



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

**REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y NUTRIENTES DE AGUAS RESIDUALES,
PURINES DE CERDO Y DIGESTATO ANAEROBIO UTILIZANDO UN CONSORCIO
DE MICROALGAS-BACTERIAS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA
LIZ ARANGO MUÑOZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR
DRA. FLOR DE MARÍA CUERVO, UAM IZTAPALAPA
DR. ARMANDO GONZÁLEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

QUERÉTARO, MÉXICO, NOVIEMBRE 2015

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Petia Mijaylova Nacheva
Secretario: Dr. González Sánchez Armando
1 er Vocal: Dra. Cuervo López Flor De María
2 do Vocal: Dr. Luna Pabello Víctor Manuel
3 er Vocal: Dr. Buitrón Méndez Germán

Lugar donde se realizó la tesis:

Instituto de Ingeniería, UNAM

Unidad Académica Juriquilla

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA)

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez.

RESUMEN

Los sistemas microalga-bacteria han incrementado su popularidad desde las últimas dos décadas debido a su capacidad para remover tanto materia orgánica como nutrientes de las aguas residuales a la vez que acumular lípidos al interior de las células y proveer biomasa de alto valor agregado. Además, los sistemas con microalgas y bacterias suponen una alternativa al alto gasto energético que llevan consigo los sistemas por lodos activados en términos de aireación ya que la esta se lleva a cabo de manera fotosintética.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) estudiar al sistema microalga-bacteria y su eficiencia para remover materia orgánica y nutrientes de aguas residuales municipales, 2) realizar ensayos con y sin inóculo de micoralgas para conocer el desempeño de éste sistema utilizando tres diferentes sustratos: agua residual municipal, purines de cerdo y digestato anaerobio, 3) comparar éstos sistemas con los mismos tres sustratos contra un sistema aerobio de lodos activados y 4) utilizar purines de cerdo diluídos como sustrato para comparar el comportamiento del sistema cuando se inocula con lodo activado y con un inóculo de microalgas-bacterias.

De éste trabajo se concluyó que los sistemas microalga-bacteria remueven eficientemente la materia orgánica (hasta 85% para algunos casos) de diferentes tipos de aguas residuales y sobretodo que remueven por medios de asimilación una gran cantidad de nitrógeno amoniacal (hasta 55 % en 4 días y hasta 95 % en 7 días). También se concluyó que no es necesaria la inoculación de estos sistemas con cepas puras ni consorcios de microalgas ya que éstas se desarrollan naturalmente en los sistemas siempre y cuando las condiciones sean favorables. Las microalgas crecidas en purines de cerdo tienen una mayor acumulación de lípidos al interior de las células (hasta 13 %) que cuando se crecen en agua residual municipal o digestato anaerobio.

Palabras clave:

Microalgas, lodos activados, agua residual municipal, purines de cerdo, digestato anaerobio.

ABSTRACT

Microalgae-bacteria systems have increased their popularity since the last two decades due to their capacity to remove both organic matter and nutrients from municipal wastewaters and accumulate lipids inside their cells providing added value to the biomass. Besides, microalgae-bacteria systems provide an alternative to the high energy consumption that activated sludge systems bring with them in terms of mechanical aeration because aeration of these systems is carried out by photosynthesis.

The objectives of this study were: 1) to elucidate the microalgae-bacteria system and their efficiency to remove both organic matter and nutrients from municipal wastewater. 2) To perform tests with and without microalgae inocula to determine the performance of these systems using three different substrates: municipal wastewater, piggery wastewater and anaerobic digestate. 3) To compare these systems with the same three substrates against aerobic activated sludge systems. And finally, 4) to use piggery wastewater from a different farm as substrate to analyze and compare inoculation with activated sludge against a mature microalgae-bacterial inoculum that was being grown in municipal wastewater.

From this work, several conclusions can be made: 1) microalgae-bacteria systems efficiently remove organic matter (up to 85 % for some cases) from different types of wastewaters (different sources) and most of all, they can remove nitrogen by means of assimilation (or fixation) (up to 55 % in 4 days and up to 95 % in 7 days). It can also be concluded that no inoculation with pure strains or microalgae consortia is necessary, not even mature microalgae-bacteria inoculum to start a microalgae-bacteria system as long as the conditions are adequate. Microalgae cultivated in piggery wastewater have higher lipid accumulation inside their cells (up to 13 %) than when they are grown in municipal wastewater.

Keywords:

Microalgae, activated sludge, municipal wastewater, piggery wastewater, anaerobic digestate.

AGRADECIMIENTOS

Al LIPATA y al Instituto de Ingeniería de la UNAM por albergarme durante estos dos años, por abrirme las puertas y enseñarme tanto. Por todos los expertos que pasaron por el auditorio del lipata y que tuve la grata oportunidad de conocer y aprender un poco de ellos.

A mi asesor, el Dr. Germán Buitrón, por sus palabras de ánimo en momentos de estrés, por su energía siempre viva para enseñar, por su humor particular, por darme sabios consejos, por recordarme que éste es un proceso de constante aprendizaje y por su inmensa paciencia y apoyo durante mi maestría, a él infinitas gracias.

A mi comité tutorial, el Dr. Armando González y la Dra. Flor de María Cuervo por su disposición para resolverme las dudas que se me presentaron a lo largo de los semestres y por sus oportunas críticas e ideas respecto al trabajo.

Al Maestro Jaime Pérez y a la Maestra Gloria Moreno por estar siempre dispuestos a ayudarme y a brindarme sus valiosos consejos cuando me enfrentaba a dificultades con equipos y problemas que no sabía resolver.

A mis colegas y amigos: Alberto Villa, Alfonso Castillo, Sebastián Arcila, Víctor García y Eliane Guevara por su compañía, su ayuda incondicional y sobre todo por alegrarme los días en el laboratorio.

Se agradece el apoyo financiero para la realización de esta tesis a través de CONACYT (249590) y DGAPA-UNAM (PAPIIT IN101716)

Muchas gracias a todos.

DEDICATORIA

Éste trabajo está dedicado a mi esposo Juan David por ser mi investigador favorito y la razón para superar las dificultades que se me presentaban, por creer en mí y por darme la fuerza y el amor que necesitaba cada día.

A mi familia, que desde lejos, me apoyaron siempre y me transmitían todo su amor, y por supuesto por creer en mí, los amo.

A Vane y a Dani por acompañarme en éste camino y ser esos bastoncitos que sólo con escucharme, “me arreglaban el caminao’!”, las quiero un montón...

A mis suegros por todo el apoyo, por abrirme las puertas de su casa y por transmitirme el cariño hacia este bello país que es México.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	16
3.1. OBJETIVO GENERAL	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.3. HIPÓTESIS	16
4. FUNDAMENTO TEÓRICO	17
4.1. COMPOSICIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES SEGÚN SU ORIGEN	19
4.1.1. Agua residual municipal	19
4.1.2. Purines de cerdo	20
4.1.3. Efluente líquido de procesos de digestión anaerobia: Digestato	21
4.1.4. Comparación de los tres tipos de agua residual	23
4.2. REQUERIMIENTOS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS	23
4.2.1. Presencia de CO ₂	23
4.2.2. Influencia del pH	24
4.2.3. Influencia de la intensidad lumínica	24
4.2.4. Influencia de la agitación	25
4.2.5. Presencia de nutrientes	25
4.3. MECANISMOS DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES EN SISTEMAS ALGA-BACTERIA	26
4.3.1. Vía asimilatoria	26
4.3.2. Vía abiótica	27
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
5.1. ÁREA DE ESTUDIO	29
5.2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
5.2.1. Inóculo de microalgas cultivadas en medio Bold	29
5.2.2. Inóculo de bacterias	29
5.2.3. Inóculo de microalgas-bacterias cultivadas en agua residual municipal	29
5.2.4. Sustrato #1: Agua Residual Municipal (ARM)	30
5.2.5. Sustrato #2: Purines de Cerdo 1 (PC1)	30
5.2.6. Sustrato #3: Purines de Cerdo 2 (PC2)	31
5.2.7. Sustrato #4: Digestato Anaerobio (DA)	32
5.3. FASES DE EXPERIMENTACIÓN	32
5.3.1. Ensayos preliminares de crecimiento y pruebas de estabilidad del sistema microalga-bacteria en agua residual municipal	33
5.3.2. Evaluación del crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica de un consorcio de microalgas sometido a diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio	35
5.3.3. Evaluación del efecto de la inoculación con microalgas sobre la remoción de nutrientes y materia orgánica de tres diferentes tipos de agua residual	36
5.3.4. Remoción de nutrientes y materia de sistemas por lodos activados operados por lotes	37
5.3.5. Evaluación del desempeño en cuanto a remoción de contaminantes, producción de biomasa y concentración de lípidos de un sistema inoculado únicamente con lodo activado y otro con un inóculo microalga-bacteria y utilizando purines de cerdo diluidos como sustrato	38
5.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	40
5.4.1. Medición de pH	40

5.4.2.	<i>Medición de oxígeno disuelto (OD)</i>	40
5.4.3.	<i>Medición de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)</i>	40
5.4.4.	<i>Medición de la Demanda Química de Oxígeno</i>	40
5.4.5.	<i>Medición de la concentración de Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK)</i>	41
5.4.6.	<i>Medición de la concentración de Nitrógeno amoniacal (NH₄⁺)</i>	41
5.4.7.	<i>Medición de la concentración de Fosfatos (PO₄³⁻)</i>	41
5.4.8.	<i>Medición de la concentración de Nitratos (NO₃⁻)</i>	41
5.4.9.	<i>Medición de la concentración de Nitritos (NO₂⁻)</i>	42
5.4.10.	<i>Observaciones al microscopio</i>	42
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1.	ENSAYOS PRELIMINARES DE CRECIMIENTO Y PRUEBAS DE ESTABILIDAD DEL SISTEMA MICROALGA-BACTERIA EN AGUA RESIDUAL MUNICIPAL.	43
6.2.	EVALUACIÓN DE LA LIMITACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE NUTRIENTES Y MATERIA ORGÁNICA DE UN CONSORCIO DE MICROALGAS SOMETIDO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PURINES DE CERDO Y DIGESTATO ANAEROBIO.	50
6.3.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON MICROALGAS SOBRE LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES Y MATERIA ORGÁNICA DE TRES DIFERENTES TIPOS DE AGUA RESIDUAL	55
6.4.	REMOCIÓN DE NUTRIENTES Y MATERIA ORGÁNICA CON SISTEMAS ALGA-BACTERIA CONTRA SISTEMAS POR LODOS ACTIVADOS OPERADOS POR LOTES	69
6.5.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIPO DE INÓCULO EN LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES Y MATERIA ORGÁNICA ASÍ COMO LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE LOS SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA.	75
7.	CONCLUSIONES	84
8.	RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	85
9.	PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS	86
10.	REFERENCIAS	87
11.	ANEXOS	91

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Descargas municipales y no municipales - CONAGUA 2012</i>	14
<i>Tabla 2 Caracterización de las aguas residuales por sitio productivo de diferentes granjas de tamaño mediano – Tomado de Garzón Zuñiga y colaboradores, 2014</i>	22
<i>Tabla 3 Comparación de los tipos de agua - Tomado de (Cai et al., 2013)</i>	23
<i>Tabla 4 Caracterización del Agua Residual Municipal</i>	30
<i>Tabla 5 Caracterización físico-química de purines de cerdo concentrados de la granja La Dehesa (PC1)</i>	31
<i>Tabla 6 Caracterización físico-química de purines de cerdo concentrados (PC2)</i>	32
<i>Tabla 7 Caracterización físico-química de digestato</i>	32
<i>Tabla 8 Identificación de reactores bajo diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio</i>	35
<i>Tabla 9 Identificación de reactores para ensayo de Agua Residual Municipal con microalgas (ARM+M) y sin microalgas (ARM)</i>	43
<i>Tabla 10 Comparación bibliográfica para aguas residuales</i>	48
<i>Tabla 11 Promedio de remociones de los reactores en duplicado</i>	50
<i>Tabla 12 Caracterización real de los sustratos con diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio</i>	50
<i>Tabla 13 Caracterizaciones realizadas a los sustratos antes de cada ciclo de alimentación</i>	55
<i>Tabla 14 Concentraciones de inóculo iniciales e identificación de los reactores</i>	55
<i>Tabla 15 Identificación reactores con y sin luz</i>	70
<i>Tabla 16 Caracterización de los purines de cerdo (PC 2) diluidas utilizados para éste ensayo</i>	76
<i>Tabla 17 Identificación de los reactores con diferentes tipos de inóculo</i>	76
<i>Tabla 18 Anova de velocidades de remoción de DQOs</i>	110
<i>Tabla 19 Anova de velocidades de remoción de NH₃</i>	110
<i>Tabla 20 Anova de velocidades de remoción de P-PO₄³⁻</i>	110
<i>Tabla 21 Anova de tasas de remoción de NH₃</i>	111
<i>Tabla 22 Anova de tasas de remoción de PO₄³⁻</i>	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Principio de simbiosis entre algas y bacterias para el tratamiento de agua residual, modificada de (Su et al., 2011a).....	18
Figura 2 Esquema simplificado de la asimilación de nitrógeno	26
Figura 3 Tamizado de purines de cerdo.....	31
Figura 4 Montaje experimental prueba de remoción de nutrientes y materia orgánica en agua residual municipal. Volumen de reactores: 1.6 L. Agitación magnética (150 – 200 rpm)	33
Figura 5 Montaje experimental de la fase de estabilización. Volumen de reactores: 450 mL. Agitación orbital: 160 rpm.	34
Figura 6 Montaje experimental de diferentes concentraciones de purines y digestato. Volumen de reactores: 450 mL. Agitación orbital: 200 rpm.....	36
Figura 7 Montaje experimental diferentes sustratos: pertinencia de la inoculación con microalgas. Volumen de reactores: 0.9 L. Agitación magnética: 150 – 200 rpm.	37
Figura 8 Montaje reactores SBR sin iluminación aireados mecánicamente. Volumen de reactores: 0.9 L. Agitación magnética: 160 – 200 rpm.	38
Figura 9 Montaje de reactores con inóculo maduro de microalgas y bacterias y lodo activado. Volumen de reactores: 0.9 L. Agitación magnética: 150 – 200 rpm.	39
Figura 10 Observaciones al microscopio de los sistemas con (ARM + M) y sin (ARM) inóculo inicial de microalgas. Fotografías tomadas en campo claro, ver aumentos en cada foto.	44
Figura 11 Diferentes morfologías de <i>Scenedesmus obliquus</i> (presentándose como unicelulares, y de 2,4,6 y 8 cenobios) como un ejemplo de plasticidad fenotípica (Lürling, 2003).	45
Figura 12 Porcentajes de remoción de DQO y PO_4^{3-} con (ARM+M) y sin (ARM) inóculo de microalgas.	46
Figura 13 Porcentajes de remoción de $N-NH_4^+$ con (ARM+M) y sin (ARM) inóculo de microalgas	47
Figura 14 Dinámica de OD de cada lote.....	49
Figura 15 Dinámica de pH de cada lote.....	49
Figura 16 Seguimiento al microscopio (fotos tomadas en campo claro, 20X).....	49
Figura 17 Remociones de DQO, N y P de los reactores con diferentes concentraciones de digestato anaerobio.....	51
Figura 18 Productividad de biomasa con diferentes concentraciones de digestato anaerobio	52
Figura 19 Remociones de DQO, N y P de los reactores con diferentes concentraciones de purines de cerdo.....	53
Figura 20 Productividad de biomasa con diferentes concentraciones de purines de cerdo	53
Figura 21 Evidencia de poco crecimiento de microalgas en PC 2 y DA 2 (reactores de 450 mL, agitación orbital: 200 rpm)	54
Figura 22 Cambios microbiológicos de la biomasa con purines de cerdo. Fotografías tomadas en campo claro, aumento: 40X.....	54
Figura 23 Dinámicas de remoción de DQOs en reactores con (M + B) y sin (- B) inóculo de microalgas.	56
Figura 24 Dinámica de remoción de nitrógeno amoniacal en reactores con (M + B) y sin (- B) inóculo de microalgas.	57
Figura 25 Dinámica de crecimiento de biomasa de los reactores con (M + B) y sin (- B) inóculo de microalgas....	57
Figura 26 Reactores después de 2 ciclos de operación. (reactores de 900 mL, agitación magnética: 150 – 200 rpm)	58
Figura 27 Micrografías de los reactores A) PC-B en el día 0 y B) PC-B después de tres ciclos de operación. (Formación de flóculos microalga-bacteria). Fotografías tomadas en campo claro (50µm: 20X y 100 µm: 10X)...	58
Figura 28 Remoción de DQOs (media ± SD) de reactores con y sin inóculo de microalgas	59
Figura 29 Dinámica de pH de los reactores.....	60
Figura 30 Porcentajes de remoción de fosfatos (media ± SD) de reactores con y sin inóculo de microalgas.....	60
Figura 31 Remoción de nitrógeno total (media ± SD) de los reactores con y sin inóculo de microalgas	61
Figura 32 Mecanismos de remoción de nitrógeno (media ± SD) de los reactores con y sin inóculo de microalgas .	62
Figura 33 Inóculo de microalgas al microscopio. Fotografía tomada en campo claro, 100X.	64

<i>Figura 34 Cambios en la biomasa ARM-M + B. Fotografías tomadas en campo claro: a) 20X, b) 40X, c) 100X y d): 10X.</i>	65
<i>Figura 35 Cambios en la biomasa ARM-B. Fotografías tomadas en campo claro a 20X.</i>	65
<i>Figura 36 Cambios en la biomasa PC-M + B. Fotografías tomadas en campo claro a 20X.</i>	66
<i>Figura 37 Cambios en la biomasa PC-B. Fotografías tomadas en campo claro. a), b) y c) a 20X y d) a 100X.</i>	66
<i>Figura 38 Cambios en la biomasa DA-M + B y DA-B. Fotografías tomadas en campo claro. a) 4X, b) y c) 10X y d) 100X.</i>	67
<i>Figura 39 Sedimentación de los reactores con (arriba) y sin (abajo) inóculo de microalgas</i>	67
<i>Figura 40 Tinción con rojo Nilo para reactor con ARM. Fotografías tomadas con microscopio de fluorescencia, excitación con láser entre 488-547 nm y emisión entre 560-600 nm. Fotografías con 20µm de escala: 20X y 10µm: 100X.</i>	68
<i>Figura 41 Tinción con rojo Nilo para reactor con purines de cerdo. Fotografías tomadas con microscopio de fluorescencia, excitación con láser entre 488-547 nm y emisión entre 560-600 nm. Fotografías a), b), c), d) y f) fueron tomadas a 40X, fotografía e) a 20X.</i>	69
<i>Figura 42 Porcentajes de remoción de DQO (media ± SD) para los reactores con y sin luz.</i>	71
<i>Figura 43 Remoción de P-PO₄³⁻ (media ± SD) de reactores con y sin luz.</i>	72
<i>Figura 44 Productividad de biomasa (media ± SD) de los reactores con y sin luz.</i>	73
<i>Figura 45 Valores promedios para nitrógeno total en el influente y las diferentes formas de nitrógeno en el efluente</i>	73
<i>Figura 46 Remoción de nitrógeno total (media ± SD) para los reactores con y sin luz.</i>	74
<i>Figura 47 Reactores con aireación y agitación constante.</i>	74
<i>Figura 48 Sedimentación reactor DA-SL</i>	75
<i>Figura 49 Sedimentación reactor ARM-SL.</i>	75
<i>Figura 50 Sedimentación reactor PC-SL.</i>	75
<i>Figura 51 Sedimentación de los reactores último ciclo.</i>	75
<i>Figura 52 Cambios en la biomasa de los reactores con inóculo maduro y con lodos activados. Fotografías tomadas en campo claro: Aumentos señalados en cada fotografía.</i>	77
<i>Figura 53 Dinámicas de OD de los reactores con diferentes tipos de inóculo durante todos los ciclos de operación</i>	78
<i>Figura 54 Dinámicas de pH de los reactores con diferentes tipos de inóculo durante todos los ciclos de operación</i>	79
<i>Figura 55 Remoción de DQO de reactores con diferentes tipos de inóculo</i>	80
<i>Figura 56 Remoción y producción de nitrógeno amoniacal durante todos los ciclos.</i>	81
<i>Figura 57 Remoción y producción de fosfatos durante todos los ciclos.</i>	81
<i>Figura 58 Mecanismos de remoción de nitrógeno amoniacal de los reactores con diferentes tipos de inóculo.</i>	82
<i>Figura 59 Productividad de biomasa y dinámicas de clorofila para los reactores con diferentes tipos de inóculo.</i>	83

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES: ANEXOS

<i>Ilustración 1 Composición típica de un agua residual doméstica</i>	92
<i>Ilustración 2 Adición de muestra y reactivos a los tubos VELP</i>	92
<i>Ilustración 3 Gradilla para tubos VELP</i>	93
<i>Ilustración 4 Esquema general de la etapa de digestión</i>	94
<i>Ilustración 5 Selección de "Analysis" del menú principal</i>	95
<i>Ilustración 6 Sub-menús de la opción "Analysis"</i>	95
<i>Ilustración 7 Lista de blancos</i>	96
<i>Ilustración 8 Menú para crear un nuevo blanco</i>	96
<i>Ilustración 9 Menú de destilación única</i>	97
<i>Ilustración 10 Ventana para entrar el nombre y el volumen de la muestra</i>	98
<i>Ilustración 11 Unidades de medida para los resultados</i>	99
<i>Ilustración 12 Menú para los parámetros del análisis</i>	99
<i>Ilustración 13 Crecimiento el inóculo de chlorella vulgaris en medio Bold modificado</i>	101
<i>Ilustración 14 Cultivo de Chlorella en mayor volumen</i>	102
<i>Ilustración 15 Crecimiento de Chlorella. bajo condiciones de limitación de nitrógeno</i>	103
<i>Ilustración 16 Crecimiento de Chlorella vulgaris en medio Bold (doble de N), día 0</i>	104
<i>Ilustración 17 Crecimiento para producción de biomasa en 1600mL con 10% de inóculo</i>	105
<i>Ilustración 18 Crecimiento de la biomasa en el día 7</i>	105
<i>Ilustración 19 Scenedesmus sin pretratamiento</i>	106
<i>Ilustración 20 Chlorella vulgaris sin pretratamiento</i>	107
<i>Ilustración 21 Chlorella con sonicación antes de la adición del colorante</i>	107
<i>Ilustración 22 Scenedesmus con sonicación antes de la adición del colorante, célula deformada</i>	108
<i>Ilustración 23 Scenedesmus con pretratamiento con Glicerol en 100X</i>	108
<i>Ilustración 24 Scenedesmus y Chlorella con pretratamiento con Glicerol en 40X</i>	109
<i>Ilustración 25 Muestra con sobre-exposición a la luz</i>	109

1. INTRODUCCIÓN

La gran cantidad de agua dulce que se utiliza para fines agrícolas, municipales e industriales resulta finalmente en grandes volúmenes de aguas residuales con altos contenidos de materia orgánica y nutrientes (nitrógeno y fósforo). El vertimiento de éstas a cuerpos de agua receptores trae consigo diferentes problemas ambientales como pérdida de la biodiversidad en la fauna acuática, enfermedades en humanos causadas por la contaminación de los cuerpos de agua lentos (Perez, 2001) y finalmente la eutrofización (Cai et al., 2013).

