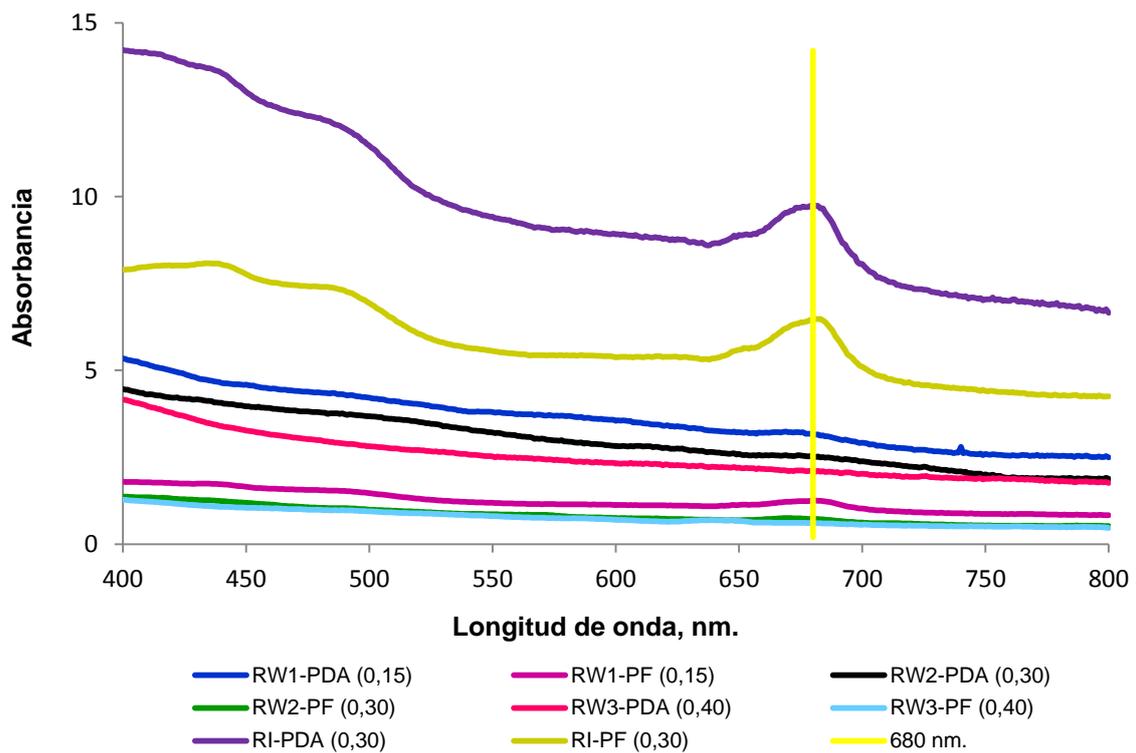


Figura 13. Variación de la absorbancia de los cultivos una vez alcanzado el estado estacionario en función de la longitud de onda, medio de cultivo empleado (PF, PDA), tipo de fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

Los promedios de 24 horas de radiación PAR que incidieron en los cultivos durante los períodos de estado estacionario correspondientes a los meses de Abril (para el ensayo con PF) y Mayo (para el ensayo con PDA) fueron:  $212 \text{ W/m}^2$  y  $181 \text{ W/m}^2$ , respectivamente. Estos valores indican que la radiación PAR en el mes de abril fue un 17% mayor a la del mes de mayo. Esta pequeña diferencia se debe a cambios en las condiciones climatológicas.

Un incremento en la irradiancia incidente sobre la superficie del reactor no implica un aumento de la irradiancia promedio ( $I_{av}$ ) que recibe cada célula. Si la densidad del cultivo aumenta y/o la concentración de materia orgánica en el medio de cultivo es alta, se darán fenómenos de sombreado en las células, disminuyendo  $I_{av}$ . Para determinar la irradiancia media que recibe cada célula en cada condición ensayada, es necesario determinar experimentalmente el valor de  $K_a$  en el rango visible (Figura 14). Cuanto mayor es el valor de  $K_a$ , mayor es la atenuación de la irradiancia en el seno del cultivo.

Los resultados muestran que el medio de cultivo PDA origina una mayor atenuación de la luz que PF, esto se debe a que PDA tiene un mayor contenido de materia orgánica. Por otro lado, se puede observar que en RW3 el coeficiente de extinción de la biomasa presenta el valor más alto, en torno a  $0.59 \text{ m}^2/\text{g}$ , esto estaría indicando que la atenuación de la irradiancia en el seno del cultivo es muy fuerte comparada con los demás FBRs. RW2 y RI presentan similares niveles de atenuación de la luz, alrededor de  $0.16 \text{ m}^2/\text{g}$  para PF y  $0.21 \text{ m}^2/\text{g}$  para PDA. Sepúlveda et al. (2015) reportaron similares valores de  $K_a$  ( $0.19$  y  $0.21 \text{ m}^2/\text{g}$  a  $65$  y  $109 \text{ W/m}^2$ ) en aguas residuales urbanas digeridas anaeróbicamente diluidas con agua de mar hasta un 50% (P/P). Mientras que en RW1 el coeficiente de extinción de la biomasa en PF es igual al de RW2 y RI pero algo superior ( $0.30 \text{ m}^2/\text{g}$ ) cuando se emplea como medio de cultivo PDA.