Diferentes especies de microalgas han sido utilizadas ampliamente para el tratamiento terciario del agua por las remociones de nutrientes que se logran ya sea por asimilación al interior de las células (vía biótica) o por incrementos en el pH que no sólo conducen a la precipitación del fósforo (en presencia de iones de calcio (Ca^{2+}) y la volatilización del ion amonio (NH_4^+) como amoníaco (NH_3) (vía abiótica), sino que también actúa como un sistema de desinfección ya que los patógenos no toleran éstos valores alcalinos de pH (Larsdotter, 2006).

El uso de sistemas biológicos con microalgas y bacterias heterotróficas aerobias como tratamiento secundario a las aguas residuales domésticas fue propuesto desde 1957 por el profesor Oswald y sus colaboradores (Oswald et al., 1957). Éste sistema se basa en la oxigenación microalgal de una manera fotosintética evitando así los altos costos energéticos para la aireación de reactores aerobios (Rosso et al., 2008), a su vez, las bacterias proveen a las microalgas de dióxido de carbono (CO_2) que es liberado al oxidar la materia orgánica.

Estos sistemas de tratamiento también tienen un potencial interesante en otros efluentes industriales como por ejemplo la fase líquida proveniente de los residuos de granjas porcinas y los efluentes líquidos provenientes de los digestores aerobios y anaerobios que son ricos en nutrientes y con bajos porcentajes de materia orgánica (Baumgarten et al., 1999; Godos et al., 2010)

El interés en retomar estos sistemas en la actualidad está fundamentado en la importancia que han cobrado las microalgas como una respuesta a la crisis energética mundial en materia de biocombustibles, principalmente biodiesel por su alta acumulación de lípidos. La producción de biodiesel tiene a la fecha, muchas limitantes (pretratamientos para el secado de la biomasa, rompimiento de las paredes celulares, insumos químicos para llevar a cabo la transesterificación, gran cantidad de materia seca para producir un litro de biodiesel, entre otras) que lo ubican en una posición desfavorable con respecto a los combustibles fósiles (Brennan and Owende, 2010).

Por ésta razón, las microalgas pueden ser utilizadas como otra alternativa a la crisis energética mundial utilizando la biomasa para ser sometida a digestión y aprovechar el metano producido. De ésta manera no sólo hay un ahorro sustancial en el hecho de que no se necesita secar la biomasa para llevar a cabo la digestión sino que teóricamente se espera que la productividad de metano a partir de un sustrato de microalgas y bacterias sea mayor que la de un sustrato únicamente con bacterias (lodo activado) por los altos contenidos de lípidos contenidos dentro de las células de las microalgas (Amin, 2009; Golueke et al., 1957; Schenk et al., 2008)

2. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento de las sociedades y las actividades humanas relacionadas a ellas, lleva consigo un aumento significativo en la cantidad de aguas residuales descargadas día a día. En México se vierten aproximadamente 235.1 m³/s de aguas residuales procedentes de centros urbanos y sólo 93.6m³/s de éstas, se tratan. A su vez, únicamente un 30 % de las aguas residuales industriales son sometidas a tratamiento. La Tabla 1 indica claramente que existe un déficit de plantas de tratamiento en el país que ayuden a disminuir la carga contaminante en los cuerpos de agua receptores.

Tabla 1 Descargas municipales y no municipales - CONAGUA 2012

Centros urbanos (descargas municipales)		
Aguas residuales	7.41	km ³ /año (235.1m ³ /s)
Se recolectan en el alcantarillado	6.59	km ³ /año (209.1m ³ /s)
Se tratan	2.95	km ³ /año (93.6m ³ /s)
Se generan	2	millones de toneladas de *DBO ₅ al año
Se recolectan en el alcantarillado	1.78	millones de toneladas de DBO ₅ al año
Se remueven en los sistemas de tratamiento	0.65	millones de toneladas de DBO ₅ al año
Usos no municipales, incluyendo a la industria:		
Aguas residuales	6.7	km ³ /año (212.6m ³ /s)
Se tratan	2	km ³ /año (63.6m ³ /s)
Se generan	10.05	millones de toneladas de DBO ₅ al año
Se remueven en los sistemas de tratamiento	1.3	millones de toneladas de DBO ₅ al año

*DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno en 5 días.

Para llevar a cabo el tratamiento de aguas residuales en general, los procesos biológicos aerobios son los más utilizados a nivel internacional. Casi un 60 % de los tratamientos biológicos implementados en México son aerobios (CONAGUA, 2013). Tradicionalmente, el oxígeno necesario para que la biomasa lleve a cabo la oxidación de la materia orgánica, es introducido mecánicamente al reactor por medio de aireadores y difusores. Para llevar a cabo este proceso se necesitan alrededor de 0.5 kilo Watts por hora (kWh) de energía eléctrica por metro cúbico de agua residual a tratar (Buitrón y Pérez, 2011).

En la constante evolución de los distintos procesos y tecnologías de tratamiento de aguas residuales, es evidente que el interés fundamental reside en el hallazgo de sistemas con bajos costos de operación y mantenimiento. Los sistemas anaerobios lideran en este sentido ya que producen energía (en forma gaseosa como metano e hidrógeno) y tienen un costo muy bajo de operación ya que no requieren aireación (Larsdotter, 2006).

El reto para los sistemas aerobios está en la búsqueda de un valor agregado al proceso y buscar alternativas económicas para la aireación de la biomasa. La fotosíntesis microalgal ofrece una alternativa para superar las limitaciones económicas de la aireación mecánica ya que las

microalgas liberan el oxígeno (O_2) necesario para que las bacterias heterotróficas puedan oxidar la materia orgánica y éstas proveen a su vez el CO_2 que las microalgas requieren para llevar a cabo la fotosíntesis como se ilustra en la Figura 1.

Los sistemas microalga-bacteria como se presentan teóricamente pueden ser una alternativa de tratamiento de diferentes residuos líquidos (no únicamente aguas residuales municipales). Los mejores candidatos serían aquellos que presenten cargas orgánicas relativamente bajas y altas cantidades de nutrientes (nitrógeno y fósforo) como lo son por ejemplo los purines de cerdo y los efluentes líquidos de los digestores anaerobios (digestato) que también han sido utilizados como sustrato de este tipo de sistema por diferentes autores (Franchino et al., 2013; Godos et al., 2010; Valdecantos et al., 2010).

El desarrollo de una investigación que permita integrar un sistema de tratamiento de aguas residuales de diferentes características (agua residual municipal, purines de cerdo y digestato) donde se logren eficiencias de materia orgánica y nutrientes sin necesidad de aireación mecánica y que a su vez se produzca biomasa rica en microalgas puede dar una idea de la viabilidad de estos sistemas, pues no sólo hay un ahorro energético (consumo de los aireadores) sino que se produce biomasa de alto valor agregado que resultaría en la producción de metano.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general

Evaluar la remoción de materia orgánica y nutrientes de aguas residuales municipales, purines de cerdo y digestato anaerobio utilizando un consorcio de microalgas y bacterias.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica de un consorcio de microalgas sometido a diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio.
- Evaluar el efecto de la inoculación con microalgas sobre la remoción de nutrientes y materia orgánica de tres diferentes tipos de agua residual.
- Evaluar el desempeño en cuanto a remoción de contaminantes, producción de biomasa y concentración de lípidos de un sistema inoculado únicamente con lodo activado y otro con un inóculo microalga-bacteria y utilizando purines de cerdo diluidos como sustrato.

3.3. Hipótesis

- Un sistema de tratamiento de agua residual basado en microalgas y bacterias será capaz de remover materia orgánica y nutrientes eficientemente, sin necesidad de inocularlo con microalgas.
- Los sistemas microalga-bacteria pueden lograr capacidades de remoción de materia orgánica similares a las obtenidas con sistemas de lodos activados operados por lotes utilizando diferentes residuos líquidos como sustrato.

4. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las microalgas son microorganismos unicelulares foto-autótrofos (fuente de energía: Luz y fuente de carbono: CO₂) y se les atribuye el 50 % de la producción fotosintética mundial. Inicialmente, las microalgas se encontraban en cuerpos de agua lénticos y mares, pues la disponibilidad de CO₂ y nutrientes (N y P) procedentes de la atmósfera y de los procesos de oxidación de materia orgánica llevada a cabo en los cuerpos de agua lóticos se acumulaba en estos receptores finales, ofreciendo las condiciones ideales para el crecimiento de las micro y macroalgas (eutrofización).

Como se mencionó anteriormente, en México existe un déficit alto de tratamiento de aguas y el pequeño porcentaje de plantas de tratamiento que trabajan actualmente en el país son bastante precarias en cuanto a los parámetros analizados (la mayoría de ellas sólo se enfoca en la remoción de sólidos y materia orgánica medida como DBO₅ o como la Demanda Química de Oxígeno (DQO)), por lo cual los nutrientes permanecen casi intactos al final del tren de tratamiento. Como consecuencia, las aguas superficiales y subterráneas que constituyen las fuentes principales de abastecimiento de agua potable en el país, han sufrido grandes deterioros.

Casos como Costa de Puerto Escondido y Puerto Ángel, en Oaxaca y de las costas de Yucatán (Perez, 2001), donde el vertido de efluentes con un tratamiento ineficiente o nulo, ha sido la causa de la eutrofización de estos cuerpos de agua. Los efectos de la eutrofización se han asociado también con enfermedades como el cólera y la ciguatera por el consumo de mariscos y peces contaminados por toxinas del fitoplancton (Poot-Delgado, 2010).

Los estudios de los usos biotecnológicos de las microalgas comenzaron con el interés en producir biodiesel a partir de los lípidos acumulados por estos organismos los cuales reportan almacenar hasta 10 veces más que las plantas oleaginosas. Tienen además diversas ventajas en comparación con el cultivo de especies con potencial para producir biodiesel (como palma de aceite, girasol, *Jatropha curcas*, higuera, etc) como son la no competencia con los alimentos, la posibilidad de cultivo durante todo el año, su rápido crecimiento, el no requerimiento de pesticidas, la remoción de nutrientes en el agua que se utiliza como sustrato, entre otras (Borowitzka y Moheimani, 2012).

La producción de biodiesel tiene varias limitantes a la hora de pensar en un proceso a escala real, pues tiene muchos pasos que finalmente se traducen en costos, y la principal limitante es que sólo se puede llevar a cabo con materia seca aumentando muchísimo el costo por litro de biodiesel (Sialve et al., 2009).

El tratamiento de aguas residuales con microalgas y bacterias se ha estudiado desde hace más de 50 años, el profesor Oswald y sus colaboradores fueron los primeros en comenzar a escribir sobre su diseño y aplicación (Oswald et al., 1957).

El tratamiento de aguas residuales con algas y bacterias ofrece un alivio al estrés hídrico del agua, pues para el cultivo de micro-algas se utilizan grandes cantidades de agua y las aguas

residuales contienen suficientes cantidades de nutrientes evitando también el uso de aditivos artificiales.

La implementación de un consorcio estable de microalgas y bacterias para la degradación de la materia orgánica y remoción de nutrientes está basado en la producción de O_2 (gracias a la fotosíntesis microalgal) y éste es después utilizado por las bacterias heterotróficas como aceptor final de electrones para degradar los contaminantes del agua (materia orgánica disuelta). En esta simbiosis, el CO_2 liberado por las bacterias heterótroficas es tomado por la microalga como fuente de carbono durante la etapa de fotosíntesis (Bahr et al., 2011) como se observa en la Figura 1.

El sistema de tratamiento con microalgas y bacterias es económicamente prometedor ya que el principal gasto de las plantas de tratamiento aerobias convencionales es el altísimo consumo de energía de los aireadores de estos tanques (Tchobanoglous et al., 2002) y las microalgas entrarían a ser los proveedores de O_2 del sistema y la energía la toman directamente del sol. Además, se obtiene buena cantidad de biomasa que puede ser utilizada para diferentes propósitos como son: fuente de alimento para humanos, para animales, fertilizantes y más importante aún, la producción de biocombustibles y biogás (Sialve et al., 2009; Wang et al., 2010).

Por esta razón, estos sistemas se han implementado no sólo en aguas residuales municipales, sino que también se ha estudiado su aplicación en los desechos líquidos de animales como purines de cerdo y otros residuos líquidos como el digestato, proveniente de la digestión de diferentes procesos de depuración de aguas o residuos (Franchino et al., 2013)

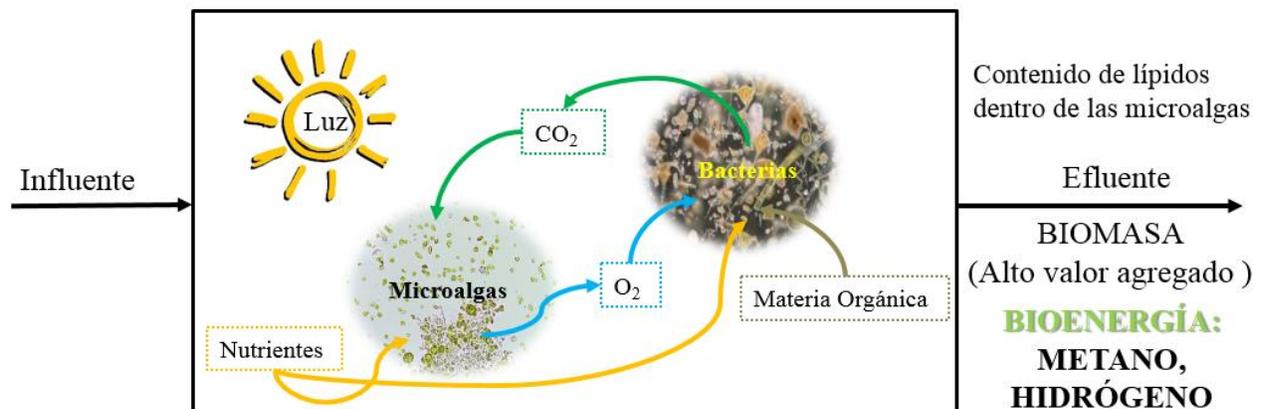


Figura 1 Principio de simbiosis entre algas y bacterias para el tratamiento de agua residual, modificada de (Su et al., 2011a).

Las microalgas más utilizadas en sistemas de tratamiento de aguas pertenecen a los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Desmodesmus*, aunque también se reportan otras como *Nannochloris* y algunas cianobacterias filamentosas como *Fischerella* y *Spirulina*. (Park et al., 2010; Su et al., 2012a).

4.1. Composición de las aguas residuales según su origen

El estudio del cultivo de microalgas en aguas residuales ha cobrado valor desde los últimos 20 años y han mostrado resultados positivos en cuanto a la remoción de nitrógeno, fósforo y otros compuestos como metales pesados presentes en las aguas residuales. La composición de las aguas varían mucho dependiendo de la fuente. Diferentes estudios han mostrado que la cantidad y relación de nutrientes (principalmente N y P) presentes en las aguas residuales afectan significativamente el crecimiento de las microalgas y la producción de lípidos (Cai et al., 2013).

4.1.1. Agua residual municipal

La remoción de nutrientes del agua residual cobra importancia no sólo porque altas concentraciones de éstos en los efluentes tienen un efecto perjudicial en lagos y lagunas receptores conocido como la eutrofización, de la que comenté anteriormente, sino también porque disminuye la acción desinfectante del cloro en las aguas tratadas y forma sustancias tóxicas (sustancias organo-cloradas) aumentando los riesgos para su reúso aguas abajo de la descarga (Tchobanoglous et al., 2002).

En las aguas residuales, el nitrógeno se encuentra en un 70-75 % de manera soluble-inorgánico (proveniente de la orina) y el resto se encuentra de manera insoluble-orgánico presente como proteínas y carbohidratos (residuos de comida).

El N total presente en las aguas residuales puede clasificarse en tres grandes grupos: amoniacal (NH_4^+), oxidado (NO_2^- y NO_3^-) y orgánico (proteínas, ácidos nucleicos, urea, ácido úrico, aminas, bases orgánicas, ácido muriático y azúcares aminados). De todas estas formas las que tienen una mayor importancia desde el punto de vista de la depuración de aguas son el NH_4^+ y el N orgánico (proteína y urea) (Fernández Morales, 2004).

La concentración de N orgánico comúnmente encontrada en el agua residual municipal, varía entre 5 y 35 mg/L, pudiendo observarse una disminución en su concentración con el paso del tiempo debido a su transformación en NH_3 por acción microbiana. Mientras que la concentración del NH_4^+ en esta agua, oscila entre 20 y 100 mg/L.

El fósforo presente en las aguas residuales proviene principalmente de los desechos humanos, actividades industriales, detergentes sintéticos y productos de limpieza. La fracción de ortofosfato inorgánico soluble tiene una concentración en el agua urbana entre 5 y 15 mg/L. Los polifosfatos inorgánicos solubles tienen una concentración aproximada de 3 mg/L (provenientes de los productos de limpieza) y el fósforo orgánico tiene una concentración aproximada de 1-2 mg/L (provenientes de los residuos de origen animal y alimentos) (Soto Valencia, 2012).

4.1.2. Purines de cerdo

La porcicultura es la tercera ganadería más importante en México. El inventario porcino entre 2000 y 2010 tuvo un crecimiento de 15 % aproximadamente pasando de una producción de 14 a 15 millones de cerdos anualmente; de acuerdo a la confederación de porcuicultores mexicanos (2012). A pesar de que se han hecho esfuerzos por mejorar los procesos productivos, sigue habiendo una gran falta de “internalización” de sus costos ambientales. Esto es, que la industria porcina no invierte suficientes recursos en el tratamiento de sus residuos sólidos y líquidos o en la búsqueda de tecnologías para solucionar los problemas ambientales causados por sus desperdicios que por sus grandes volúmenes, la naturaleza es incapaz de degradarlos (Pérez, 2001).

Pérez (2001) realizó un estudio de 33 granjas de cerdos en La Piedad, Michoacán y reveló que en cuanto al tratamiento de los residuos líquidos, 9 % no contaba con ningún tratamiento, 27 % con dos procesos unitarios de tratamiento y 50 % con tres procesos unitarios de tratamiento. Entre los que se encontraban fosas, lagunas (excavadas en el suelo pero sin impermeabilizar), decantadores, y algunos digestores y procesos aerobios. Un alto porcentaje de estos sistemas alcanzaba a remover máximo el 80 % de la carga orgánica.

Garzón Zuñiga (2014) realizó un estudio a 11 granjas porcinas en 14 diferentes puntos de muestreo en los cuales se revelaron altos porcentajes de éstas que no le hacen ningún tratamiento a los efluentes líquidos y sólidos. También se revela que hay poca masificación de medios para remediar estos problemas de contaminación tan altos que cobran cada día más valor gracias al crecimiento de esta industria a nivel nacional.

A diferencia de las aguas residuales municipales, las características del purín son muy variables en función del manejo y tipo de explotación, la composición tanto genérica como de la fracción sólida presenta fuertes cambios en algunos valores (ver Tabla 2) dentro de la misma granja en cortos espacios de tiempo. La heterogeneidad de la composición es notable debido, entre otras causas, a la tasa de dilución del residuo, finalidad de la cría, la alimentación, tipo de limpieza de los establos y almacenamiento del purín, y la época del año en que se analice. Tomar un promedio de concentración de DQO, sólidos y nutrientes para la industria porcina resulta un poco difícil ya que depende en gran medida de los procesos productivos, tamaño y tecnología utilizada para llevar a cabo la limpieza de las camas y demás (Valdecantos et al., 2010). La Tabla 2 es tomada de Garzón-Zuñiga et al (2014) que es un buen ejemplo para mostrar las grandes diferencias que hay en concentraciones de materia orgánica y nutrientes comparando los diferentes procesos productivos y el tamaño (capacidad) de las granjas.

De la de todas maneras, de la Tabla 2 sí se puede concluir que la relación DBO/DQO es una relación en la mayoría de los casos superior al 50-60 %, lo que indica que es un residuo fácilmente biodegradable y la concentración de nitrógeno amoniacal y Nitrógeno Total Kjeldhal (NTK) también revela que es bastante factible utilizar procesos biológicos para su tratamiento.

4.1.3. Efluente líquido de procesos de digestión anaerobia: Digestato

La digestión anaerobia es una tecnología ampliamente utilizada en todo el mundo que utiliza microorganismos para descomponer la materia orgánica y producir biogás. Muchos sistemas de digestión han sido construidos a lo largo de los continentes Americano, Europeo y Asiático para el tratamiento de residuos industriales, municipales y agrícolas. Gran parte de los estudios llevados a cabo actualmente se enfocan en la maximización de la producción de biogás, la cantidad de metano que producen y la degradación de sólidos volátiles como tal pero se descuida un poco el post-tratamiento del efluente de la digestión. La mayoría de los efluentes de la digestión se separan por un sistema de deshidratación en fracciones sólidas y líquidas. La parte sólida normalmente se compostea y se vende como medio para macetas o como aditamento para suelos, mientras que la parte líquida normalmente es usada para aplicación como fertilizante en suelos.

Una aplicación excesiva de este tipo de residuos sobre los suelos puede provocar la penetración de los mismos al subsuelo y acuíferos, aumentando la concentración de fósforo y nitrógeno en los cuerpos de agua contribuyendo a la eutrofización.

Comparado con aguas residuales típicas (agrícolas, municipales e industriales), los efluentes de digestión tienen niveles de carbono bajos gracias a la actividad microbiana llevada a cabo en la digestión que convierte el carbono a metano. El nitrógeno presente en estos residuos está constituido en su mayoría por amonio (Cai et al., 2013).

Tabla 2 Caracterización de las aguas residuales por sitio productivo de diferentes granjas de tamaño mediano – Tomado de Garzón Zuñiga y colaboradores, 2014

Granja	1		2			3	4	5	6	7	8	9	10	11
Proceso productivo	Maternidad	Destete	Maternidad y gestación	Engorda	Mezcla	Engorda	Mezcla	Maternidad	Mezcla	Engorda	Engorda	Engorda	Engorda*	Engorda
Capacidad animales	6 000	6600	3000	3000	3000	5000	5500	5600	2 200	1 200	1 000	1 560	10 800	15 600
Tamaño de granja	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Chica	Chica	Chica	Chica	Grande	Grande
Disponibilidad de agua	Media	Media	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Media	Media	Media	Abundante	Poca	Media	Media-Baja
Clima del lugar	Cálido - semiseco	Cálido - semiseco	Sub - tropical	Sub - tropical	Sub - tropical	Sub - tropical	Tropical	Templado	Templado	Templado	Tropical	Extremo Seco	Templado	Cálido Semi-seco
Observaciones sobre el muestreo	Durante lavado de naves	Dato no disponible	Final de lavado, poca agua	Durante lavado de naves	Durante lavado de naves	Dato no disponible	Durante lavado de naves	Se liberó el agua de una nave de engorda para tomar muestra	Durante lavado de naves					
DQO (mg/L)	3339	37498	19365	38544	6419	19344	25205	3809	7 922	9 300	3 478	16 888	40 498	34 310
DBO ₅ (mg/L)	2494	5600	9262	9188	2646	9613	8460	1657	5 330	5 751	996	11 697	15 061	6 092
SST (mg/L)	1130	16357	11250	25166	2210	10125	15042	1994	3 269	2 332	942	19 857	25 034	42 500
SSV (mg/L)	478	13000	9125	21500	1657	7875	11792	1852	2 981	2 030	672	18 142	19 334	32 500
N Total (mg/L)	550	1345	1371	1452	576	1515	034				524	1 179	1 048	1 666
NTK (mg/L)	550	1345	1369	1450	574	1515	033		1 018	1 907	524	1 179	1 048	1 666
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	380	440		1270	380	1500	1760		496	1 472	200	875	844	890
N-(NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻)	0.13	0.13		1.87	1.89				0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	0.13
P Total (mg/L)	28.6	79.5		149	41.1				101.6	62.2	27.4	214	430.1	97.6
pH	7.83	6.14		6.79	7.17				7.08	7.75	7.8		6.65	7.3
Coliformes fecales	1.50E+07	2.10E+07	4.60E+08	1.10E+08	9.30E+07	4.60E+04	9.20E+08	1.60E+08	1.30E+08	7.90E+05	1.60E+ 06	1.50E+08	1.60E+09	4.70E+07
DBO/DQO	0.75	0.15		0.24	0.4				0.7	0.6	0.3	0.69	0.4	0.18

4.1.4. Comparación de los tres tipos de agua residual

Cai et al (2013) comparan las características y las concentraciones de nitrógeno, fósforo y las relaciones N/P en los diferentes tipos de aguas residuales (municipales, de origen animal, industrial y digestato). Ésos autores discuten, entre otros sustratos, el agua residual proveniente de granjas porcinas, agua residual municipal y efluentes líquidos de la digestión anaerobia como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3 Comparación de los tipos de agua - Tomado de (Cai et al., 2013).

Tipo de agua	Nitrógeno Total (NT) (mg/L)	Fósforo Total (PT) (mg/L)	N/P
Agua residual Municipal	15 – 90	5 – 20	3.3
Purines de cerdo	1110 – 3213	310 – 987	3 – 7.8
Efluente de digestión anaerobia	427 – 467	134 – 321	–

De éstos tres, los purines de cerdo, en teoría, es el agua con mayor contenido de nutrientes pero la relación N/P es muy baja si se compara con la relación ideal que se recomienda en la teoría para el desarrollo de las microalgas (de 30). Al estar por debajo de esa relación, teóricamente lo que tenemos es una limitación por nitrógeno y una “piscina” de fósforo, como lo explica Lavoie y colaboradores (1985) por lo cual es común observar mayores remociones de nitrógeno, que de fósforo.

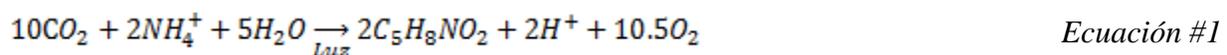
Por su parte, el agua residual municipal, no tiene una gran cantidad de nutrientes como los purines de cerdo y tampoco tiene una relación N/P teórica tan alta como se espera, pero aun así se reportan remociones de hasta 100 % de nitrógeno y de fósforo en sistemas cerrados y abiertos de cultivo de microalgas.

4.2. Requerimientos para el cultivo de microalgas

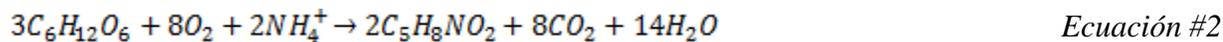
4.2.1. Presencia de CO₂

A pesar de que no todas las microalgas son foto-autótrofas, la mayoría sí lo son. Por tal, es necesario asegurar la fuente de carbono para estas, ya sea por equilibrio natural con el CO₂ presente en la atmósfera, o mejorando la transferencia de masa burbujeando aire o aire enriquecido con CO₂ directamente al reactor. En el caso de los sistemas alga-bacteria, se logra con el CO₂ producido por las bacterias por medio de la degradación de la materia orgánica.

Según la ecuación estequiométrica de producción de biomasa para las microalgas (representadas como C₅H₈NO₂) (ver *Ecuación #1*), se puede observar que se producen 10.5 mol de O₂ por cada 10 moles de CO₂ consumidos (Larsdotter, 2006).



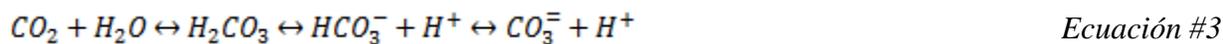
De la ecuación estequiométrica ideal de degradación de la materia orgánica representada en este caso como glucosa (C₆H₁₂O₆) y la generación de nuevas células microbianas heterotróficas (representadas como C₅H₈NO₂) (ver *Ecuación #2*), se observa que se consumen 8 moles de O₂ y se producen 8 moles de CO₂ por cada 3 moles de glucosa consumidos (Tchobanoglous et al., 2002).



Por lo tanto, de una manera teórica y con sustratos y condiciones ideales, ni la concentración de oxígeno ni la concentración de CO₂ tendrían por qué suponer un factor limitante de velocidad en la eliminación de la DQO (que sería llevada a cabo principalmente por bacterias heterótrofas) y de nutrientes (que se llevaría a cabo por bacterias y microalgas).

4.2.2. Influencia del pH

Cuando se están cultivando microalgas, se observa generalmente un incremento en el pH, pues las microalgas consumen rápidamente el CO₂ y el bicarbonato presentes en la solución y el equilibrio de la *Ecuación #3* se desplaza hacia la izquierda provocando un aumento en el pH por aumento en el ion bicarbonato (HCO₃⁻) y el consumo iones H⁺.



Gracias a que en el sistema también interactuarán bacterias que oxidan la materia orgánica, produciendo CO₂, entonces teóricamente se puede lograr un pH estable (alrededor de 7.5) (Munoz, 2005). En sistemas de tratamiento de aguas residuales con sistemas de microalgas-bacterias, con alimentación continua o semi-continua, la alcalinidad del agua es suficiente para mantener este equilibrio y los pH máximos reportados son de 8, 8.5 unidades de pH. Con sistemas de alimentación por lotes, se pueden encontrar pH superiores (hasta 10-11).

4.2.3. Influencia de la intensidad lumínica

La radiación solar es el motor principal de los sistemas naturales foto autotróficos, pues su fuente de energía es la luz. En condiciones de laboratorio se instalan fotobioreactores iluminados con lámparas led para tener condiciones más controladas.

El factor limitante de estos sistemas es justamente la luz. Las microalgas desde su estructura celular están diseñadas para flotar y poder capturar la mayor cantidad de luz posible, ya que a mayor profundidad, menor será la cantidad de luz que logre pasar a través del agua, en medios naturales. Si a esto le sumamos el hecho de trabajar con aguas residuales, purines de cerdo y digestato como medio de crecimiento (aguas con altísimos contenidos de sustancias coloidales y sólidos suspendidos), la cantidad de luz que pueda pasar a través de las paredes de los fotobioreactores es bastante reducida. Para minimizar este efecto se debe asegurar una buena agitación, permitiendo que todas las células estén en contacto por períodos intermitentes de tiempo con la luz.

La luz también puede llegar a causar inhibición (conocida como foto-inhibición), por lo cual se debe procurar trabajar siempre en rangos normales de intensidad lumínica reportados ($100\text{-}200\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

Assemany et al. (2015) evaluó el efecto de la luz en diferentes épocas del año sobre las especies que se encuentran en el sistema alga-bacteria tratando agua residual municipal encontrando que hay un fuerte efecto sobre la diversidad y características de la biomasa microalgal durante las diferentes épocas del año.

4.2.4. Influencia de la agitación

La agitación del sistema permite mantener una concentración uniforme en todo el volumen de reactor. Esto tiene varias ventajas:

- Permite la entrada de la luz a cada célula (teniendo en cuenta que la luz se encuentra en la superficie o en las paredes (si hablamos de reactores tubulares).
- No permite la sedimentación de algas y con ello la ineficiencia de remoción de nutrientes.
- Aumenta el área de transferencia del O_2 y CO_2 atmosférico al interior del reactor

Se debe cuidar la agitación muy violenta para no causar un estrés mecánico en el sistema, se recomienda una agitación no mayor a 300 rpm.

4.2.5. Presencia de nutrientes.

Para cultivar sistemas con algas y bacterias es importante proveerlo de suficiente cantidad de nitrógeno y fósforo, ya que, después de la fuente de carbono, los nutrientes son los segundos en importancia para llevar a cabo la mineralización de la materia orgánica en el caso de las bacterias, y la fotosíntesis y reproducción en el caso de las microalgas.

Según Rhee (1978), la relación N/P óptima para el crecimiento de *Scenedesmus* sp. es de 30. Él estudió los efectos en el crecimiento de la biomasa y la acumulación de nitrógeno y fósforo (celular) con diferentes relaciones de N/P variando entre 5 y 80 para investigar el efecto de la “doble limitación de nutrientes”. Concluyó que no hay un efecto aditivo ni multiplicativo; es decir, por debajo del óptimo (Relación N/P= 30), el crecimiento se veía limitado únicamente por el nitrógeno y por encima del óptimo, únicamente por la concentración de fósforo. También explicó que la concentración de nitrógeno celular se mantuvo constante cuando la relación estaba por encima del óptimo y que comenzaba a decrecer casi justo cuando la relación comenzaba a bajar del óptimo. La concentración de fósforo celular era alta durante el período de relación N/P baja (limitado por nitrógeno) pero disminuyó rápidamente después de alcanzar el óptimo y se mantuvo a un nivel bajo con altos N/P (limitado por fósforo).

Este estudio cobra bastante valor para el presente trabajo ya que justamente se prueban diferentes tipos de aguas residuales y diferentes relaciones de Nitrógeno/Fósforo (N/P) donde probablemente no se puedan esperar las mismas remociones (de manera biológica). También es importante reconocer cuál es la relación de Carbono/Nitrógeno/Fósforo (C/N/P) en los sistemas

porque, a diferencia de Rhee, en el presente trabajo, se van a tener presencia de bacterias heterótrofas y probablemente nitrificantes que van a estar compitiendo por nutrientes, CO₂ y O₂.

4.3. Mecanismos de remoción de nutrientes en sistemas alga-bacteria

En procesos de tratamiento de aguas donde intervienen microalgas y bacterias heterotróficas, los nutrientes (N y P) se eliminan por dos vías:

4.3.1. Vía asimilatoria

- a) *Asimilación de nitrógeno*: El nitrógeno es un nutriente crítico para el crecimiento de todos los organismos vivos. El nitrógeno orgánico se puede encontrar en diferentes sustancias biológicas como los péptidos, proteínas, enzimas, clorofila, moléculas de transferencia de energía (Adenosin Difosfato (ADP), Adenosin Trifosfato (ATP)), material genético (Ácido Desoxirribonucleico (ADN) y Ácido Ribonucleico (ARN)), y demás. El nitrógeno orgánico se deriva del nitrógeno inorgánico que se encuentra en diferentes formas incluyendo el nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻), amonio (NH₄⁺), ácido nítrico (HNO₃) y nitrógeno gaseoso (N₂). Las plantas y microalgas tienen un rol primordial en la conversión de nitrógeno inorgánico a orgánico gracias a un proceso llamado **asimilación** (Cai et al., 2013). Algunas cianobacterias pueden convertir el nitrógeno atmosférico en nitrógeno amoniacal por un proceso llamado **fijación**.

El proceso de la asimilación requiere nitrógeno únicamente en las formas de amonio, nitrato y nitrito. Como se observa en la Figura 2, para que los nitratos y nitritos puedan ser asimilados hasta aminoácidos, se requieren hacer más pasos donde se requiere la ayuda de la nitrato-reductasa y la nitrito-reductasa a su vez que son necesarios 4 o 6 electrones más para llevar a cabo este proceso; lo que indica que todas las formas de nitrógeno inorgánico deben ser reducidas a amonio antes de ser incorporadas en la célula como aminoácidos en el líquido intracelular.

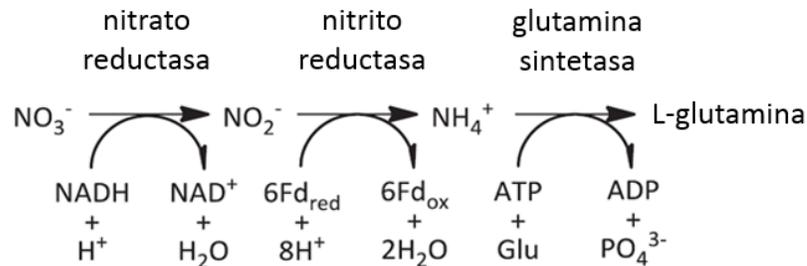


Figura 2 Esquema simplificado de la asimilación de nitrógeno

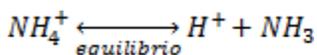
La razón por la cual se dice que el amonio es la forma preferida de nitrógeno inorgánico por las microalgas, es justamente porque no es necesario llevar a cabo ninguna reacción redox para su asimilación, por lo tanto, requiere menos energía. Varios estudios han

demostrado que, en general, las microalgas prefieren el amonio más que el nitrato, y que el consumo de nitrato no se da hasta que todo el amonio se haya consumido (Larsdotter, 2006). Ya que en las aguas residuales predomina el amonio, son ideales para el crecimiento de microalgas. Varias especies de microalgas pueden tomar nitrógeno en exceso para las necesidades metabólicas inmediatas, lo que se conoce como “consumo de lujo”. Éste puede ser usado más adelante en casos de escasez. A pesar de que el nitrato no es la forma preferida de las microalgas, sí es la forma más estable de nitrógeno en las aguas residuales (forma más oxidada) por tal es más abundante y persistente. La tolerancia a las altas concentraciones de amonio depende mucho de las especies de microalgas y fitoplancton en general, Collos y Berges (2002) establecen que hay microalgas que pueden tolerar desde 25 hasta 1000 $\mu\text{mol N-NH}_4^+/\text{L}$.

b) *Asimilación de fósforo*: El fósforo es otro macronutriente esencial para el crecimiento de microalgas y se encuentra en ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y en la ruta de metabolismo de carbohidratos. Las microalgas toman el fósforo como ortofosfato inorgánico soluble (grupos PO_4^{3-} y sus formas protonadas (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- y H_3PO_4)). El fósforo también puede estar presente como fosfatos orgánicos y pueden ser convertidos a ortofosfatos gracias a la enzima fosfatasa que está presente en la pared celular, este proceso ocurre cuando los ortofosfatos inorgánicos escasean (Fogg y Thake, 1987). Al igual que con el nitrógeno, las microalgas son capaces de asimilar fósforo en exceso, que se almacena dentro de las células en forma de gránulos de polifosfato conocidos como “volutin” en caso de escasez (Soto Valencia, 2012). La tasa de crecimiento de las algas no responden inmediatamente a cambios en la concentración de fósforo como lo hacen con cambios de temperatura y luz, aunque algunos estudios han evaluado acumulación de lípidos al interior de las células cuando éstas son limitadas por fósforo (Xin et al., 2010). En general, las aguas residuales suelen contener cantidades de fósforo mayores a las que las algas normalmente necesitan.