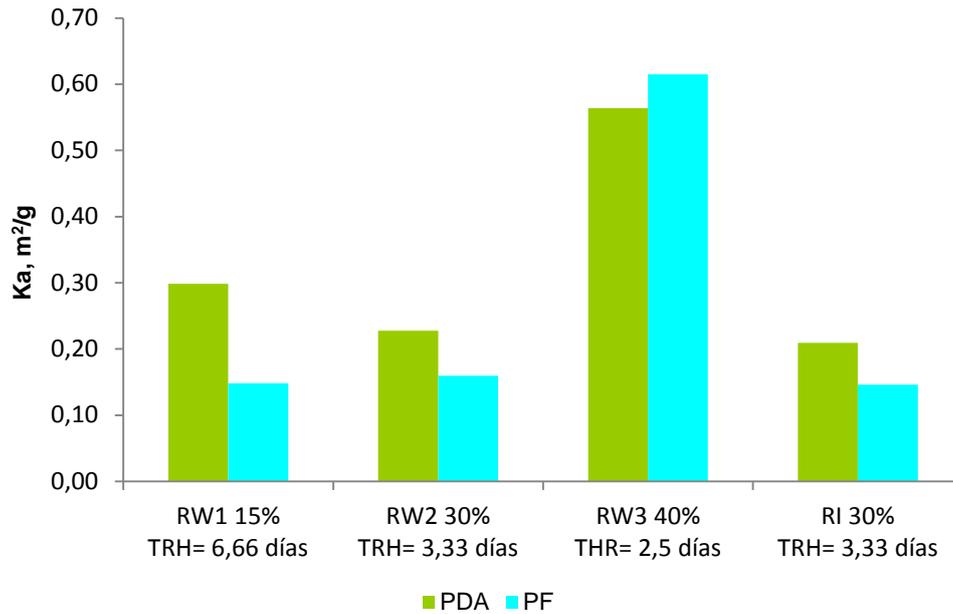


Figura 14. Coeficiente de extinción de la biomasa para los distintos cultivos en estado estacionario, en función de la velocidad de dilución impuesta, medio de cultivo empleado (PF, PDA) y tipo de fotobiorreactor empleado.

Se define la irradiancia promedio ( $I_{av}$ ) como la irradiancia que recibe una célula media del cultivo, y se relaciona directamente con la irradiancia incidente ( $I_0$ ) e inversamente con el paso de la luz del cultivo, la densidad celular del mismo y el coeficiente de extinción de la biomasa. Conociendo el valor de  $K_a$ , la profundidad del reactor, la concentración de biomasa y la irradiación solar incidente, se calcula la irradiancia promedio en el interior del cultivo ( $I_{av}$ ) en condición de estado estacionario (figura 15). Los resultados muestran que la irradiancia promedio (considerando 24 h) en RW1, RW2 y RW3 aumenta a medida que aumenta la velocidad de dilución ( $D$ ) independientemente del medio de cultivo empleado, sin embargo la productividad de biomasa disminuye en ese orden. En todos los FBRs la irradiancia promedio es más alta con PF que con PDA, esto se debe a que PF tiene una concentración de DQO aproximadamente 8 veces menor que PDA.

Por otro lado, es importante destacar que  $I_{av}$  más alta se alcanzó en el reactor de capa fina RI con medio de cultivo PDA, la razón de ello es la diferencia de profundidad que existe entre este biorreactor y los demás RWs. Según Harris (1978) la fotoinhibición de las algas puede ocurrir a un nivel radiación lumínica correspondiente a tres veces el nivel de saturación de la luz

( $3 \cdot I_k$ ). El nivel de saturación de la luz ( $I_k$ ) para *Scenedesmus* sp. es  $120 \mu E/m^2 \cdot s$  ( $26 W/m^2$ ) (Latala, 1991), por lo que la fotoinhibición en esta especie ocurriría a  $360 \mu E/m^2 \cdot s$  ( $78 W/m^2$ ). Sin embargo, como se puede ver en la figura 16 este fenómeno no fue observado en ninguno de los fotobiorreactores analizados.