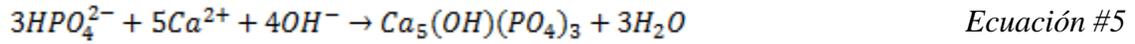
4.3.2. Vía abiótica

a) *Volatilización de nitrógeno*: El nitrógeno no es removido únicamente por metabolismo celular, sino también ocurre algo que se conoce como “*stripping de amonio*” donde buenas cantidades de nitrógeno amoniacal (NH_4^+) pueden ser volatilizadas cuando ocurren cambios significativos de pH en el cual ocurre un desbalance en el equilibrio de nitrógeno amoniacal y amoníaco (NH_3) como se observa en la *Ecuación #4*. García et al. (2000) probaron que la volatilización del amonio es el mecanismo más importante de remoción de nitrógeno en reactores de tipo laguna de alta tasa (HRAP por sus siglas en inglés). También reportó que cuando se cultivan microalgas en zonas de clima tropical con reactores de este tipo, la liberación de amonio es mucho mayor inclusive con pH menores a 9.



Ecuación #4

b) *Precipitación del fósforo*: El fósforo no existe en forma gaseosa, por lo cual, cuando hay condiciones de pH altos y altas concentraciones de oxígeno disuelto, los iones fosfato se sedimentan en presencia de iones carbonato como se observa en la *Ecuación #5*.



La especie *Scenedesmus* es una especie de microalga verde que se encuentra normalmente agrupada por grupos de 2 a 32 células (o cenobios). Esta especie ha sido utilizada por muchos autores desde los últimos 20 años ya que reporta remociones de nitrógeno y fósforo de 30 hasta 100 %. Estas remociones dependen mucho de la relación N/P que se tenga en el agua residual (Xin et al., 2010).

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación se describe brevemente el lugar donde se realizaron los experimentos, los materiales, reactivos, equipos, métodos y procedimientos empleados durante la investigación.

5.1. Área de estudio

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Agua (LIPATA) que se encuentra ubicado en el Campus Juriquilla de la UNAM, al norte de la ciudad de Querétaro. Está ubicado a una altura de 1946 msnm y la temperatura es variable durante las épocas del año, se registran temperaturas que van de los 12 a los 27°C.

5.2. Estrategia experimental

5.2.1. Inóculo de microalgas cultivadas en medio Bold

El inóculo de microalgas utilizado consistió en un consorcio mixto que había sido cultivado en la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la UNAM en medio Bold (medio mineral). El inóculo inicialmente fue colectado en un lago de un campo de golf en la ciudad de Querétaro, México. Los géneros predominantes en el consorcio son *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Desmodesmus* y *Monoraphidium*. De estos géneros, se han identificado morfológicamente las siguientes especies: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* (actualmente conocido como *Acutodesmus obliquus*) y *Desmodesmus maximus* (Cea-Barcia et al., 2014).

5.2.2. Inóculo de bacterias

El inóculo de bacterias utilizado consistió en lodo activado proveniente de la planta de tratamiento de aguas municipales de Santa Rosa Jáuregui, Querétaro.

5.2.3. Inóculo de microalgas-bacterias cultivadas en agua residual municipal

Para llevar a cabo la comparación entre inóculos, se utilizó un inóculo de microalgas y bacterias que fue crecido tratando agua residual municipal durante 8 meses bajo condiciones de laboratorio. Éste inóculo contenía en su mayoría microalgas filamentosas y diatomeas. Estas especies fueron identificadas al microscopio y luego se verificaron tras un análisis de biología molecular. Bajo estas condiciones de operación, el inóculo de microalgas y bacterias tenía una

velocidad de sedimentación comparable con los lodos activados; formaron una estructura compleja con gránulos y aglomerados de bacterias filamentosas y diatomeas.

5.2.4. Sustrato #1: Agua Residual Municipal (ARM)

El agua residual municipal utilizada para todas las pruebas fue tomada de la planta de tratamiento de aguas municipal de Santa Rosa Jáuregui, Querétaro. La muestra de agua se recolectó después de un pre-tratamiento de cribado grueso, sedimentación primaria y cribado fino.

La concentración de los diferentes parámetros analizados es muy variable cuando se trabaja con aguas residuales reales inclusive si se comparan muestreos tomados en la misma semana.

En la Tabla 4 se presenta un promedio de las caracterizaciones del agua residual municipal utilizada a lo largo del período de investigación, sin embargo, para los ensayos comparativos entre sustratos, las caracterizaciones se presentan en los resultados.

Tabla 4 Caracterización del Agua Residual Municipal

Parámetro	Unidades	Agua residual municipal
pH	Unidades de pH	7.5 ± 0.5
Demanda Química de Oxígeno Soluble*	mg DQO/L	397.8 ± 31.7
Nitrógeno Amoniacal*	mg N-NH ₄ ⁺ /L	82.4 ± 3.8
Nitratos*	mg N-NO ₃ ⁻ /L	0
Nitritos*	mg N-NO ₂ ⁻ /L	0
Fosfatos*	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	2.4 ± 0.3
Sólidos Suspendidos Volátiles	mg SSV/L	92.0 ± 5.7

*Filtrados con un filtro de celulosa de 0.45µm.

Se utilizó la DQO soluble como parámetro de medición de materia orgánica ya que es así como lo reportan diferentes autores que han trabajado con sistemas biológicos con microalgas con algunos de los sustratos utilizados: agua residual municipal (Su et al., 2012b, 2011a), purines de cerdo (Cañizares-Villanueva et al., 1994; Godos et al., 2009; Zhu et al., 2013). Para cada uno de ellos también se han establecido por bibliografía, valores de relación DQO/DBO₅. Para el agua residual municipal se han encontrado valores de relación del 0.5 a 0-65. Hammouda (1995) evaluó ambos parámetros y encontró porcentajes de remoción de DQO del 83% y del 84% para la DBO₅. Para el caso de los purines de cerdo se han reportado valores de relación del 54% (Godos et al., 2010) y para digestato anaerobio, como es de suponerse, la relación es más baja, Franchino (2013) reportó una relación de 0.325.

5.2.5. Sustrato #2: Purines de Cerdo 1 (PC1)

Para los primeros experimentos se utilizaron los purines de cerdo (PC1) provistos por la granja *La Dehesa* ubicada en la carretera de San Juan del Río – Tequisquiapan. La granja cuenta con una capacidad para 6000 cabezas. Para utilizar los purines de cerdo, se realizó un tamizado de los mismos para remover los sólidos grandes como paja y arena como se observa en la Figura 3.



Figura 3 Tamizado de purines de cerdo

En la Tabla 5 se presenta un promedio de las caracterizaciones realizadas a los purines de cerdo después de tamizarlos. Los purines fueron diluidos en todos los casos para los diferentes ensayos, las caracterizaciones realizadas después de las diluciones se presenta en la sección de resultados de cada uno de ellos.

Tabla 5 Caracterización físico-química de purines de cerdo concentrados de la granja La Dehesa (PC1)

Parámetro	Unidades	Purines de Cerdo (PC1) tamizados
Demanda Química de Oxígeno	mg O ₂ /L	48,700 ± 728
Demanda Química de Oxígeno Soluble*	mg O ₂ /L	12,525 ± 1,590
Nitrógeno Amoniacal*	mg N-NH ₄ ⁺ /L	1,035 ± 30.2
Fosfatos solubles*	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	172 ± 31
Nitratos*	mg N-NO ₃ ³⁻ /L	20 ± 5.2
Nitritos*	mg N-NO ₂ ²⁻ /L	2.51 ± 0.5
pH	Unidades de pH	7.7 ± 0.6
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	mg SSV/L	578 ± 80

*Filtrados con un filtro de celulosa de 0.45µm de tamaño de poro.

5.2.6. Sustrato #3: Purines de Cerdo 2 (PC2)

Para el último experimento se utilizaron los purines de cerdo (PC2) provistos por una granja ubicada a las afueras del estado de Querétaro. A diferencia de los primeros purines, éstos no tenían gran cantidad de sólidos, ya que a estos desechos sí se les daba pretratamiento o existía separación en la fuente (líquido-sólido).

El promedio de las caracterizaciones realizadas a este sustrato se presenta a continuación en la Tabla 6. Al igual que con los purines de cerdo 1, éstos también fueron diluidos para el ensayo donde se utilizaron, en la sección de resultados se presenta la caracterización después de la dilución.

Tabla 6 Caracterización físico-química de purines de cerdo concentrados (PC2)

Parámetro	Unidades	Purines de Cerdo (PC2)
Demanda Química de Oxígeno	mg O ₂ /L	13,470 ± 103
Demanda Química de Oxígeno_{Soluble}*	mg O ₂ /L	12,565 ± 204
Nitrógeno Amoniacal*	mg N-NH ₄ ⁺ /L	618.8 ± 24.5
Fosfatos solubles*	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	103.7 ± 12.3
Nitratos*	mg N-NO ₃ ⁻ /L	2.5 ± 0.3
Nitritos*	mg N-NO ₂ ⁻ /L	1.3 ± 0.5
pH	Unidades de pH	7.3
Sólidos Suspendidos Totales	mg SST/L	420 ± 80
Sólidos Suspendidos Fijos	mg SSF/L	60 ± 10
Sólidos Suspendidos Volátiles	mg SSV/L	360 ± 75

*Filtrados con un filtro de celulosa de 1µm de tamaño de poro.

5.2.7. Sustrato #4: Digestato Anaerobio (DA)

El digestato fue tomado de la fase líquida proveniente del efluente del digestor termofílico anaerobio de la planta de tratamiento municipal operada por Atlatec para la CEA ubicada en San Pedro Mártir, Querétaro. La caracterización realizada al digestato anaerobio se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7 Caracterización físico-química de digestato

Parámetro	Unidades	Digestato
Demanda Química de Oxígeno	mg O ₂ /L	25,800
Demanda Química de Oxígeno_{Soluble}*	mg O ₂ /L	5,660 ± 84.9
Nitrógeno Amoniacal*	mg N-NH ₄ ⁺ /L	790 ± 14
Fosfatos solubles*	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	266.5 ± 23.3
Nitratos*	mg N-NO ₃ ⁻ /L	25.2 ± 4.2
Nitritos*	mg N-NO ₂ ⁻ /L	2.9 ± 0.5
pH	Unidades de pH	8.1 ± 0.6
Sólidos Suspendidos Volátiles	mg SSV/L	1930 ± 168

*Filtrados con un filtro de celulosa de 0.45µm de tamaño de poro.

A diferencia del los otros sustratos, el digestato contenía una concentración inicial de nitrato mayor ya que en los procesos anaerobios de digestión justamente se busca la transformación del nitrógeno amoniacal a nitrógeno atmosférico (pasando por las formas de nitrito y nitrato).

5.3. Fases de experimentación

Las fases de experimentación se dividirán de acuerdo a los objetivos específicos planteados en el trabajo.

5.3.1. Ensayos preliminares de crecimiento y pruebas de estabilidad del sistema microalga-bacteria en agua residual municipal

Con el fin de evaluar el sistema microalga-bacteria se hicieron dos ensayos que se describen a continuación:

- a) Para probar las eficiencias de remoción de nutrientes y materia orgánica de los sistemas microalga-bacteria, se operaron cuatro reactores con un volumen total de 2 L y un útil de 1.6 L con agua residual municipal (sin diluir) como sustrato (e inóculo de bacterias). Dos de estos reactores se inocularon con 160 mL de una solución que contenía 625 mg SSV/L del consorcio de microalgas crecidas en medio Bold y las dos restantes se dejaron únicamente con agua residual (blancos). La agitación del sistema se llevó a cabo por medio de un agitador magnético (marca *Variomag telesystem*) a 150 – 200 rpm. La iluminación del sistema se llevó a cabo por medio de lámparas tipo LED spotlight de 20 Watts de luz blanca para la iluminación artificial de los bioreactores dentro del laboratorio logrando una intensidad lumínica promedio medida en las paredes externas de cada botella de 135 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Se trabajó con un fotoperiodo de 12 horas y el ciclo tuvo una duración de 7 días, no se realizaron réplicas. Una imagen del montaje experimental se presenta a continuación en la Figura 4.



Figura 4 Montaje experimental prueba de remoción de nutrientes y materia orgánica en agua residual municipal. Volumen de reactores: 1.6 L. Agitación magnética (150 – 200 rpm).

Para analizar la remoción de nutrientes, materia orgánica y el crecimiento de la biomasa, se analizaron los siguientes parámetros: SSV, DQOs, N-NH_4^+ , P-PO_4^{3-} al inicio y al final de la prueba.

Se realizaron observaciones periódicas al microscopio para percibir un aumento o disminución en la concentración de células dentro de las botellas e identificar algún cambio en la morfología de las microalgas al ser sometidas a un medio compuesto por agua residual.

Para el cálculo de los porcentajes de remoción de nutrientes y materia orgánica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración}_{\text{inicial}} - \text{Concentración}_{\text{final}}}{\text{Concentración}_{\text{inicial}}} * 100$$

Para el cálculo de productividad de biomasa, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Conc. de biomasa}_{\text{inicial}} - \text{Conc. de biomasa}_{\text{final}}) \left[\frac{\text{mg SSV}}{\text{L}} \right] * \text{Volumen del reactor [L]}}{\text{tiempo de reacción [d]}}$$

- b) Para conocer la estabilidad del sistema microalga-bacteria, tres reactores de 500 mL (450 mL volumen útil) fueron alimentados con 253 mL de agua residual municipal sin dilución y con 108 mL de solución de microalgas cultivadas en medio Bold (185 mg SSV/L) y 89 mL de lodo activado como inóculo de bacterias (225 mg SSV/L) para tener una relación 1:1 (p/p). El sistema fue agitado de manera orbital a 160 rpm con un fotoperiodo de 12 horas y con una intensidad lumínica promedio de 135 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Una imagen del montaje experimental de esta prueba se presenta a continuación en la Figura 5.



Figura 5 Montaje experimental de la fase de estabilización. Volumen de reactores: 450 mL. Agitación orbital: 160 rpm.

Inicialmente se hizo un seguimiento diario a las variables físicas OD y pH exclusivamente para determinar el tiempo en el cual los sistemas alcanzaban un valor máximo indicando un crecimiento de la biomasa microalgal. Esta operación se repitió durante tres ciclos de 5 días cada uno. Para re-alimentar el sistema se detenía la agitación por un período de tiempo aproximado de dos horas, se eliminaba el 60 % del reactor (sobrenadante) y se adicionaba la misma cantidad de agua residual doméstica (**Etapa 1**).

Se realizaron observaciones periódicas al microscopio con el objetivo de identificar cambios morfológicos en las células microalgales y la posible integración de las células microalgales a los flóculos presentes en los lodos activados.

Luego de los primeros tres ciclos, se operó un último ciclo realizando mediciones de: SSV, DQO, N-NH₄⁺, P-PO₄³⁻ al inicio y final del mismo para determinar los porcentajes de remoción, velocidades de remoción y productividad de biomasa (**Etapa 2**).

5.3.2. Evaluación del crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica de un consorcio de microalgas sometido a diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio.

Para llevar a cabo esta fase, seis reactores de 500 mL de capacidad (450 mL volumen útil) fueron inoculados con 1 mL de la solución de microalgas cultivadas en medio Bold (1,200 mg SSV/L). La agitación del sistema se llevó a cabo por medio de una agitación orbital a 200 rpm con un fotoperiodo de 12 horas y una intensidad lumínica promedio medida en las paredes externas de cada botella de 135 μmol/m²/s.

En este experimento, cada reactor fue alimentado con diferentes diluciones de purines de cerdo 1 (PC1) y digestato anaerobio. Después de realizar las caracterizaciones correspondientes tanto de los purines de cerdo como el Digestato Anaerobio (DA), se realizaron las diluciones necesarias para lograr las concentraciones presentadas a continuación en la Tabla 8 (las concentraciones reales alimentadas a los reactores (caracterizaciones) se presentan en los resultados).

Tabla 8 Identificación de reactores bajo diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio

Reactor número	DA 0.5	DA 1	DA 2	PC 0.5	PC 1	PC 2
Sustrato utilizado	Digestato: 500 mgDQO/L	Digestato: 1000 mgDQO/L	Digestato: 2000 mgDQO/L	Purines: 500 mgDQO/L	Purines: 1000 mgDQO/L	Purines: 2000 mgDQO/L

Para conocer el efecto limitante de cada uno de estos sustratos, se realizaron mediciones de: SSV, DQO, N-NH₄⁺, P-PO₄³⁻ al inicio y al final de la prueba. Este ensayo tuvo una duración de siete días y no se realizaron réplicas. El montaje experimental inicial de esta fase se presenta a continuación en la Figura 6.



Figura 6 Montaje experimental de diferentes concentraciones de purines y digestato. Volumen de reactores: 450 mL. Agitación orbital: 200 rpm.

5.3.3. Evaluación del efecto de la inoculación con microalgas sobre la remoción de nutrientes y materia orgánica de tres diferentes tipos de agua residual

Este experimento se realizó con base a los resultados obtenidos en los experimentos exploratorios (4.3.1) donde el “blanco” (agua residual municipal **sin** inóculo de microalgas) de ese experimento obtuvo resultados comparables y en algunos parámetros, mejores a los obtenidos con los sistemas inoculados con microalgas. En este caso, el experimento se realizó con lodo activado como inóculo para observar cómo se comportaría el sistema cuando comenzaran a colonizar las microalgas.

Para llevar a cabo esta etapa, se operaron seis reactores de 1 L de capacidad con un volumen útil de 0.9 L. Este experimento se llevó a cabo en tres sistemas en paralelo usando: agua residual municipal, purines de cerdo 1 (PC1) diluidos y digestato anaerobio diluido (las caracterizaciones promedio realizadas al inicio de cada ciclo se presentan en los resultados). Cada tratamiento consistió en una serie de dos foto-bio-reactores, uno de los reactores fue inoculado con lodo activado y microalgas y el otro fue inoculado únicamente con lodo activado.

La agitación del sistema se llevó a cabo por medio de agitación magnética (150 – 200 rpm), con un fotoperiodo de 12 horas y una intensidad lumínica de $135 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. El montaje experimental inicial se presenta en la Figura 7.

Para la determinación del tiempo de reacción de cada ciclo, se realizaron mediciones de DQOs, N-NH_4^+ , P-PO_4^{3-} y SSV cada dos días desde el día inicial de inoculación durante ocho días para establecer el tiempo en el cual se lograban remociones iguales o mayores al 80 % de DQO (tiempo de duración de cada ciclo).

Luego de determinar el tiempo de reacción de cada ciclo, se realizaron mediciones de DQOs, N-NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , P-PO_4^{3-} y SSV al inicio y al final de cada lote. Con la medición de SSV del

final del lote, se determinaba la cantidad de volumen a purgar del sistema para asegurar que cada reactor reiniciara con 300 mg SSV/L.

Se realizaron también observaciones al microscopio al inicio y al final de cada ciclo para observar la evolución microbiológica del sistema. Para el reactor inoculado con microalgas utilizando agua residual municipal como sustrato se realizaron observaciones con tinción de rojo Nilo para observar diferencias en cuanto a la acumulación de lípidos dentro de las células de las microalgas.

El diseño experimental se planeó para hacer análisis de ANOVA de dos criterios para determinar el efecto de la inoculación inicial y el tipo de agua así como la interacción entre ellos (tomando en cuenta la biomasa producida).



Figura 7 Montaje experimental diferentes sustratos: pertinencia de la inoculación con microalgas.
Volumen de reactores: 0.9 L. Agitación magnética: 150 – 200 rpm.

5.3.4. Remoción de nutrientes y materia de sistemas por lodos activados operados por lotes.

Para llevar a cabo esta etapa, se operaron tres reactores de 1 L de capacidad con un volumen útil de 0.9 L. Cada uno de ellos fue alimentado con tres sustratos líquidos diferentes: agua residual municipal sin dilución, digestato anaerobio diluido y purines de cerdo 1 (PC1) diluidos. Las caracterizaciones promedio realizadas al inicio de cada ciclo se presentan en los resultados. Todos los reactores fueron inoculados con lodo activado para lograr una concentración inicial de 300 mg SSV/L. Se le suministró aire a cada uno de ellos por medio de mangueras y piedras difusoras y no se les permitió la entrada de luz cubriendo la superficie de los reactores con papel aluminio como se observa en la Figura 8. La agitación se llevó a cabo por medio de la aireación y por medio de agitadores magnéticos a 160 rpm.

Para analizar la remoción de nutrientes, materia orgánica y el crecimiento de la biomasa, se analizaron los siguientes parámetros: SSV, DQO, $N-NH_4^+$, NO_2^- , NO_3^- y $P-PO_4^{3-}$ al inicio y al final de cada ciclo.