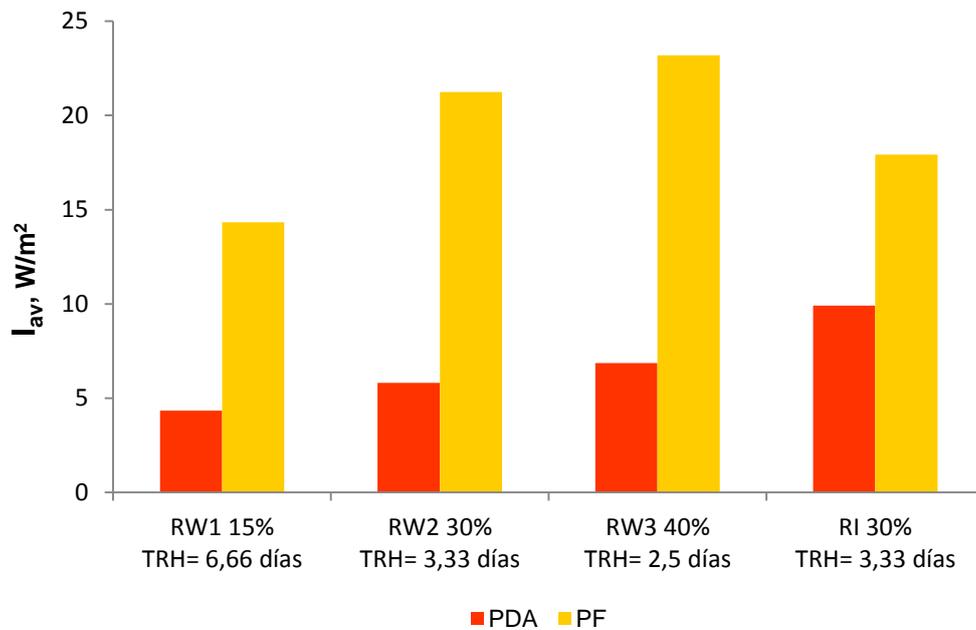


Figura 15. Irradiancia promedio en el interior de los cultivos (considerando 24 h.) en estado estacionario en función de la velocidad de dilución impuesta, medio de cultivo empleado (PF, PDA) y tipo de fotobiorreactor empleado.

#### 5.4. Eficiencia de remoción de nutrientes

Los valores de DQO de la alimentación a la entrada (diluciones de PF y PDA al 5% P/P) del reactor, a la salida del mismo una vez alcanzado el estado estacionario y el % de eliminación se muestran en la Tabla 2. Se observa que a medida que aumenta la tasa de dilución ( $D$ ), mayor es la cantidad de DQO en la corriente de entrada. En general, los porcentajes de eliminación de DQO estuvieron comprendidos entre un 79% y 98%; siendo el porcentaje de remoción de materia orgánica mayor en medio PDA que en PF. Algunos autores relacionan la eliminación de DQO con la productividad del cultivo y así señalan que en cultivos con baja productividad de biomasa la depuración de DQO es como máximo del 8% (Udom et al., 2013), pero para productividades

más altas de biomasa, la tasa de depuración de DQO es más elevada, alcanzando valores de hasta el 70% (Min et. al., 2011). En el reactor de capa fina RI se alcanzó el mayor porcentaje de remoción, alrededor del 91% en PF y 98% en PDA. Estos valores fueron superiores a los reportados por Molinuevo-Salces et al. (2010) quienes alcanzaron un 50% de remoción de materia orgánica empleando como medio de cultivo PDA y fotobiorreactores abiertos.

Tabla 2. Cantidad diaria de DQO tratada en los diferentes experimentos según medio de cultivo empleado, configuración del fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

| Reactor        | Entrada DQO, mg/día |         | Salida DQO, mg/día |       | %DQO eliminado |              |
|----------------|---------------------|---------|--------------------|-------|----------------|--------------|
|                | PF                  | PDA     | PF                 | PDA   | PF             | PDA          |
| <b>RW1 15%</b> | 202566              | 955125  | 27803              | 19641 | <b>86,27</b>   | <b>97,94</b> |
| <b>RW2 30%</b> | 290493              | 2063070 | 35833              | 63630 | <b>87,66</b>   | <b>96,92</b> |
| <b>RW3 40%</b> | 378420              | 2886600 | 77996              | 82316 | <b>79,39</b>   | <b>97,15</b> |
| <b>RI 30%</b>  | 459669              | 3056400 | 39731              | 52414 | <b>91,36</b>   | <b>98,29</b> |

En cuanto a la remoción de nitrógeno amoniacal es otro aspecto importante en el tratamiento de aguas residuales. En la Tabla 3 se indican las cantidades diarias de amonio en la corriente de entrada al reactor, a la salida una vez alcanzado el estado estacionario y el porcentaje de eliminación según medio de cultivo y tipo de FBR empleado. Conforme aumenta la tasa de dilución (D) en los FBRs, mayor es la cantidad de amonio tratado diariamente en la corriente de entrada. En general, los porcentajes de eliminación amonio estuvieron comprendidos entre un 44% y 99%; siendo el porcentaje de remoción de amonio mayor en medio PDA que en PF. Los valores de eliminación de amonio alcanzados en medio PDA (superior al 96%) son similares a los obtenidos por Posadas et al. (2015) quienes llevaron a cabo el cultivo de microalgas con aguas residuales procedentes del tratamiento primario de la estación depuradora de aguas residuales de Almería. En general, la principal forma de remoción de amonio fue por actividad biológica porque al estar el pH controlado en 8 (por inyección de CO<sub>2</sub> a demanda), los cultivos no estaban limitados en carbono y por tanto la eliminación de amonio por stripping fue minimizada. La disminución del porcentaje de remoción de