Se realizaron también observaciones al microscopio al inicio y al final de cada ciclo para observar la evolución microbiológica del sistema: cambios en las especies presentes, estructuras y tamaños de flóculos, entre otros.

El tiempo de retención para estos reactores fue de 24 horas. Luego de analizar los SSV durante tres ciclos sin purgar, se determinó la cantidad de lodo de purga y este era descartado antes de cada alimentación. Los reactores se dejaban sedimentar por un tiempo de una hora, el sobrenadante se eliminaba del sistema y se re-alimentaba con la misma carga que se había alimentado el día anterior. Los tres reactores se analizaron durante seis ciclos.

Estos tres reactores fueron comparados con los tres reactores del experimento anterior que fueron inoculados paralelamente con el mismo lote de lodo activado e iluminados, con la diferencia del tiempo de reacción (4 días para los sistemas iluminados y 1 día para los sistemas sin luz y aireación).

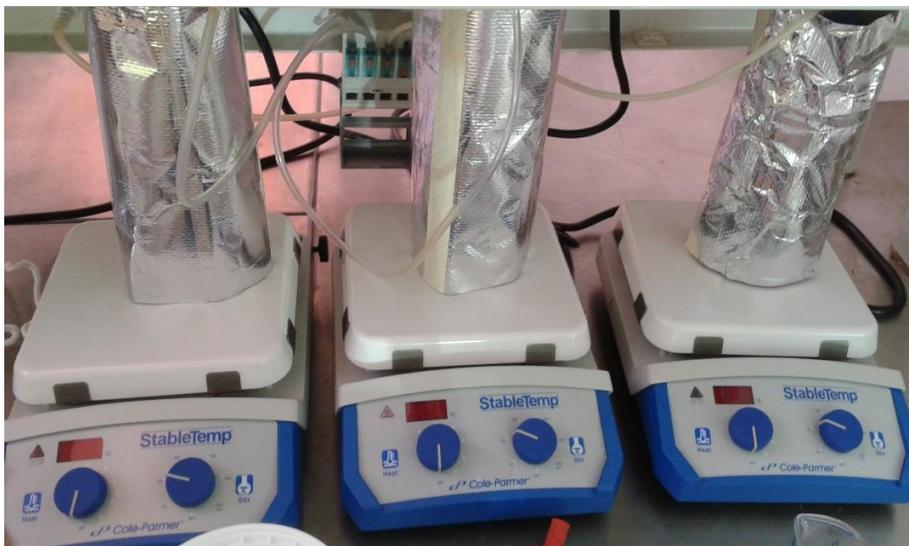


Figura 8 Montaje reactores SBR sin iluminación aireados mecánicamente. Volumen de reactores: 0.9 L.
Agitación magnética: 160 – 200 rpm.

5.3.5. Evaluación del desempeño en cuanto a remoción de contaminantes, producción de biomasa y concentración de lípidos de un sistema inoculado únicamente con lodo activado y otro con un inóculo microalga-bacteria y utilizando purines de cerdo diluidos como sustrato

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en experimentos pasados donde en los reactores inoculados con lodo activado únicamente (e iluminados) se obtenían cantidades considerables de biomasa microalgal, los dos inóculos a probar en este ensayo fueron: (1) un inóculo maduro de microalgas-bacterias descrito anteriormente y (2) lodo activado. Para comparar los inóculos, se utilizaron dos sistemas (en duplicado) con purines de cerdo 2 (PC2) diluidos hasta lograr una

concentración de 900 ± 142 mg DQOs/L como sustrato. Los sistemas consistieron en foto-bio-reactores de 0.95 L de volumen útil. A uno de los sistemas se le adicionaron 270 mg SSV de inóculo maduro de microalgas-bacterias descrito anteriormente y el otro con la misma cantidad de lodo activado. La cantidad de inóculo utilizado fue calculado para comenzar cada sistema con 300 mg SSV/L aproximadamente. La temperatura dentro de los reactores se mantuvo alrededor de $25 \pm 4^\circ\text{C}$. Para mantener una agitación constante al interior de los reactores, se utilizó un agitador magnético (150-200 rpm). Cuatro lámparas led de 20 W fueron utilizadas para irradiar los reactores con $135 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (medidos en la superficie de las botellas) por foto-períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad como se observa en la Figura 9.

Los experimentos se realizaron en lotes con un tiempo de reacción de cuatro días. El primer ciclo duró 8 días para permitir al sistema aclimatarse al nuevo sustrato. Cinco ciclos fueron realizados. Al principio y al final de cada ciclo se tomó muestra para analizar los siguientes parámetros: DQO, SSV, N-NH_4^+ , P-PO_4^{3-} , NTK, NO_3^- , NO_2^- , lípidos, carbohidratos y proteínas. Antes de comenzar un nuevo ciclo, 300 mg SSV/L se garantizaban al interior de cada reactor eliminando la cantidad de biomasa adecuada (purga).



Figura 9 Montaje de reactores con inóculo maduro de microalgas y bacterias y lodo activado. Volumen de reactores: 0.9 L. Agitación magnética: 150 – 200 rpm.

5.4. Métodos analíticos

5.4.1. Medición de pH

Los valores de pH se obtuvieron mediante la determinación de la actividad de los iones de hidrógeno usando un electrodo compuesto marca OAKTON pH 510 series (fabricado en Singapur). La medición de pH se realizó al iniciar y terminar cada lote.

5.4.2. Medición de oxígeno disuelto (OD)

La medición de OD se hizo por el método de electrodo de membrana (empleando el medidor marca YSI modelo 50B fabricado en Ohio, USA), por el que las moléculas de oxígeno atraviesan una membrana permeable. La medición de oxígeno se hizo a la misma hora del día, ya que los valores son bastante diferentes en ausencia o en presencia de luz, para el caso de los reactores con microalgas e iluminados. El oxígeno puede bajar casi a cero durante el período de oscuridad y subir hasta valores de 20 mg/L en períodos de luz. La medición siempre se realizó entre las 12 y las 2 de la tarde cuando las microalgas se encuentran realizando la fotosíntesis.

5.4.3. Medición de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)

La determinación de Sólidos se realizó en base a los Métodos Normalizados Standard Methods (APHA et al., 2012).

Se utilizaron filtros *Whatman* de 55 mm de diámetro y 1 μm de tamaño de poro para filtrar la muestra con ayuda de vacío por un Enlarmeyer kitasato. Luego se sometieron a 105 °C por 1-2 horas para el secado de las muestras y determinación de los Sólidos Suspendidos Totales (SST), y 550 °C por 20 minutos para la calcinación de la muestra y la determinación de los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV).

5.4.4. Medición de la Demanda Química de Oxígeno

La medición de la DQO se hizo siguiendo el método 8000 de HACH basado en colorimetría. Se utilizaron los tubos de HACH (fabricados en Alemania) con dicromato de potasio y ácido sulfúrico para un rango de 20 a 1500 mgO₂/L. A cada vial (tubo de ensayo) se le agregan 2mL de muestra y se sometieron a digestión por 120 minutos a una temperatura de 150°C. Finalmente se dejó que la muestra regresara a temperatura ambiente y se leyó en un espectrofotómetro a 620nm. Para el blanco se repite el procedimiento pero la muestra es agua destilada. Para la medición de la DQO soluble (DQOs), la muestra era centrifugada y filtrada por un filtro de fibra de vidrio de 0.1 μm o de 0.45 μm de tamaño de poro, dependiendo del caso.

5.4.5. Medición de la concentración de Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK)

El procedimiento para la determinación del NTK se realizó con los equipos especializados de VELP Scientifica® siguiendo el método Macro-Kjeldahl 4500-Norg B del Standard Methods (APHA et al., 2012). El desarrollo y estandarización de la técnica se encuentra en el Anexo 1.

5.4.6. Medición de la concentración de Nitrógeno amoniacal (NH_4^+)

Antes de la medición, la muestra era centrifugada y filtrada por un filtro de fibra de vidrio de $0.1\mu\text{m}$ de diámetro. La medición se hizo siguiendo el método 10031 de HACH basado en colorimetría (*Salicylate Method*). Para su determinación, se utilizaron tubos HACH para un rango de 0 a $50\text{mgNH}_3/\text{L}$. Se seleccionaban dos de estos tubos, para el blanco y la muestra. A cada vial se le agregaban 0,1 de muestra y agua destilada (al blanco). Posteriormente, a cada vial se le añadía el contenido de una almohadilla de reactivo de salicilato y luego una de cianurato. Luego se mezclaban homogéneamente los tubos, se esperaba 20 minutos y se leía al espectrofotómetro.

5.4.7. Medición de la concentración de Fosfatos (PO_4^{3-})

Antes de la medición, la muestra era centrifugada y filtrada por un filtro de fibra de vidrio de $0.1\mu\text{m}$ de diámetro. La medición se realizó siguiendo el método 10127 de HACH basado en colorimetría (*Molybdovanadate with acid persulfate digestion method*). Para su determinación, se utilizaron tubos HACH para un rango de 0 a $80\text{mgPO}_4^{3-}/\text{L}$. Se seleccionaron dos de estos tubos, para el blanco y la muestra. A cada vial se le agregaron 5mL de muestra y agua destilada (al blanco). Posteriormente, a cada vial se le añadía el contenido de una almohadilla de reactivo de persulfato, se mezclaban y se sometían a digestión a 150°C durante 30 minutos. Luego se esperaba a que los tubos alcancen la temperatura ambiente y finalmente se adicionaban 2.0mL de hidróxido de sodio 2,0molar y 0.5mL de solución de molibdovanadato. Después de 7 minutos de reacción, se leía al espectrofotómetro.

5.4.8. Medición de la concentración de Nitratos (NO_3^-)

Para los primeros ensayos se siguió el siguiente método de HACH: Antes de la medición, la muestra era centrifugada y filtrada por un filtro de fibra de vidrio de $0.1\mu\text{m}$ de diámetro. La medición se realizó siguiendo el método 10206 de HACH basado en colorimetría (*Dimethylphenol method*). Para su determinación, se utilizaron almohadillas *Nitraver 5* de HACH para un rango de 0.3 a $30\text{mgNO}_3^-/\text{L}$. Inicialmente se tomaron dos viales de 25mL de HACH y se añaden 25 mL de muestra filtrada a cada vial. Posteriormente, se le añadía el contenido de una almohadilla de reactivo de a uno de ellos, se agitaban vigorosamente por un minuto, se esperaba por 5 minutos y se leía al espectrofotómetro utilizando el vial con muestra únicamente como blanco.

Ya que el método de HACH producía cierto ruido en la lectura, sobre todo para los influentes (aguas residuales antes del tratamiento) se utilizó para el último ensayo se utilizó el cromatógrafo de iones descrito anteriormente y se corrigieron los datos anteriores.

5.4.9. Medición de la concentración de Nitritos (NO_2^-)

Antes de la medición, la muestra era centrifugada y filtrada por un filtro de fibra de vidrio de $0.1\mu\text{m}$ de diámetro. La medición se realizó siguiendo el método 10237 de HACH basado en colorimetría (*Diazotization method*). Para su determinación, se utilizaron almohadillas *Nitriver 2* de HACH para un rango de 0 a $100\text{mgNO}_2^-/\text{L}$. Inicialmente se tomaban dos viales de 10mL de HACH y se añadían 10 mL de muestra filtrada a cada vial. Posteriormente, se le añadía el contenido de una almohadilla de reactivo de a uno de ellos, se agitaba vigorosamente hasta que se disolviera el contenido, se esperaba 10 minutos y se leía al espectrofotómetro utilizando el vial con muestra únicamente como blanco.

Ya que el método de HACH producía cierto ruido en la lectura, sobre todo para los influentes (aguas residuales antes del tratamiento) se utilizó para el último ensayo se utilizó el cromatógrafo de iones descrito anteriormente y se corrigieron los datos anteriores.

5.4.10. Observaciones al microscopio

Las observaciones al microscopio se realizaron con el microscopio *Nikon H550L* (hecho en Japón) para la observación al microscopio en campo claro y para observación con fluorescencia para el rojo Nilo. La cámara utilizada para la toma de imágenes microscópicas fue la *Nikon DS-Ri1* y el software utilizado para el análisis de imágenes fue el *NIS Elements F*.

- **Determinación cualitativa de lípidos por tinción con rojo Nilo:** Para la tinción con rojo Nilo de lípidos en microalgas verdes (como el caso de las *Scenedesmus* y *Chlorella*) es necesario llevar a cabo un pre-tratamiento de la muestra para lograr que el colorante penetre la pared celular de éstas que es bastante rígida. Dos pretratamientos fueron probados efectivos para efectos de penetración del colorante, uno de ellos es la sonicación y el segundo una resuspensión de la muestra en una solución de 0.1g/mL de glicerol. El procedimiento para la realización de esta técnica y su estandarización con la biomasa utilizada en este trabajo se presenta en el Anexo 2. La señal del rojo Nilo es capturada en un microscopio de fluorescencia mediante excitación con láser entre 488-547 nm, y emisión entre 560-600 nm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentarán de acuerdo a las estrategias experimentales que se llevaron a cabo.

6.1. Ensayos preliminares de crecimiento y pruebas de estabilidad del sistema microalga-bacteria en agua residual municipal.

6.1.1. Crecimiento de microalgas en agua residual municipal

Para efectos de practicidad al presentar los datos, cada reactor es identificado como se indica en la Tabla 9.

Tabla 9 Identificación de reactores para ensayo de Agua Residual Municipal con microalgas (ARM+M) y sin microalgas (ARM).

ID Reactores	ARM + M	ARM
Volúmen útil (L)	1.6	1.6
Cantidad de inóculo utilizado (mg)	100	SIN INÓCULO

6.1.2. Biomasa y observaciones al microscopio

Si bien los reactores sin inóculo de microalgas fueron analizados con la intención de tener un blanco de referencia para aislar el efecto de las microalgas y las bacterias (presentes en el agua residual), desde el día tres se comenzó a notar cómo los reactores que no se inocularon con microalgas (ARM) fueron tomando un color verde cada vez más intenso y diferentes especies de microalgas fueron observadas al microscopio. En la Figura 10 se observa claramente cómo en los reactores que no fueron inoculados (ARM), no se observan microalgas de ninguna categoría en el día 0 y cómo después de 7 días de experimentos, aparecen en todo el campo microalgas circulares mucho más pequeñas que las *Scenedesmus* y *Chlorella* (ARM – Día 7) que no pudieron ser identificadas por técnicas de reconocimiento morfológico (Prescott, 1984). De esta figura también es importante notar el cambio morfológico que sufren las microalgas (ARM-M) desde el día 0 hasta el día 7.

Los reactores que no fueron inoculados alcanzaron un color verde tan intenso como los que habían sido inoculados con microalgas, lo que da a entender que las pocas microalgas que se encontraban en el agua residual, ya estaban de cierta manera aclimatadas a ese medio y cuando se les dieron las condiciones ideales para su reproducción, lo hicieron de una manera más eficiente que aquellas que estaban siendo cultivadas en medio mineral (medio Bold) que al ser sometidas a un medio real como es el agua residual, se tardaron un poco más en adaptarse.

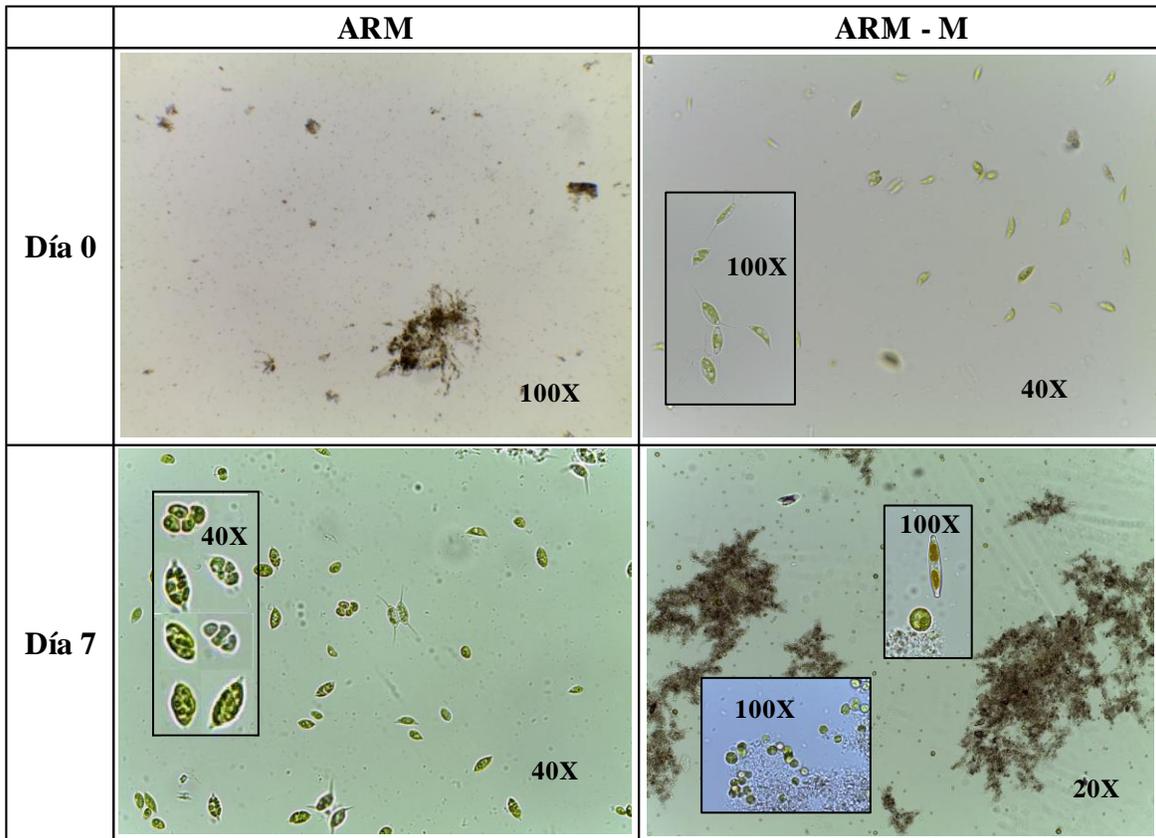


Figura 10 Observaciones al microscopio de los sistemas con (ARM + M) y sin (ARM) inóculo inicial de microalgas. Fotografías tomadas en campo claro, ver aumentos en cada foto.

Lürling (2003) concuerda con algunos otros autores que han trabajado los géneros *Scenedesmus* y *Desmodesmus* y hace referencia a la gran “plasticidad fenotípica” que presentan estas dos especies en cuanto a condiciones ambientales. Algunos de estos cambios son: presentarse de manera unicelular (con un cenobio) o con 2, 4, 8 y hasta 16 cenobios. También pueden cambiar su morfología como tal, dando un aspecto a deformación, engorde, o transformación. Tanto el cambio en la estructura como en número de cenobios presentes fueron observados a lo largo de los experimentos. Lürling, 2003 (Figura 11) muestra una morfología similar a la que se observa en las fotos al microscopio **finales** de la mayoría de experimentos realizados en este trabajo. Esta imagen pertenece justamente a la especie que se ha logrado identificar en los inóculos: *Scenedesmus obliquus*.

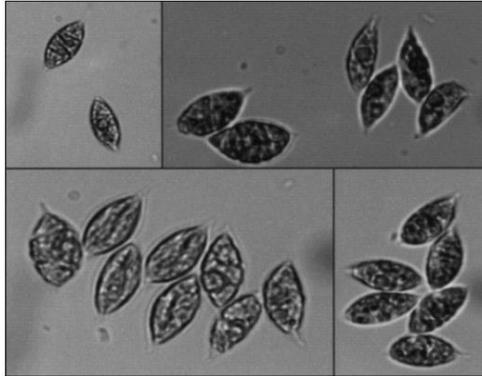


Figura 11 Diferentes morfologías de *Scenedesmus obliquus* (presentándose como unicelulares, y de 2,4,6 y 8 cenobios) como un ejemplo de plasticidad fenotípica (Lürling, 2003).

Con respecto a la productividad de biomasa, se obtuvieron 71 ± 21 mg SSV/L/d y 43 ± 2 mg SSV/L/d para los reactores ARM y ARM + M respectivamente. Si bien para estos ensayos exploratorios no se realizaron mediciones de clorofila que pudieran ayudar a saber qué porcentaje de la biomasa generada está representada por microalgas y qué porcentaje por otros microorganismos, sí se pueden tener algunas conclusiones preliminares al respecto. Basados en las observaciones al microscopio y el color que alcanzaron los bioreactores, se indica que las microalgas inoculadas inicialmente en los reactores tardaron un poco en adaptarse al nuevo sustrato y por tal la productividad alcanzada fue un poco menor a la productividad alcanzada por los reactores que no fueron inoculados con microalgas ya que las pocas microalgas presentes en el agua residual (adaptadas al medio), encontraron las condiciones ideales y comenzaron a multiplicarse rápidamente.

6.1.3. Remoción de fósforo y materia orgánica

Cuando se analizaron todos los reactores al final de la prueba (al cabo de siete días) se observó que la remoción de materia orgánica medida como DQO fue mayor (casi 80 %) para los reactores sin inóculo de microalgas, lo que indica que pudo haber ocurrido inicialmente una digestión anaerobia de la materia orgánica presente y una vez las microalgas presentes en el sustrato comenzaron a reproducirse y a realizar actividades fotosintéticas, fueron capaces de generar el oxígeno suficiente para que las bacterias heterótrofas degradaran la materia orgánica (Figura 12).

Otra de las razones que se encuentran para explicar este fenómeno es que los reactores inoculados utilizaron 160 mL de inóculo de microalgas suspendidas en medio Bold (sin materia orgánica) logrando que éstos trabajaran con una DQO más diluida que a los reactores que tenían el medio con 100 % de ARM. Esto se traduce en que no sólo se tiene más materia orgánica sino también más microorganismos heterótrofos consumiendo DQO (los presentes en el agua residual).

En cuanto a la remoción de fósforo, los reactores que fueron inoculados con microalgas (ARM+M) lograron una remoción de fósforo mucho mayor (casi 100 %) (Figura 12) que los que no se inocularon con microalgas. Como se explicó anteriormente, las remociones de fósforo con

sistemas mircoalgas-bacterias pueden ocurrir por dos factores: biótico y abiótico, éste último está ligado a los valores de pH alcanzados en el sistema (> 9) y para éste experimento los valores de pH en los reactores que fueron inoculados con microalgas subió hasta 9.5 y 10 unidades para las réplicas y de 8.5 para los reactores que no fueron inoculados con microalgas. Por ésta razón, los reactores ARM-M alcanzaron una remoción de fósforo mayor ya que, por alcanzar valores de pH alcalinos, ambos mecanismos (biótico y abiótico) se llevaron a cabo al interior de éstos siendo mayoritario evidentemente el proceso abiótico.

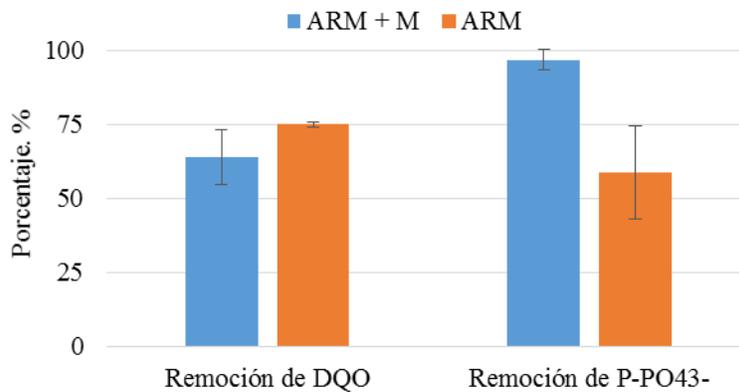


Figura 12 Porcentajes de remoción de DQO y PO_4^{3-} con (ARM+M) y sin (ARM) inóculo de microalgas.

6.1.4. Remoción de nitrógeno.

En procesos aerobios, el amonio puede ser removido de las aguas residuales de tres maneras: a) asimilación: utilización del nitrógeno para procesos celulares (transformación de NH_4^+ a $N_{orgánico}$), b) nitrificación: llevado a cabo por bacterias autótrofas nitrificantes que transforman en amonio en nitritos y nitratos y c) abiótica: Cuando el pH es superior a 8.5 unidades, el amonio es convertido a amoníaco (gas) y se libera a la atmósfera. Los reactores ARM+M alcanzaron una remoción del 5 % mayor que los que no se inocularon con microalgas (ARM). Se cree que esto está nuevamente relacionado con el valor de pH alcanzado por los reactores ARM+M (> 9.5) donde se pudo haber presentado una volatilización del amonio un poco mayor a aquella presentada en los reactores ARM.

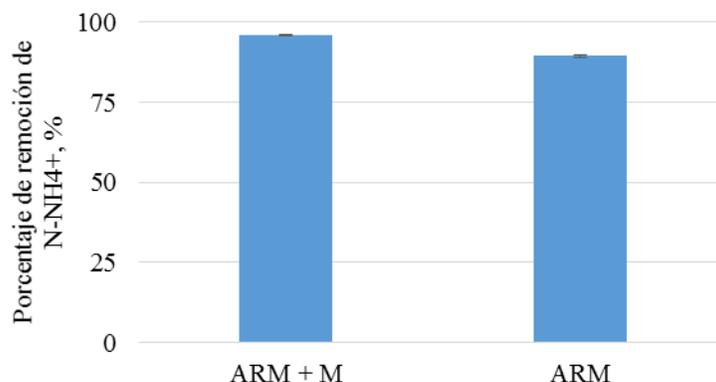


Figura 13 Porcentajes de remoción de N-NH₄⁺ con (ARM+M) y sin (ARM) inóculo de microalgas

La observación más importante de éste ensayo preliminar fue cómo los reactores que habían sido pensados inicialmente como blancos, desarrollaron microalgas al cabo de 7 días y obtuvieron porcentajes de remoción de materia orgánica y nutrientes comparables y en algunos casos mayores a aquellos obtenidos por los reactores que se inocularon con microalgas. Con base a esta observación es que se realizan algunos de los siguientes experimentos.

De éste experimento también se concluyó que es importante que se utilicen inóculos concentrados para atenuar el efecto de la adición de volúmenes considerables de las soluciones en las que están suspendidos los inóculos: evitar diluciones y diferencias en las concentraciones iniciales de ciertos compuestos, como nitrato para el caso del medio Bold.

La Tabla 10 presenta diferentes estudios realizados con microalgas utilizando aguas residuales y se puede observar que la mayoría de los estudios no sólo manejan aguas residuales muy diluidas, sino también utilizan cepas puras de microalgas, lo cual es un gasto adicional si se compara con los reactores que no se inocularon y que sólo en 7 días ya se habían tornado completamente verdes y se observaron especies de microalgas al interior de los mismos por medio del microscopio.

Tabla 10 Comparación bibliográfica para aguas residuales

AUTOR	Tiempo de reacción (días)	Especies de microalgas utilizadas	Sustrato utilizado	Concentración máxima de DQO (mgDQO/L)	Producción de biomasa (g/L/d)		Valores de nitrógeno amoniacal (mg/L)		Valores de Fosfatos (mg/L)		Valores de DQO (mg/L)	
					Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
(Hammouda et al., 1995)	7	<i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i>	Agua residual doméstica	180	-	-	25	10	5	6	180	100
(Hongyang et al., 2011)	5	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agua residual industrial: Producción de soya	3000*	0.38		60	20	11.7	3.4	3000	500
(Martínez et al., 1999)	7	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Agua residual tratada (efluente sedimentador secundario)	-	-	-	27.4	2	11.8	5.9	-	-
(Aslan and Kapdan, 2006)	10	<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua residual sintética	-	4*	26*	410	300	199	170	-	-
(Su et al., 2011a)	8	<i>Microalgas filamentosas verde-azules</i>	Agua residual doméstica	130	0.05		14.6	0	4.9	1.5	130	0

**Medido como mg de clorofila

6.1.5. Evaluación de la estabilidad del sistema microalga-bacteria.

Etapa 1: Estabilidad bajo medición diaria de condiciones físicas: pH y OD.

Para los ensayos de estabilidad, se utilizó el mismo tipo de agua que en ensayo anterior (5.1.1. a) La Figura 14 y la Figura 15 indican que el comportamiento de los tres ciclos respecto a estas variables fue similar. Se observa cómo el OD comienza en valores cercanos a cero mg/L debido al alto consumo de O₂ por parte de las bacterias y siempre va a en aumento gracias al crecimiento exitoso de las microalgas.

La Figura 15 indica claramente un incremento en los valores de pH, debido a una alteración del sistema de equilibrio del CO₂, HCO₃⁻, CO₃⁻².

Se puede concluir entonces para el primer objetivo de esta etapa experimental que el sistema microalga-bacteria bajo una relación de inóculo 1:1(p/p), microalgas:lodo puede ser utilizada como inóculo, en los procesos de remoción de carga orgánica y nutrientes.

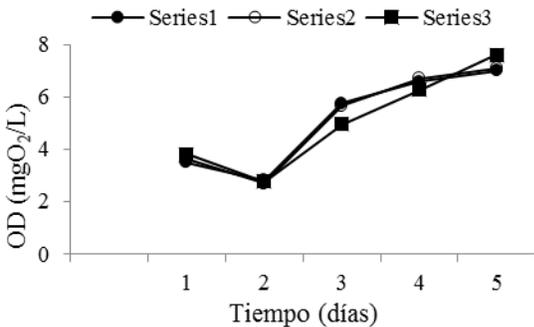


Figura 14 Dinámica de OD de cada lote.

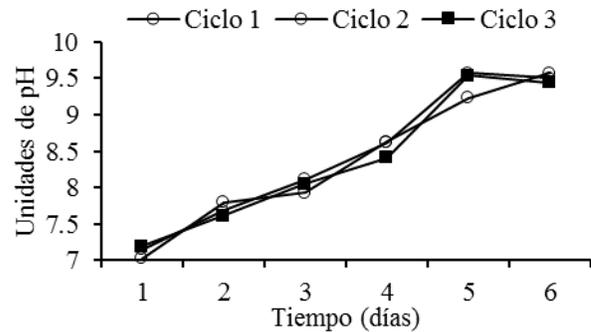


Figura 15 Dinámica de pH de cada lote

Otra variable que ayuda a reforzar la hipótesis de la estabilidad del sistema es la formación de flóculos con microalgas incorporadas que puede ser muy útil a la hora de la cosecha de la biomasa como se observa en la Figura 16.

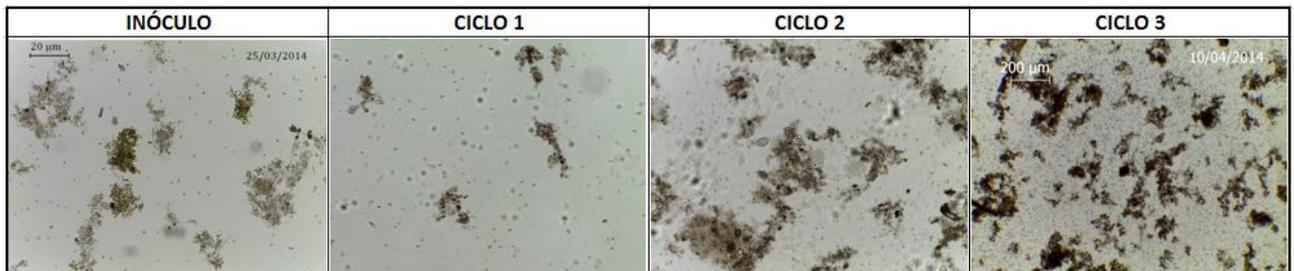


Figura 16 Seguimiento al microscopio (fotos tomadas en campo claro, 20X).

Etapa 2: Análisis de remociones iniciales y finales del tercer lote.

Para el análisis de esta segunda etapa se muestra cómo el sistema después de estar estable, remueve de una manera eficiente los nutrientes (nitrógeno y fósforo). La remoción de materia orgánica no fue tan eficiente (44.5 %) debido a que no se tuvo la precaución de purgar el sistema y para el cuarto ciclo (cuando se midieron las remociones) había demasiada biomasa al interior de los reactores (990 ± 30 mg SSV/L) y la cantidad de luz que lograba entrar al sistema era menor. A demás, al no purgar el sistema, se tenía un lodo viejo (inactivo) dentro de los reactores (Tabla 11).

Tabla 11 Promedio de remociones de los reactores en duplicado.

REACTOR	REMOCIÓN DE PO_4^{3-} (%)	REMOCIÓN DE NH_4^+ (%)	REMOCIÓN DE DQO (%)
1 y 2	92 ± 0.6	67.9 ± 7	44.46 2.8

6.2. Evaluación de la limitación del crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica de un consorcio de microalgas sometido a diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio.

La caracterización real de los sustratos para alcanzar las concentraciones descritas en la metodología se presenta a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12 Caracterización real de los sustratos con diferentes concentraciones de purines de cerdo y digestato anaerobio

		Digestato 0.5	Digestato 1	Digestato 2	Purines 0.5	Purines 1	Purines 2
DQO soluble	mg DQOs/L	740	1096	2040	714	1336	2422
NH_4^+	mg N- NH_4^+ /L	191.4	337.2	456.0	141.9	313.2	525.6
PO_4^{3-}	mg P- PO_4^{3-} /L	11.2	18.9	37.8	12.4	15.2	34.8
SSV	mg SSV/L	176.0	320.0	377.0	123.0	198.0	303.0
pH	unidades de pH	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
OD	mg O_2 /L	4.3	0.6	0.4	3.0	0.5	0.3

6.2.1. Remoción de materia orgánica, nutrientes y productividad de biomasa de reactores con digestato anaerobio

En cuanto a remoción de materia orgánica, los reactores con las tres diferentes concentraciones tuvieron un comportamiento muy similar (remociones de DQO alrededor de 80 %), sin embargo, como se observa en la Figura 21, el reactor más concentrado DA 3 no cambió de color ni se observaron microalgas al final de ciclo en este reactor, lo que significa que tal vez lo ocurrido en este reactor fue un proceso anaerobio de remoción de materia orgánica.

En cuanto a la remoción de nitrógeno amoniacal, el mayor porcentaje de remoción lo obtuvo el reactor DA 1, el reactor con una concentración mayor (DA 2) tuvo una remoción negativa de nitrógeno, es decir, produjo un 20 % más de la cantidad de nitrógeno amoniacal inicial, lo que reafirma la hipótesis de que en éste reactor se presentaron condiciones anaerobias ya que cuando se presenta digestión, los nutrientes que se encuentran al interior de las células se liberan al medio (Tchobanoglous et al., 2002). Otra razón por la cual se puede afirmar que no hubo presencia de oxígeno en este reactor, es que no hubo colonización de microalgas en el mismo, los reactores no se tornaron de color verde y no se observaron microalgas al microscopio como se observa en la Figura 22.

La remoción de fosfatos fue mayor en el reactor DA 0.5 lo que es normal ya que la concentración de fosfatos era menor y los únicos dos medios para remover fosfatos de aguas residuales es por precipitación ($\text{pH} > 9$), lo cual no aplica para este caso o por asimilación: asociado al crecimiento de la biomasa (Figura 17).

Con respecto a estas tres variables únicamente, se podría concluir que las mejores concentraciones son las que permiten obtener valores de DQO entre 750 y 1200 mgDQOs/L. La variable que más influyó en la decisión fue la productividad de biomasa (Figura 18) donde claramente se observa que la mayor productividad se obtuvo con el reactor **DA 1**.

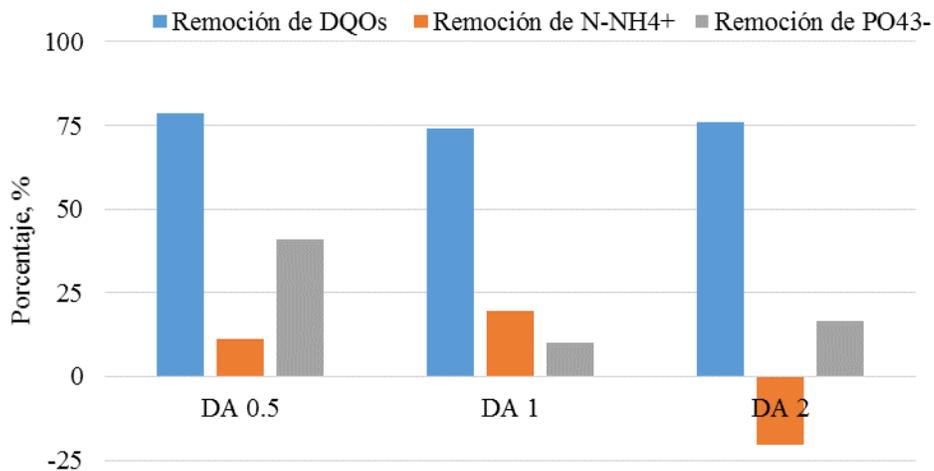


Figura 17 Remociones de DQO, N y P de los reactores con diferentes concentraciones de digestato anaerobio

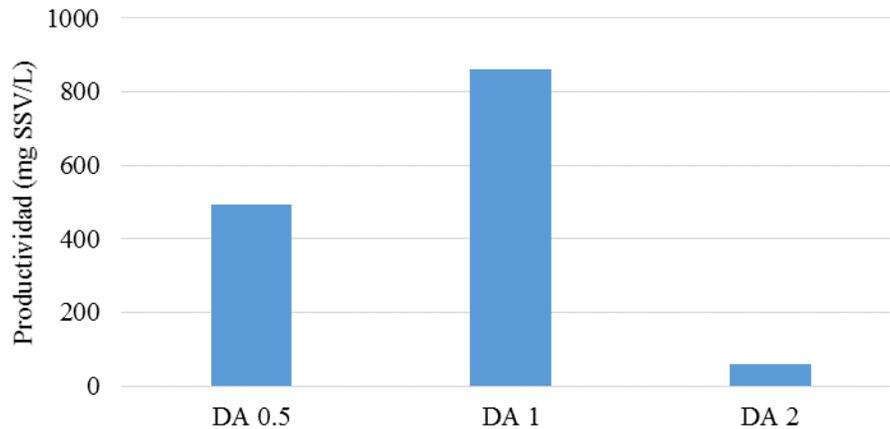


Figura 18 Productividad de biomasa con diferentes concentraciones de digestato anaerobio

6.2.2. Remoción de materia orgánica, nutrientes y productividad de biomasa de reactores con purines de cerdo

Para los purines de cerdo, el comportamiento en cuanto a la remoción de materia, nuevamente los tres reactores obtuvieron remociones similares (alrededor del 75 %). En cuanto a la remoción de nitrógeno amoniacal, nuevamente el reactor con una concentración mayor (PC 2) tuvo una remoción negativa de nitrógeno, lo que indica que dentro de éste se produjeron también condiciones anaerobias. El mayor porcentaje de remoción lo obtuvo el reactor PC 0.5. En cuanto a la remoción de fosfatos, los valores se presentaron en forma descendiente de menor a mayor concentración (más concentrado, menor remoción) (Figura 19). Para tomar una decisión con respecto a la concentración que se seguirá utilizando para purines de cerdo, también se analizó la variable de la productividad de biomasa y según esto, el reactor más concentrado (PC 2) es también el reactor con una productividad mayor (Figura 20).

A pesar de que la productividad fue mayor con el reactor más concentrado, la biomasa generada en éste reactor no fue biomasa microalga-bacteria precisamente (Figura 21). No sólo visualmente, los reactores más concentrados tanto con purines de cerdo como con digestato no tomaron un color verdoso sino que al microscopio tampoco se observaron microalgas (Figura 22) como sí se observó una cantidad mucho mayor en el reactor con la concentración intermedia (PC 1) y por ésta razón ésta fue la concentración que se escogió para los siguientes experimentos.