amonio en los fotobiorreactores RW2 y RW3 para el caso de PF, probablemente se debió a la elevada concentración de amonio con que fueron alimentados los mismos, originando una inadecuada relación sustrato/microalga. Similar comportamiento fue reportado por Molinuevo-Salces et al. (2010) en FBRs abiertos alimentados con elevadas concentraciones de amonio. La eficiencia de remoción de amonio más alta se observó en el reactor de capa fina RI, valores comprendidos entre 98 y 99%; mientras que la más baja en RW2 y RW3 quienes presentaron valores similares para ambos medios de cultivo. Hay que destacar que la elevada remoción de amonio (97%) en RW3 con medio PDA se debe principalmente al fenómeno de stripping, debido a que la productividad de biomasa en el mismo fue muy baja.

Tabla 3. Cantidad diaria de amonio ( $N-NH_4^+$ ) tratada en los diferentes estados estacionarios estudiados según medio de cultivo empleado, configuración del fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

| Reactor        | Entrada $N-NH_4^+$ , mg N/día |       | Salida $N-NH_4^+$ , mg N/día |      | % $N-NH_4^+$ eliminado |              |
|----------------|-------------------------------|-------|------------------------------|------|------------------------|--------------|
|                | PF                            | PDA   | PF                           | PDA  | PF                     | PDA          |
| <b>RW1 15%</b> | 69178                         | 25899 | 21676                        | 466  | <b>68,67</b>           | <b>98,20</b> |
| <b>RW2 30%</b> | 99206                         | 55942 | 55064                        | 1923 | <b>44,50</b>           | <b>96,56</b> |
| <b>RW3 40%</b> | 129234                        | 78272 | 70080                        | 2354 | <b>45,77</b>           | <b>96,99</b> |
| <b>RI 30%</b>  | 156981                        | 82877 | 541                          | 1190 | <b>99,66</b>           | <b>98,56</b> |

En cuanto a la remoción de nitrato, en la Tabla 4 se indican las cantidades de nitrato ( $N-NO_3^-$ ) tratadas diariamente en la corriente de entrada al reactor, las cantidades de salida, una vez alcanzado el estado estacionario y el % de eliminación, en función del medio de cultivo y tipo de FBR. A medida que aumenta la tasa de dilución (D) en los FBRs, mayor es la cantidad de nitrato en la corriente de entrada. En general, los porcentajes de eliminación nitrato estuvieron comprendidos entre un 39% y 98%. La eficiencia de remoción de nitrato más alta se observó en RW1 (98% tanto en PDA como PF), seguido por RI con una capacidad de eliminación similar (94% PF y 98% PDA). Por otro lado, la eficiencia más baja fue observada en RW3, con valores comprendidos entre un 39% en PDA y 70% en PF. Esta reducción, probablemente, está relacionada con la baja productividad alcanzada en el mismo. Thaer (2002) estudió el porcentaje de remoción de nitrato en aguas residuales llevado a cabo por tres cepas de microalgas (dos de ellas de la especie *Scenedesmus*) y

observó que a un tiempo de retención de 12 días, el porcentaje de eliminación de nitrato por *S. abundanse* y *S. quadricauda* fue 23% y 38%, respectivamente. Los porcentajes de eliminación obtenidos en este estudio fueron superiores a los reportados por Thaer (2002).

Tabla 4. Cantidad diaria de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tratada en los diferentes estados estacionarios estudiados según medio de cultivo empleado, configuración del fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

| Reactor        | Entrada N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mg N/día |       | Salida N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mg N/día |       | % N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> eliminado |              |
|----------------|---|-------|--|-------|--|--------------|
|                | PF  | PDA   | PF   | PDA   | PF   | PDA          |
| <b>RW1 15%</b> | 2347  | 15620 | 50   | 376   | <b>97,85</b>                               | <b>97,59</b> |
| <b>RW2 30%</b> | 3366  | 33739 | 724  | 6127  | <b>78,50</b>                               | <b>81,84</b> |
| <b>RW3 40%</b> | 4385  | 47207 | 1325   | 28686 | <b>69,79</b>                               | <b>39,23</b> |
| <b>RI 30%</b>  | 5327  | 49984 | 331  | 1015  | <b>93,78</b>                               | <b>97,97</b> |