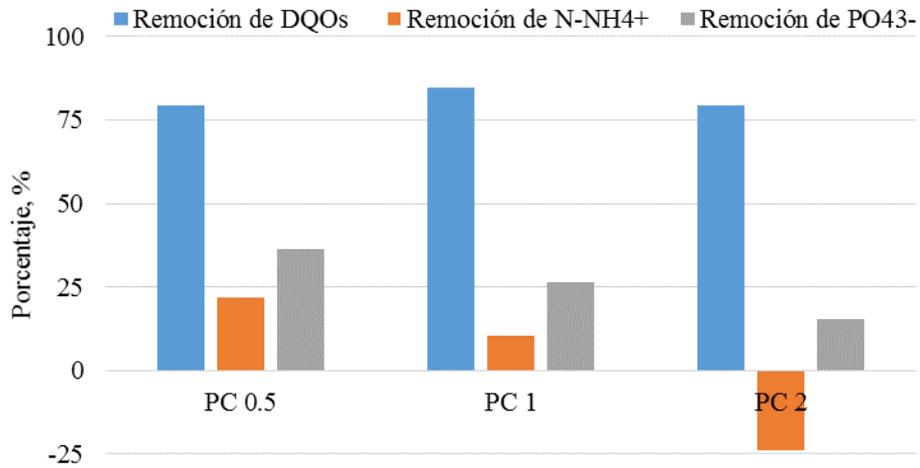


Figura 19 Remociones de DQO, N y P de los reactores con diferentes concentraciones de purines de cerdo

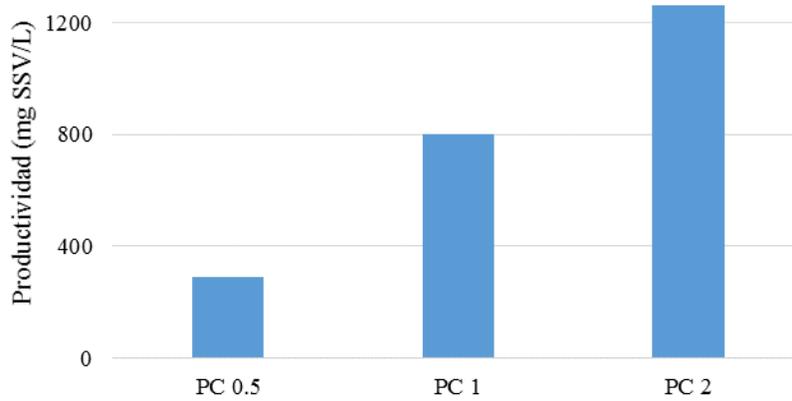


Figura 20 Productividad de biomasa con diferentes concentraciones de purines de cerdo

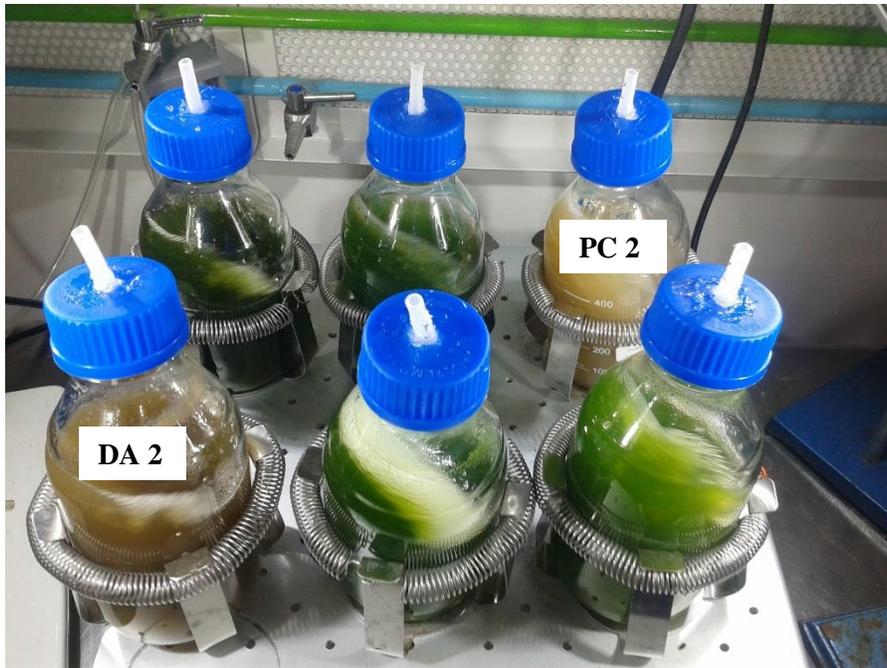


Figura 21 Evidencia de poco crecimiento de microalgas en PC 2 y DA 2 (reactores de 450 mL, agitación orbital: 200 rpm)

Día 0 PC 0.5	Día 0 PC 1	Día 0 PC 2
Día 7 PC 0.5	Día 7 PC 1	Día 7 PC 2

Figura 22 Cambios microbiológicos de la biomasa con purines de cerdo. Fotografías tomadas en campo claro, aumento: 40X.

6.3. Evaluación del efecto de la inoculación con microalgas sobre la remoción de nutrientes y materia orgánica de tres diferentes tipos de agua residual

En la Tabla 13 se encuentran los datos de las caracterizaciones a cada uno de los sustratos alimentados a los reactores al comienzo de cada ciclo (purines de cerdo 1 y digestato anaerobio diluidos).

Tabla 13 Caracterizaciones realizadas a los sustratos antes de cada ciclo de alimentación

Parámetro	Unidades	Agua Residual Municipal (ARM)	Purines de Cerdo (PC)	Digestato Anaerobio (DA)
DQOs*	mg O ₂ /L	412 ± 152	834 ± 170	934 ± 271
Nitrógeno Amoniacal*	mg N - NH ₄ ⁺ /L	62.7 ± 8.1	63.6 ± 7.4	94.3 ± 12.4
Fosfatos solubles*	mg P - PO ₄ ³⁻ /L	14.6 ± 1.9	3.8 ± 3.1	16.3 ± 2.2
Radio N/P	-	3.0 - 5.0	19.0 - 22.0	5.0 - 6.0
Nitratos**	mg N - NO ₃ ⁻ /L	6.1 ± 0.26	10.6 ± 0.50	5.5 ± 0.5
Nitritos**	mg N - NO ₂ ⁻ /L	1.5 ± 0.3	1.41 ± 0.08	3.0 ± 0.8
pH	pH Units	7.8 ± 0.5	8.1 ± 0.4	7.7 ± 0.6
Sólidos Suspendidos Volátiles	mg SSV/L	150 ± 50	250 ± 30	400 ± 70

*Filtrados con filtros de fibra de vidrio de 1µm. **Filtrados con filtros de celulosa de 0.45µm.

En la Tabla 14 se observan las cantidades de lodo y suspensión de microalgas utilizadas para la inoculación inicial del sistema procurando tener una concentración de sólidos suspendidos volátiles de 300 mg SSV/L así como la identificación de cada reactor.

Tabla 14 Concentraciones de inóculo iniciales e identificación de los reactores.

Reactor	Microalgas (M) y bacterias (B)			Bacterias (B)		
	ARM-M + B	PC-M + B	DA-M + B	ARM-B	PC-B	DA-B
mg de B	90	90	90	270	270	270
mg de M	180	180	180			
Concentración inicial de biomasa (mgVSS/L)	300	300	300	300	300	300

6.3.1. Determinación del tiempo de reacción

Para determinar el tiempo de reacción de cada lote, se realizaron cinéticas determinando los parámetros DQOs, N-NH₄⁺ y SSV cada dos días, durante ocho días.

La remoción de DQOs comienza a decaer a partir del día 3 para el caso del reactor con agua residual municipal (ARM) y con inóculo de bacterias y microalgas (ARM-M + B) y a partir del día 5 para el caso del reactor con purines de cerdo (PC) y con inóculo de bacterias y microalgas

(PC-M + B). Esto puede ocurrir para sistemas con microalgas verdes y verdes azules, algunas de estas especies liberan pequeñas cantidades de ácido glicólico al medio (Cheng et al., 1972; Tolbert and Zill, 1956) lo que se puede traducir en un aumento en la DQO. El reactor con digestato anaerobio (DA) y con inóculo de microalgas y bacterias (DA-M + B) pareciera todavía seguir en aumento después de terminado el ciclo de siete días (Figura 23).

Los reactores que fueron inoculados únicamente con lodo activado, y que fueron alimentados con ARM y PC, alcanzaron un máximo de remoción de DQO al día 5 y nuevamente para el caso del que fue alimentado con DA pareciera seguir en aumento.

Para los reactores ARM-M+B, PC-M+B y ARM-B, la remoción de nitrógeno amoniacal alcanzó el 100 % para el día 5, a diferencia de los reactores alimentados con DA que para el final del experimento, sólo habían alcanzado el 66 % para el reactor que no había sido inoculado con microalgas. Éste comportamiento es normal ya que, si bien los sustratos DA y PC contenían concentraciones de DQO similares, la concentración de nitrógeno es mayor para DA.

En cuanto a la producción de biomasa, se observa cómo para los reactores que fueron inoculados con microalgas, se alcanza un valor casi constante a partir del día 3.

Como lo que se pretendía para este ensayo era determinar el tiempo en el cual se alcanzaran las mayores remociones de nutrientes y materia orgánica, así como obtener la mayor cantidad de biomasa (por su alto valor agregado), la decisión de definir el tiempo en cuatro días se tomó entonces por estas tres razones: a) el decaimiento en la remoción de DQOs presentada por los reactores inoculados con microalgas y alimentados con ARM y PC, b) porque se había llegado al máximo de producción de biomasa desde el día #3 y c) porque los reactores con ARM y PC lograron una remoción de nitrógeno amoniacal del 100 % para el día 5. Si bien no todos los reactores alcanzan los máximos de remoción en este tiempo (4 días), lo que se busca es forzar a la aclimatación de la biomasa por medio de un estrés por tiempos cortos de reacción.

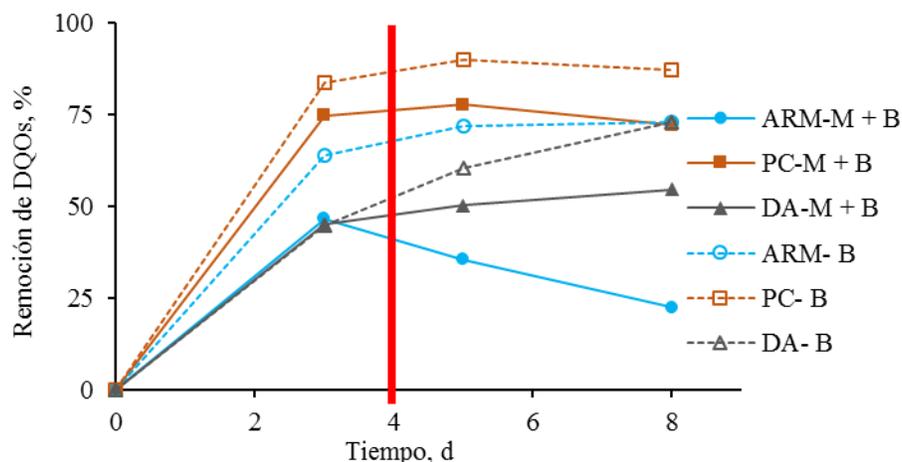


Figura 23 Dinámicas de remoción de DQOs en reactores con (M + B) y sin (- B) inóculo de microalgas.

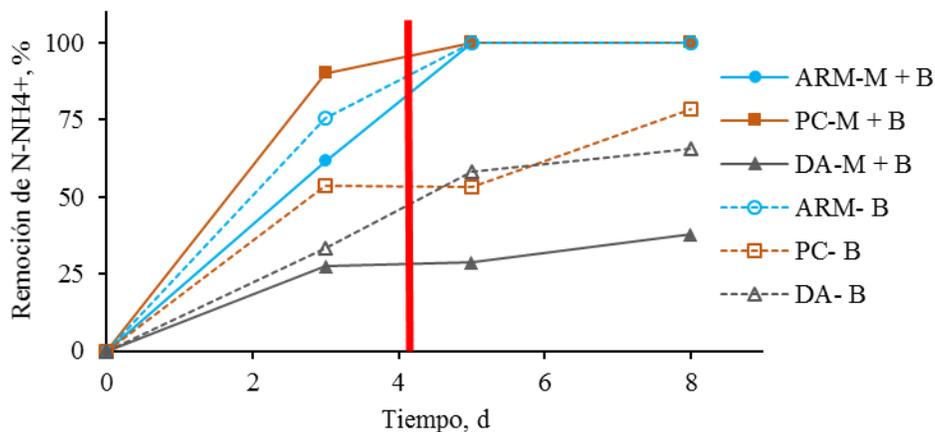


Figura 24 Dinámica de remoción de nitrógeno amoniacal en reactores con (M + B) y sin (- B) inóculo de microalgas.

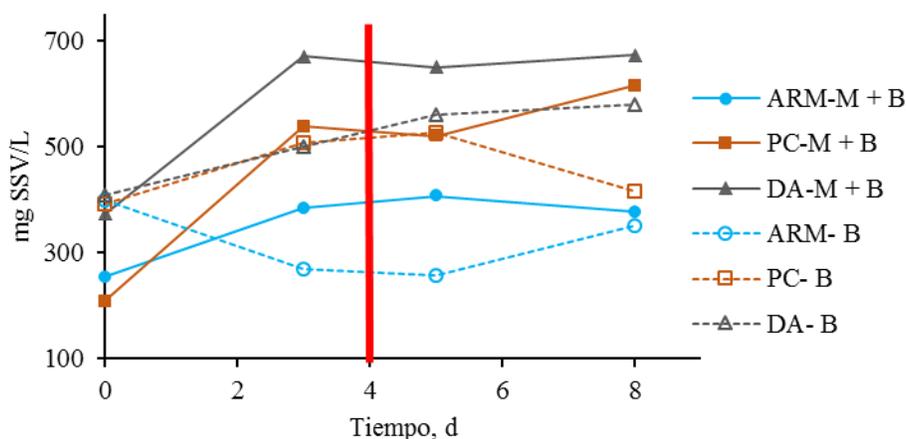


Figura 25 Dinámica de crecimiento de biomasa de los reactores con (M + B) y sin (- B) inóculo de microalgas

Después del primer ciclo, el color en los reactores que se inocularon únicamente con lodos activados cambió a verde pálido y se observaron algunas diatomeas utilizando el microscopio. Después del segundo ciclo, los reactores con el mismo sustrato que fueron inoculados con microalgas tenían el mismo tono que los reactores que no y en éstos últimos, otras especies de microalgas fueron identificadas (Figura 26). Éste fue el primer indicio para probar la hipótesis de que no es necesario un inóculo de microalgas para arrancar un sistema microalga-bacteria si las condiciones son adecuadas. En la Figura 27 se puede observar cómo al iniciar el ciclo, no habían microalgas presentes en la biomasa y cómo al terminar el ciclo, las microalgas no sólo colonizaron el medio sino que fueron atrapadas por los flocs del lodo activado ayudando así a la sedimentación (cosecha) de la biomasa que es el cuello de botella de estos sistemas.



Figura 26 Reactores después de 2 ciclos de operación. (reactores de 900 mL, agitación magnética: 150 – 200 rpm)

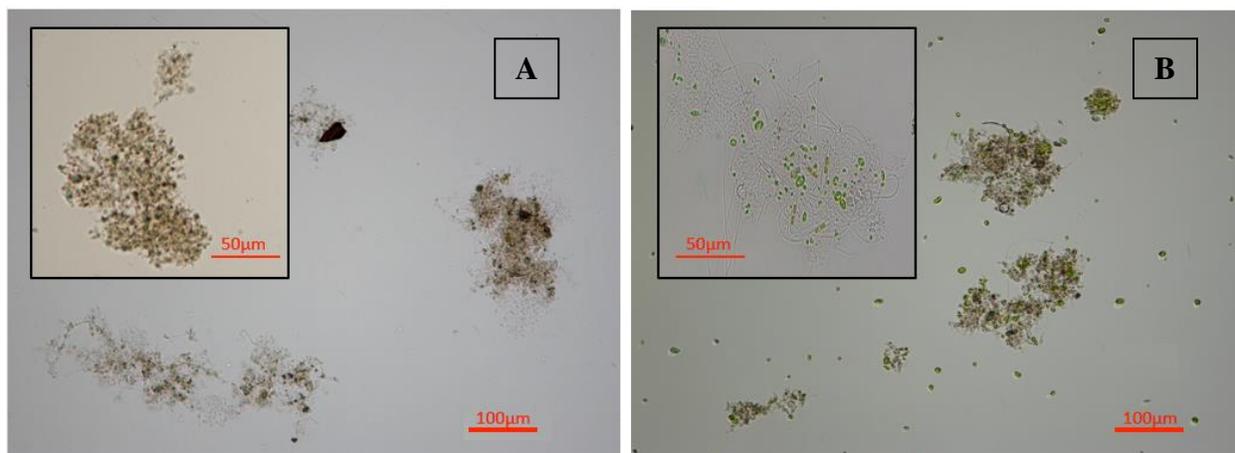


Figura 27 Micrografías de los reactores A) PC-B en el día 0 y B) PC-B después de tres ciclos de operación. (Formación de flóculos microalga-bacteria). Fotografías tomadas en campo claro (50μm: 20X y 100 μm: 10X).

Luego de definir el tiempo de reacción, se llevaron a cabo cinco ciclos de 96 horas (4 días) donde se analizaron las siguientes variables al inicio y al final de cada ciclo: DQOs, NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- y SSV. Con el dato de SSV finales se extraía la biomasa necesaria para comenzar el siguiente ciclo con la misma cantidad de sólidos ($350 \approx \text{mg SSV/L}$).

6.3.2. Remoción de materia orgánica

Es interesante notar que los porcentajes de remoción más altos fueron obtenidos por los reactores que no fueron inoculados con microalgas: $74 \% \pm 2.7$ y $84 \% \pm 2.1$ para ARM-B y PC-B

respectivamente. Sin embargo, se realizaron análisis de ANOVA y se demuestra que no hay diferencias significativas entre los dos tipos de inoculación. Esto indica que las pocas microalgas presentes en los sustratos pueden crecer fácil y rápidamente porque están adaptadas a ese ambiente.

Después de que las microalgas alcanzan una concentración significativa en los reactores, el OD incrementa (hasta 19 – 20 mg O₂/L) hasta un nivel en el cual las bacterias heterotróficas pueden oxidar la materia orgánica eficientemente. Esto da una idea de que éstos sistemas son económicamente viables ya que no es necesaria la aireación para lograr las mismas remociones que aquellas obtenidas por sistemas por lodos activados convencionales. Sin embargo, como el tiempo de retención en sistemas alga-bacteria es hasta cuatro veces mayor que los lodos activados, el área de los sistemas alga-bacteria debe ser mucho mayor.

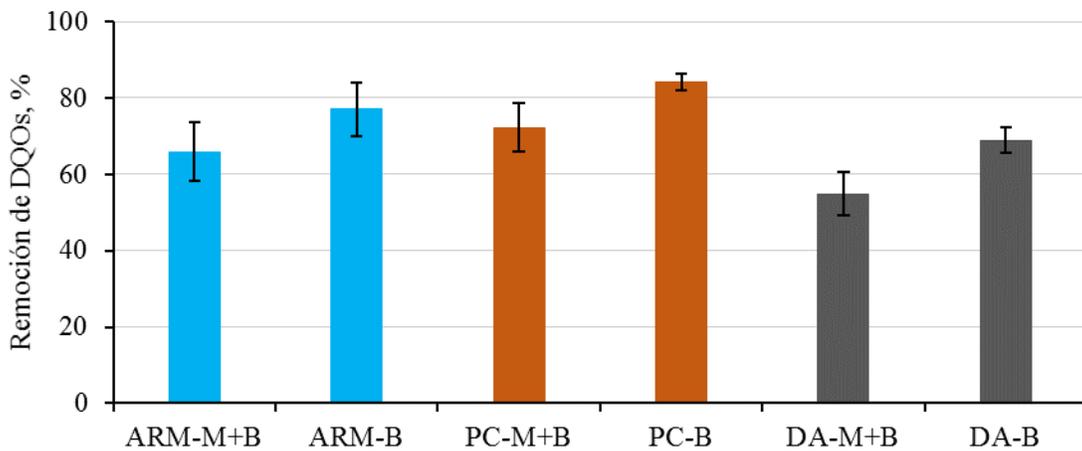


Figura 28 Remoción de DQOs (media ± SD) de reactores con y sin inóculo de microalgas

6.3.3. Remoción de fósforo

Como se explicó anteriormente, hay dos vías para remover el fósforo de las aguas residuales (biótica y abiótica). La dinámica de pH se presenta a continuación en la Figura 29 y en ella se puede apreciar que para todos los casos, el pH final se mantuvo alrededor de 8.5 para todos los reactores, indicando que no toda la remoción de fosfatos puede ser atribuida a la precipitación (vía abiótica). En éste caso es más probable pensar que la remoción se le atribuye a la vía biótica. Las microalgas y bacterias usan el fósforo para sintetizar constituyentes celulares y la cantidad de fósforo usada está relacionada con su estequiometría. Según Martínez (1999), *Scenedesmus obliquus* tiene una tasa específica de consumo de fósforo de 0.0025 µmol P/mg biomasa/h. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, las microalgas pueden tomar mucho más fósforo que el necesario para sobrevivir. Éste extra-fósforo es almacenado como polifosfatos para su uso como una fuente interna cuando la concentración externa de fósforo es limitante, y es conocido como “polyphosphate overplus”, esto ocurre en la ausencia de crecimiento (Aitchison and Butt, 1973). El almacenamiento de polifosfato a pesar de las cómodas condiciones de crecimiento se explicó anteriormente (consumo de lujo) y es típico del metabolismo normal de los microorganismos (Eixler et al., 2006). Powell (2009) estudió el consumo de lujo de fósforo de *Scenedesmus sp* en

lagunas de estabilización y encontró que esta especie de microalgas efectivamente almacena extra-fósforo al interior de las celular como gránulos de polifosfato (gránulos de volutin). Los mayores porcentajes de remoción de fosfatos fueron obtenidos por los reactores alimentados con ARM y PC tanto los que fueron inoculados con microalgas como los que no ($77 \% \pm 4.3$ y $76 \% \pm 8.5$, respectivamente). Los resultados para los reactores alimentados con DA fueron significativamente ($P=0.003$) diferentes para los reactores con y sin inóculo de microalgas ($68 \% \pm 10$ y $30 \% \pm 8.2$ respectivamente), esto se puede deber a que el digestato anaerobio puede tener algunas sustancias inhibitorias (Figura 30), la más común en digestatos es el sulfuro.