En cuanto a la remoción de fosfato, en la Tabla 5 se indican las cantidades de fosfato tratadas diariamente en la corriente de entrada al reactor, las cantidades de salida, una vez alcanzado el estado estacionario y el % de eliminación según medio de cultivo y tipo de FBR empleado. Al igual que en los casos anteriores, conforme aumenta la tasa de dilución (D) en los FBRs, mayor es la cantidad de fosfato en la corriente de entrada. En general, la eficiencia de remoción de fosfato estuvo comprendida entre un 65% y 94%, siendo los porcentajes de remoción mayores en medio PF que en PDA, excepto en el reactor de capa fina RI donde la eliminación de fosfato fue mayor en PDA. La mayor eliminación de fósforo en medio PF se debe, probablemente, a la mayor irradiancia promedio que incide en dicho cultivo (14-23 W/m<sup>2</sup>). Sepúlveda et al. (2015) alcanzaron hasta un 86% de eliminación de fósforo en aguas residuales urbanas digeridas anaerómicamente diluidas con agua de mar hasta un 50% (P/P) y trabajando con un nivel de irradiancia de 65 W/m<sup>2</sup>. El porcentaje más elevado de eliminación de P-PO<sub>4</sub>-3 se observó en RI (82% en PF y 93% en PDA), mientras que el más bajo en RW3, con valores comprendidos entre un 57% en PDA y 84% en PF. Se puede observar que en RW3, el porcentaje de remoción disminuye en concordancia con la disminución de amonio, esto se debe a la alta concentración de amonio con que fueron alimentados los mismos, originando una inadecuada relación sustrato/microalga (Molinuevo-Salces et al., 2010). Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por

Molinuevo-Salces et al. (2010) quienes alcanzaron un porcentaje de remoción de fosfato de aproximadamente el 80%. Sin embargo, Posadas et al. (2015) obtuvieron porcentajes de remoción de fosfato más bajos, valores comprendidos entre un 27% y 78%, operando con aguas residuales urbanas procedentes del tratamiento primario de la estación depuradora de aguas residuales de Almería.

Tabla 5. Cantidad diaria de fosfato ( $P-PO_4^{-3}$ ) tratada en los diferentes estados estacionarios estudiados según medio de cultivo empleado, configuración del fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

| Reactor        | Entrada P-PO4-3, mg P/día |       | Salida P-PO4-3, mg P/día |      | % P-PO4-3 eliminado |              |
|----------------|---------------------------|-------|--------------------------|------|---------------------|--------------|
|                | PF                        | PDA   | PF                       | PDA  | PF                  | PDA          |
| <b>RW1 15%</b> | 4108                      | 3749  | 632                      | 646  | <b>84,61</b>        | <b>82,76</b> |
| <b>RW2 30%</b> | 5892                      | 8099  | 504                      | 2568 | <b>91,44</b>        | <b>68,29</b> |
| <b>RW3 40%</b> | 7675                      | 11332 | 1210                     | 3924 | <b>84,23</b>        | <b>65,38</b> |
| <b>RI 30%</b>  | 9323                      | 11998 | 1686                     | 685  | <b>81,92</b>        | <b>94,29</b> |

En cuanto al carbono inorgánico total en la Tabla 6 se indican los porcentajes de eliminación de TOC en los diferentes estados estacionarios estudiados según medio de cultivo empleado, configuración del fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta. En general, la eficiencia de remoción de TOC estuvo comprendida entre un 69% y 99%, siendo los porcentajes de remoción mayores en PDA que en PF. Los porcentajes de remoción obtenidos para TOC son muy similares a los calculados para DQO. El porcentaje más elevado de eliminación de TOC se observó en el reactor de capa fina RI (90% en PF y 99% en PDA). Mientras que el más bajo en RW3, con valores comprendidos entre un 69% en PF y 89% en PDA. En el estudio realizado por Posadas et al. (2015) en aguas residuales urbanas procedentes de tratamiento primario, el porcentaje de remoción de TOC que se alcanzó en RW1 a un TRH de 6.7 días fue de 72%, algo menor al obtenido en este estudio en PF (79.70%). Mientras que en RW2 a un TRH de 2.8 días el porcentaje de eliminación de TOC fue de 83%, valor próximo al alcanzado en este trabajo en RW2 con PDA (86.70%). En el caso de RW3 el porcentaje de remoción de TOC que se alcanzó en PF coincide con el obtenido por Posadas et al. (2015) (68% y TRH de 2.7 días). En otro estudio llevado a cabo por Posadas et al. (2014) en aguas residuales de

piscifactoría y mezcla de aguas residuales urbanas con aguas residuales de piscifactoría (para balancear el aporte de N) empleando fotobiorreactores raceways, se obtuvieron porcentajes de remoción de TOC del 65% a TRH de 5 y 7 días, algo más bajo que los alcanzados en esta investigación para similares TRH.

Tabla 6. Porcentaje de remoción de carbono orgánico total (TOC) en los estados estacionarios estudiados según medio de cultivo empleado, configuración del fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

| Reactor                        | % TOC eliminado |       |
|--------------------------------|-----------------|-------|
|                                | PF              | PDA   |
| <b>RW1 15%, TRH= 6,66 días</b> | 79,70           | 93,50 |
| <b>RW2 30%, TRH= 3,33 días</b> | 74,73           | 86,70 |
| <b>RW3 40%, TRH= 2,5 días</b>  | 69,08           | 88,84 |
| <b>RI 30%, TRH= 3,33 días</b>  | 90,37           | 98,52 |

Finalmente se realizaron medidas de la presencia de bacterias totales y *Escherichia coli*. Para ello se realizaron siembras en placas de los cultivos en estado estacionario correspondiente a cada FBR con el objetivo de conocer las poblaciones presentes en los mismos y comprobar si el aumento del porcentaje de depuración de DQO es debido a la presencia o no de bacterias. La metodología empleada es la misma que la utilizada en las plantas depuradoras de aguas residuales convencionales. En cuanto al recuento de bacterias aerobias totales (tabla 7), los resultados muestran que en los dos medios de cultivo (PF y PDA) se alcanzaron remociones superiores a 5 órdenes de magnitud, lo que en términos relativos lleva a eliminaciones del 100%. Aunque quedan bacterias en los efluentes tratados, las concentraciones son muy bajas y próximas a las autorizadas para vertido. Se observa además que las concentraciones de estas bacterias en las corrientes de salida son más elevadas en los cultivos con medio PDA que en los realizados con PF, esto se debe a que PDA tiene un contenido mayor de DQO y menor de amonio que PF, lo cual justifica la mayor tasa de remoción de la DQO en PDA. Además se observa como la cantidad de bacterias presentes en los reactores RW1, RW2 y RW3 son iguales o incluso superiores a la del reactor de capa fina RI, por lo

que resulta independiente de la concentración de microalgas o de la disponibilidad de luz en los cultivos.

Tabla 7. Recuento de bacterias aerobias totales en la corriente de entrada al reactor, en la de salida una vez alcanzado el estado estacionario y % de eliminación según medio de cultivo empleado, configuración del fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

| Reactor        | Aerobios totales,<br>UFC/100mL |          |               |          |          |               |
|----------------|--------------------------------|----------|---------------|----------|----------|---------------|
|                | PF                             |          |               | PDA      |          |               |
|                | Entrada                        | Salida   | Eliminación % | Entrada  | Salida   | Eliminación % |
| <b>RW1 15%</b> | 1,00E+16                       | 2,84E+03 | <b>100,00</b> | 1,00E+13 | 1,25E+09 | <b>99,99</b>  |
| <b>RW2 30%</b> | 1,00E+16                       | 1,83E+03 | <b>100,00</b> | 1,00E+13 | 1,60E+08 | <b>100,00</b> |
| <b>RW3 40%</b> | 1,00E+16                       | 1,49E+03 | <b>100,00</b> | 1,00E+13 | 2,15E+08 | <b>100,00</b> |
| <b>RI 30%</b>  | 1,00E+16                       | 6,32E+03 | <b>100,00</b> | 1,00E+13 | 2,15E+08 | <b>100,00</b> |

En cuanto al recuento de *Escherichia coli* (tabla 8), se observó ausencia de esta bacteria en medio PDA, tanto en la corriente de entrada al reactor como en la de salida. Mientras que en medio PF, si bien hubo ausencia de *E. coli* en la corriente de entrada, a la salida se detectaron concentraciones comprendidas entre 13000 y 20000 UFC/100 mL., esto estaría indicando que se produjeron cambios en las condiciones del medio que favorecieron su proliferación.

Tabla 8. Recuento de bacteria *Escherichia coli* en la corriente de entrada al reactor y en la de salida una vez alcanzado el estado estacionario según medio de cultivo empleado, tipo de fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta.

| Reactor        | E. coli,<br>UFC/100mL |                 |          |                 |
|----------------|-----------------------|-----------------|----------|-----------------|
|                | PF                    |                 | PDA      |                 |
|                | Entrada               | Salida          | Entrada  | Salida          |
| <b>RW1 15%</b> | 0,00E+00              | <b>1,87E+04</b> | 0,00E+00 | <b>0,00E+00</b> |
| <b>RW2 30%</b> | 0,00E+00              | <b>1,92E+04</b> | 0,00E+00 | <b>0,00E+00</b> |
| <b>RW3 40%</b> | 0,00E+00              | <b>1,90E+04</b> | 0,00E+00 | <b>0,00E+00</b> |
| <b>RI 30%</b>  | 0,00E+00              | <b>1,33E+04</b> | 0,00E+00 | <b>0,00E+00</b> |

Las Directivas Europeas 91/271/CEE y 98/15/CEE establecen los límites mínimos de eliminación de nutrientes en aguas residuales para su vertido a aguas continentales o marinas. Los porcentajes de eliminación que exigen son:

DQO= 75%, carbono= 80%, fósforo= 80% y nitrógeno= 70-80%. En general se han alcanzado altas remociones de nutrientes, los porcentajes de eliminación variaron según medio de cultivo empleado, tipo de fotobiorreactor y velocidad de dilución impuesta. El porcentaje de eliminación de fósforo fue de 65-94%, RW2 y RW3 con medio PDA no cumplen con la normativa (valores por debajo del 80%). El porcentaje de remoción de DQO varió entre 79 y 98% por lo que se cumple con la norma (valores mayores a 75%). En cuanto a la remoción de nitrato, se alcanzaron porcentajes de eliminación de 39-98%, sólo RW3 con ambos medios de cultivo (PF y PDA) presentó valores por debajo del 70% que exige la norma. El porcentaje de eliminación de TOC fue de 69-94%, RW2 y RW3 con medio PF no cumplen con la normativa (valores por debajo del 80%). Y por último, el porcentaje de eliminación de amonio alcanzado varió entre un 44 y 99%, RW1, RW2 y RW3 con medio PF no cumplen con los valores exigidos (valores por debajo del 70%).

## 6. CONCLUSIONES

La ficoremediación de purines de cerdo en fotobiorreactores raceways es una de las mejores alternativas para el tratamiento de residuos agropecuarios debido a que es una tecnología fácil de aplicar, versátil, y viable económica y medioambientalmente.

- ✓ El medio de cultivo PDA presentó mayor contenido de nutrientes (nitrato, fósforo y DQO) que el medio PF. Sin embargo, el contenido de amonio fue un 60% menor al de PF.
- ✓ Las mayores productividades de biomasa y eficiencia de remoción de nutrientes se han alcanzado empleando como medio de cultivo PDA. Productividades de biomasa comprendidas entre 8.39 y 25.84 g/m<sup>2</sup>\*d y porcentajes de remoción de DQO, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> y TOC de 98%, 99%, 98%, 94% y 99%, respectivamente.
- ✓ En el reactor inclinado de capa fina RI fue donde se alcanzó la mayor productividad de biomasa y eficacia de remoción de nutrientes. Productividad de biomasa de 26.66 g/m<sup>2</sup>\*d y porcentajes de remoción de

DQO, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> y TOC de 98%, 99%, 98%, 94% y 99%, respectivamente.

- ✓ Se observó que tanto la productividad de biomasa como la eficiencia de remoción de nutrientes decrece conforme aumenta la velocidad de dilución (D) en los fotobiorreactores, es decir: RW<sub>10.15</sub>>RW<sub>20.30</sub>>RW<sub>30.40</sub>.
- ✓ En cuanto al recuento de bacterias aerobias totales, la remoción fue del 100%, mientras que del recuento de *Escherichia coli*, se obtuvo sólo ausencia en medio PDA.

## 7. REFERENCIAS

- Baumgarten, E.; Nagel, M.; Tischner, R. Reduction of the Nitrogen and Carbon Content in Swine Waste with Algae and Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52 (2), 281–284.
- Bulgakov, N.; Levich, A. The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. *Arch Hydrobiol* **1999**, 146 (1), 3-22.
- Fallowfield, H. J.; Garrett, M. K. The Photosynthetic Treatment of Pig Slurry in Temperate Climatic Conditions: A Pilot-Plant Study. *Agric. Wastes* **1985**, 12 (2), 111–136.
- Fernández, I.; Acien, F. G.; Berenguel, M.; Guzmán, J. L.; Andrade, G. a.; Pagano, D. J. A Lumped Parameter Chemical-Physical Model for Tubular Photobioreactors. *Chem. Eng. Sci.* **2014**, 112, 116–129.
- Franklin, L.; Forster, R. The Changing Irradiance Environment: Consequences for Marine Macrophyte Physiology, Productivity and Ecology. *Eur. J. Phycol.* **1997**, 32 (3), 207–232.
- Häder, D.; Figueroa, F. Photoecophysiology of Marine Macroalgae. *Photochem. Photobiol.* **1997**, 66 (1), 1–14.
- Harris, G. P. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. *Archiv für Hydrobiologie Ergebnisse der Limnologie* **1978**, 101-171.
- Kesaano, M.; Sims, R. C. Algal Biofilm Based Technology for Wastewater Treatment. *Algal Res.* **2014**, 5, 231–240.

- Lagus, A. *Role of Nutrients in Regulation of the Phytoplankton Community in the Archipelago Sea* ;, 2009.
- Larsdotter, K. Wastewater Treatment with Microalgae – a Literature Review. *Vatten* **2006**, 62, 31–38.
- Latala, A. Effects of Salinity, Temperature and Light on the Growth and Morphology of Green Planktonic Algae. *Oceanolog.* **1991**, 31, 119-138.
- Marinho, M. M.; Huszar, V. L. M. Nitrogen Availability and Physical Conditions as Controlling Factors of Phytoplankton Composition and Biomass in a Tropical Reservoir (Southern Brasil). *Arch. fur Hydrobiol.* **2002**, 153 (July), 443–468.
- Min, M.; Hu, B.; Mohr, M. J.; Shi, A.; Ding, J.; Sun, Y.; Jiang, Y.; Fu, Z.; Griffith, R.; Hussain, F.; et al. Swine Manure-Based Pilot-Scale Algal Biomass Production System for Fuel Production and Wastewater Treatment--a Case Study. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 172 (3), 1390–1406.
- Min, M.; Wang, L.; Li, Y.; Mohr, M. J.; Hu, B.; Zhou, W.; Chen, P.; Ruan, R. Cultivating *Chlorella* Sp. in a Pilot-Scale Photobioreactor Using Centrate Wastewater for Microalgae Biomass Production and Wastewater Nutrient Removal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, 165 (1), 123–137.
- Ministerio de agricultura, Métodos oficiales de análisis: suelos y aguas, **1982**, ed. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Grima, E. M.; Camacho, F. G.; Pérez, J. A S.; Fernández, F. G. A.; Sevilla, J. M. F. Evaluation of Photosynthetic Efficiency in Microalgal Cultures Using Averaged Irradiance. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, 21 (5), 375–381.
- Molinuevo-Salces, B.; García-González, M. C.; González-Fernández, C. Performance Comparison of Two Photobioreactors Configurations (open and Closed to the Atmosphere) Treating Anaerobically Degraded Swine Slurry. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101 (14), 5144–5149.
- Olguín, E. J. Dual Purpose Microalgae-Bacteria-Based Systems That Treat Wastewater and Produce Biodiesel and Chemical Products within a Biorefinery. *Biotechnol. Adv.* **2012**, 30 (5), 1031–1046.
- Oliver, R. and Ganf, G. Freshwater Blooms. In: Whitton, B. and Potts, M., Eds., *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands **2000**, 149-194.

- Oswald, W.J.; Gotaas H. B.; Ludwig, H. F. and Lynch, V. Algae symbiosis in oxidation ponds. Photosynthetic oxygenation. *Sewage and Industrial Wastes* **1953**, 25(6), 692-705.
- Park, J. B. K.; Craggs, R. J.; Shilton, a. N. Recycling Algae to Improve Species Control and Harvest Efficiency from a High Rate Algal Pond. *Water Res.* **2011**, 45 (20), 6637–6649.
- Park, J.; Jin, H.-F.; Lim, B.-R.; Park, K.-Y.; Lee, K. Ammonia Removal from Anaerobic Digestion Effluent of Livestock Waste Using Green Alga *Scenedesmus* Sp. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101 (22), 8649–8657.
- Posadas, E.; Morales, M. D. M.; Gomez, C.; Acién, F. G.; Muñoz, R. Influence of pH and CO<sub>2</sub> Source on the Performance of Microalgae-Based Secondary Domestic Wastewater Treatment in Outdoors Pilot Raceways. *Chem. Eng. J.* **2015**, 265, 239–248.
- Posadas, E.; Muñoz, A.; García-González, M.-C.; Muñoz, R.; García-Encina, P. A. A Case Study of a Pilot High Rate Algal Pond for the Treatment of Fish Farm and Domestic Wastewaters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, No. April 2014, n/a – n/a.
- Prior, M.; Sampaio, S. C.; Pereira Nóbrega, L. H.; Uribe Opazo, M. A.; Dieter, J.; Pegoraro, T. Combined Pig Slurry and Mineral Fertilization for Corn Cultivation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2013**, 56 (2), 337–348.
- Rawat, I.; Ranjith Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. Dual Role of Microalgae: Phycoremediation of Domestic Wastewater and Biomass Production for Sustainable Biofuels Production. *Appl. Energy* **2011**, 88 (10), 3411–3424.
- Reynolds, C.S. The ecology of freshwater phytoplankton. *Cambridge University Press*. Londres **1984**.
- Sánchez, J. Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia **2007**, 303-304.
- Sepúlveda, C.; Acién, F. G.; Gómez, C.; Jiménez-Ruiz, N.; Riquelme, C.; Molina-Grima, E. Utilization of Centrate for the Production of the Marine Microalgae *Nannochloropsis Gaditana*. *Algal Res.* **2015**, 9, 107–116.
- Kassim, T. I. Possible Use of Microgreen Algae to Remove Phosphate and Nitrate from Wastewater. **2002**, No. 3, 628–632.

- UNE-EN-ISO 6222:1999. Water quality-Enumeration of culturable microorganisms. Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium, **2008**.
- UNE-EN-ISO 9308-1:2001. Water quality-Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria, **2008**.
- Udom, I.; Zaribaf, B. H.; Halfhide, T.; Gillie, B.; Dalrymple, O.; Zhang, Q.; Ergas, S. J. Harvesting Microalgae Grown on Wastewater. *Bioresour. Technol.* **2013**, *139*, 101–106.
- Villasmil, T. Aislamiento, Identificación y cultivo de cianobacterias presentes en la Laguna Gato Negro, Municipio Maracaibo, Estado Zulia. Universidad del Zulia. Maracaibo, República Bolivariana de Venezuela **2004**, 90.
- Xin, L.; Hong-ying, H.; Ke, G.; Ying-xue, S. Effects of Different Nitrogen and Phosphorus Concentrations on the Growth, Nutrient Uptake, and Lipid Accumulation of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* Sp. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (14), 5494–5500.