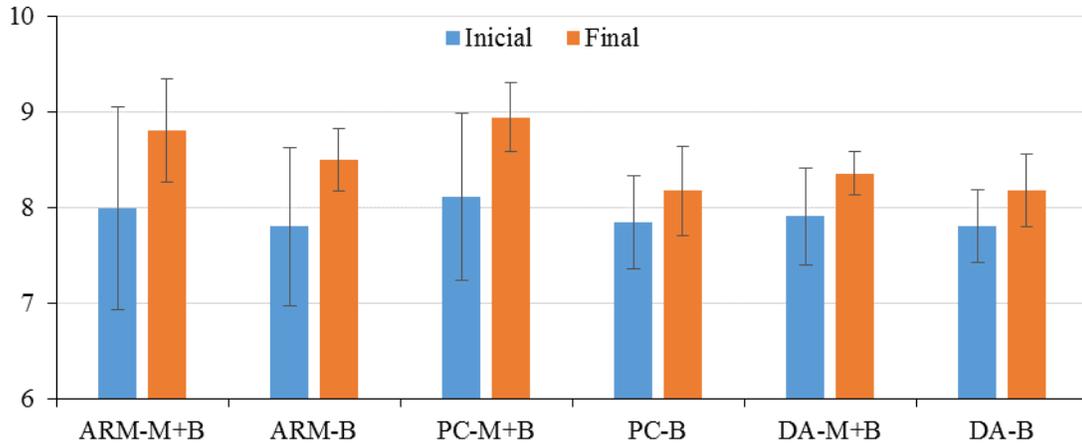


Figura 29 Dinámica de pH de los reactores

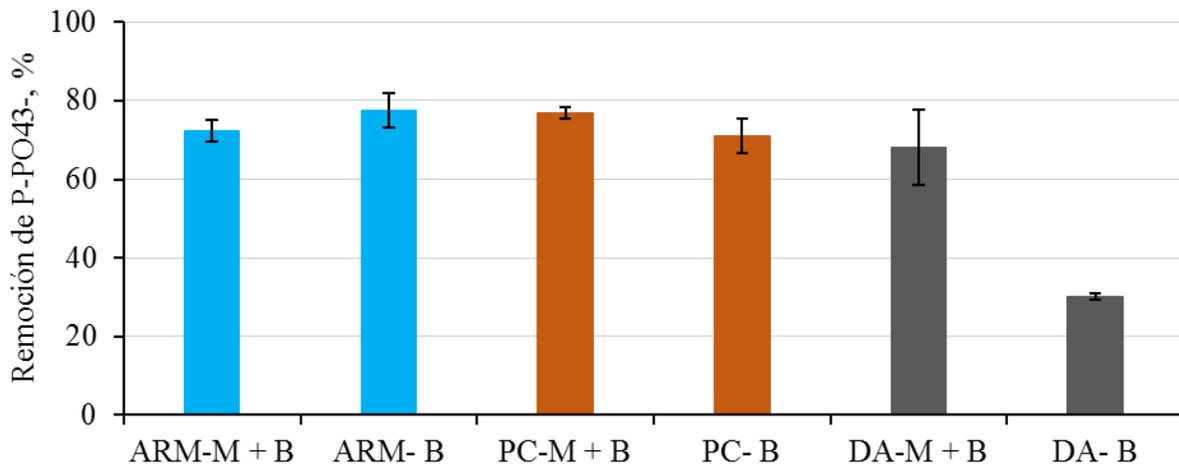


Figura 30 Porcentajes de remoción de fosfatos (media \pm SD) de reactores con y sin inóculo de microalgas

6.3.4. Remoción de nitrógeno

En cuanto a la remoción de nitrógeno, los mayores porcentajes se presentaron para ARM seguido de PC y por último DA (Figura 31).

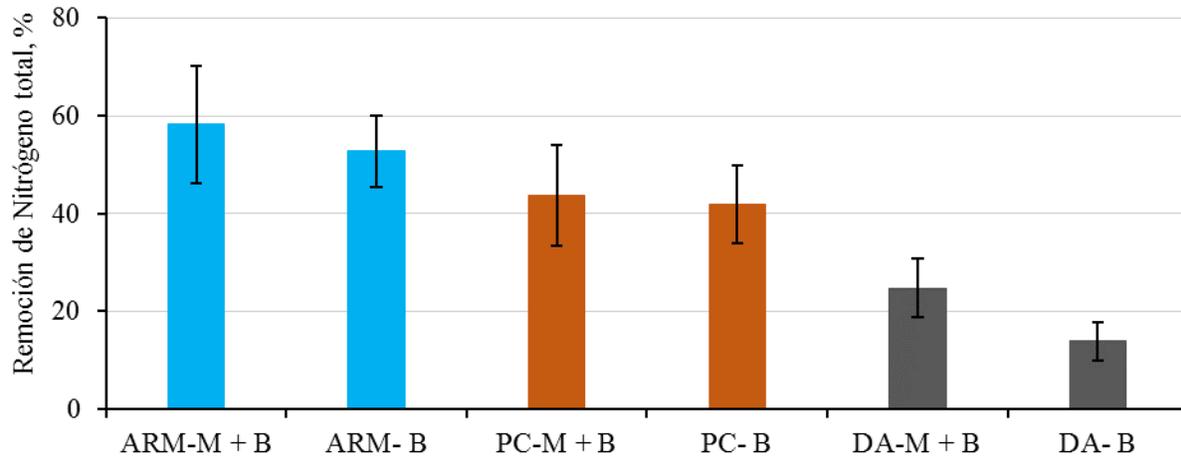


Figura 31 Remoción de nitrógeno total (media \pm SD) de los reactores con y sin inóculo de microalgas

Para comprender un poco mejor los mecanismos de remoción de nitrógeno que se presentaron en el experimento, se analizó la concentración de nitrógeno total inicial y las diferentes especies nitrogenadas encontradas al final de cada ciclo (Figura 32).

Los reactores con inóculo de microalgas y bacterias remueven el nitrógeno principalmente por mecanismos de asimilación al interior de las células y los reactores con inóculo de bacterias remueven el nitrógeno por vías de asimilación pero otra parte también es nitrificado.

Esto se puede explicar por dos razones, 1) el inóculo de microalgas utilizado estaba siendo crecido en medio Bold (cuya fuente de nitrógeno es únicamente de nitratos) y por tal, consumían todos los nitratos disponibles en el medio y 2) la cantidad de mg de lodo aerobio inoculado a los reactores fue mayor para aquellos que sólo se inocularon con lodo y por tal la cantidad de bacterias nitrificantes presentes en él, serán mayores en éstos reactores.

Si bien los reactores alimentados con el mismo sustrato tuvieron porcentajes de remoción de nitrógeno total similares, los mecanismos de remoción fueron diferentes, ambos removieron el nitrógeno amoniacal mayormente por asimilación al interior de las microalgas pero los que no se inocularon inicialmente con microalgas presentaron cierto porcentaje de nitrificación. Para el caso del tratamiento de aguas residuales, no es conveniente que el nitrógeno esté presente en el efluente en forma de nitrito o nitrato porque aunque el nitrógeno está en un estado de oxidación más avanzado, también puede causar eutrofización aguas abajo mientras que si el nitrógeno es asimilado al interior de las microalgas, éstas se pueden separar por medios de filtración o sedimentación y el nitrógeno orgánico (presente en el interior de las células) es removido completamente del agua residual tratada.

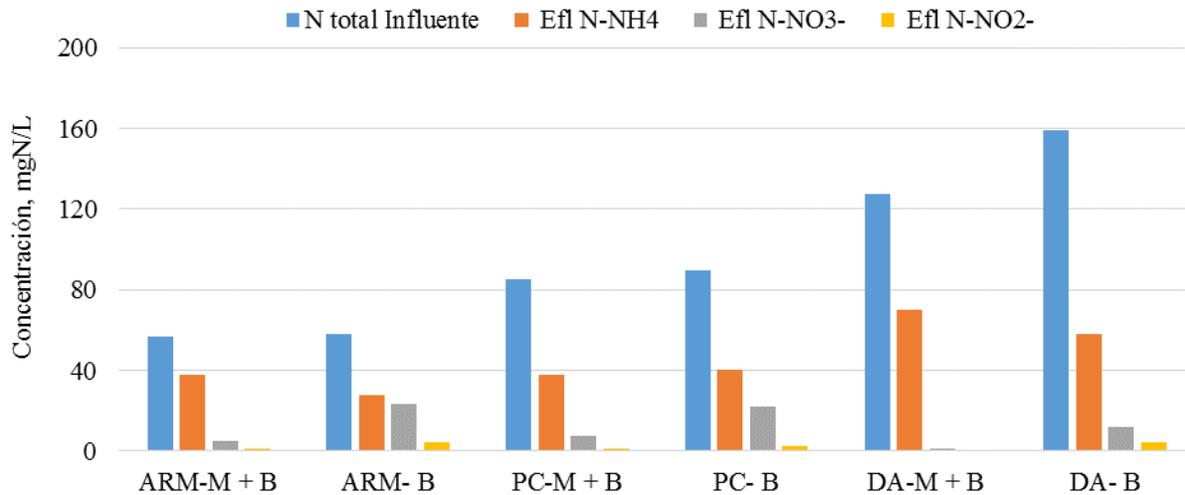


Figura 32 Mecanismos de remoción de nitrógeno (media \pm SD) de los reactores con y sin inóculo de microalgas

6.3.5. Análisis de ANOVA para velocidades y tasas de remoción de nutrientes y materia orgánica

Para probar si hay diferencias estadísticamente significativas entre la inoculación con microalgas inicial y el tipo de agua utilizado, se realizó la prueba estadística de la ANOVA (ver Anexo 3) para las velocidades de remoción de materia orgánica y nutrientes así como las tasas de remoción de nitrógeno amoniacal y fósforo

De la ANOVA de velocidades de remoción de DQOs se puede observar que sí hay diferencia significativa con respecto al tipo de agua utilizada. Este análisis es muy valioso ya que nos permite concluir con ayuda de la Figura 28, que los tratamientos con purines de cerdo son no sólo los más eficientes, pero sí los más veloces para remover materia orgánica. Otra conclusión que se revela con éste análisis es que no presenta diferencias estadísticamente significativas en relación a si se inocula inicialmente con microalgas el sistema o no y esta conclusión es bastante importante ya que revela un ahorro todavía mayor en cuanto a costos de inoculación de los sistemas, con este ensayo se puede concluir que si las condiciones de diseño de los tratamientos (tipo laguna) de aguas residuales se ubican también en zonas con buena incidencia de rayos solares, entonces no hay necesidad de comprar ningún tipo de inóculo para que el sistema en muy pocos días comience a producir biomasa microalgal con los microorganismos presentes en el agua residual.

La ANOVA de velocidad de remoción de NH_4^+ indica que no hay diferencias significativas en cuanto a la velocidad de remoción de nitrógeno amoniacal en los diferentes sistemas ni por el tipo de agua utilizada ni por la inoculación inicial del sistema. Se realizó una ANOVA subsiguiente analizando las tasas de remoción de nitrógeno amoniacal (teniendo en cuenta la biomasa producida) y tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos aspectos, lo que indica que el sistema microalga-bacteria tiene una cinética de remoción de

nitrógeno estadísticamente igual en cualquiera de los tres tipos de agua con o sin inoculación inicial de microalgas.

En cuanto a la velocidad de remoción de fosfatos, ANOVA indica que sí hay diferencia significativa tanto en el tipo de agua como en la inoculación inicial del sistema en cuanto a velocidad de remoción y que también hay diferencia en la tasa de remoción dependiendo del tipo de agua utilizado. Este resultado no concuerda con lo consultado en la bibliografía en cuanto a las relaciones ideales de nitrógeno y fósforo y cómo afectan las velocidades de remoción de nutrientes cuando se tienen relaciones por encima o por debajo del óptimo que se tiene para *Scenedesmus* de 30. Si bien los purines de cerdo tenían la relación N/P más alta que digestato y agua residual, todos tienen inicialmente una relación N/P muy por debajo del ideal y se supone que en esos casos el sistema está limitado por fósforo y su velocidad de remoción en teoría aumenta porque las microalgas acumulan fósforo extra; pero no ocurrió así y la razón que se considera más probable es porque, como se observó al principio, el nitrógeno amoniacal se abate desde el tercer día casi un 80 % lo que genera nuevamente un desbalance en la relación N/P que tiene el efecto contrario al que se comentaba anteriormente, y la biomasa se encuentra con una sobrecarga de fosfatos que no son asimilados por la biomasa.

En este punto es importante analizar también los cambios en el pH que, a diferencia de los ensayos realizados anteriormente, no hubo cambios grandes en el pH (Figura 29). Esto también se evidenció en el ensayo con diferentes concentraciones de purines y digestato y la razón que se encuentra posible para esto es que la carga orgánica en estos casos era tan alta que la mineralización de la materia orgánica era más acelerada, por tal la cantidad de CO₂ presente en los sistemas era un tanto mayor para lograr mantener el valor de pH alrededor de 8 - 8.5 unidades durante todo el experimento. Estos valores de pH reducen o casi descartan la posibilidad de perder nutrientes de manera abiótica (volatilización o precipitación) ya que se necesitan valores de pH alrededor de 9 unidades para que esto ocurra; dato que soporta los análisis hechos previamente en cuanto a la remoción de nutrientes a cargo del consumo de la biomasa. Esto tiene una implicación importante en cuanto al mantenimiento de una buena actividad de la biomasa sin necesidad de regulaciones externas de pH como se hace en muchos casos para sistemas con microalgas.

6.3.6. Formación de flóculos y acumulación de lípidos al interior de las microalgas

En la Figura 33 se observa una imagen tomada al microscopio del inóculo de microalgas utilizada para éstos ensayos. Es importante notar la forma y el tamaño que tienen las células de *Scenedesmus* y *Desmodesmus* antes de ser sometidas a las aguas residuales municipales.

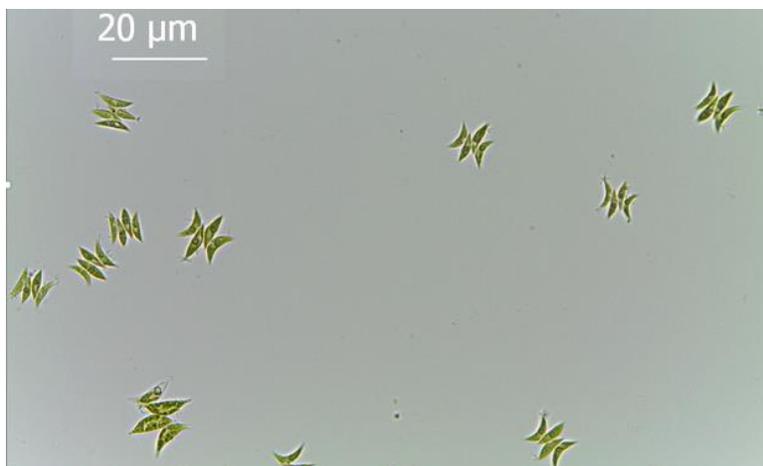


Figura 33 Inóculo de microalgas al microscopio. Fotografía tomada en campo claro, 100X.

Para el reactor ARM-M +B, se observó que a lo largo del experimento no hubo una gran adherencia de las microalgas a los flóculos del lodo activado, se observaron más bien microalgas de nado libre (Figura 34 *a* y *d*). Lo que sí se puede notar son ciertos cambios morfológicos en las microalgas (Figura 34 *c*).

A diferencia del anterior, el reactor que fue alimentado con el mismo sustrato pero que no fue inoculado inicialmente con microalgas (ARM-B), presenta una buena adherencia de las microalgas al floc bacteriano (Figura 35). Esto es importante porque, como se mencionó anteriormente, el cuello de botella de estos sistemas está en los costos de separación de la biomasa microalgal del medio, conocido también como la “cosecha” de las microalgas; lo que indica que si se logra una buena incorporación de las células microalgales al flóculo de bacterias se puede lograr la sedimentación de la misma manera, o similar a la que se logra en un sistema de lodos activados sin necesidad de agregar coagulantes químicos o utilizar otros métodos que representarían un costo adicional al sistema de tratamiento. Y esto fue justamente lo que ocurrió con los reactores que fueron inoculados únicamente con lodo activado, los cuales sedimentaban al cabo de una hora dejando un buen clarificado a diferencia de los que fueron inoculados con microalgas (Figura 39).

Con respecto a los reactores que fueron alimentados con purines de cerdo e inoculados con microalgas y bacterias, también se puede notar cómo a pesar de que se evidencian algunas formaciones de flóculos con ambos grupos de microorganismos (Figura 36), la formación de éstos en el reactor que no fue inoculado con microalgas es mucho más evidente y los flóculos están más consolidados (Figura 37). Esto indica que, nuevamente, los reactores que no fueron inoculados con microalgas, al tener mayor cantidad de lodo activado, las microalgas que se iban desarrollando naturalmente al interior de los mismos fácilmente iban siendo adheridas a los flóculos presentes en el lodo activado (Figura 37 *d*).

Los reactores que fueron alimentados con digestato anaerobio (tanto los que fueron inoculados con microalgas como los que no) no presentaron formaciones de flóculos como en el caso de los reactores alimentados con PC y ARM pero sí se notaron cambios en la morfología de las microalgas (Figura 38 *d*).

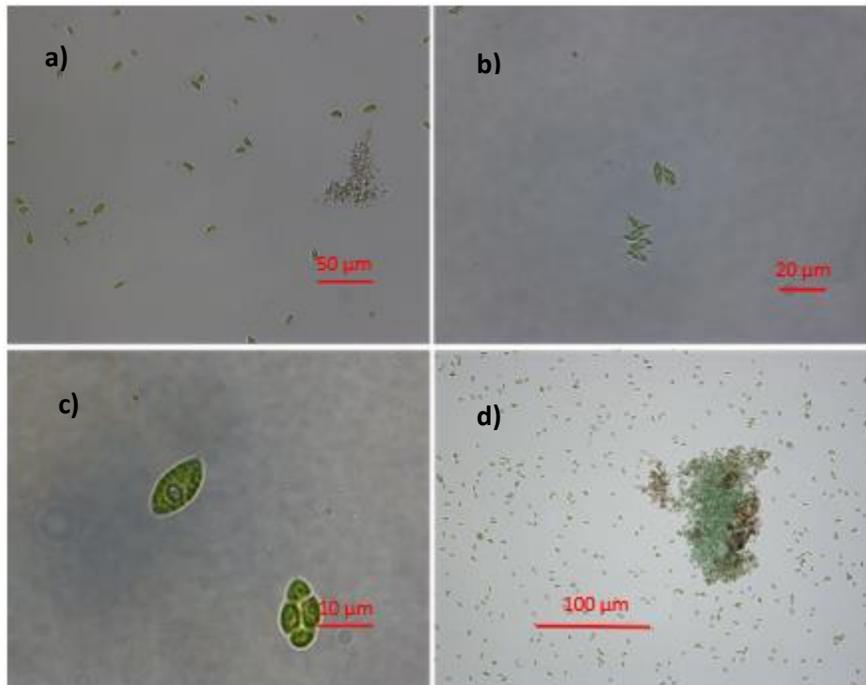


Figura 34 Cambios en la biomasa ARM-M + B. Fotografías tomadas en campo claro: a) 20X, b) 40X, c) 100X y d): 10X.

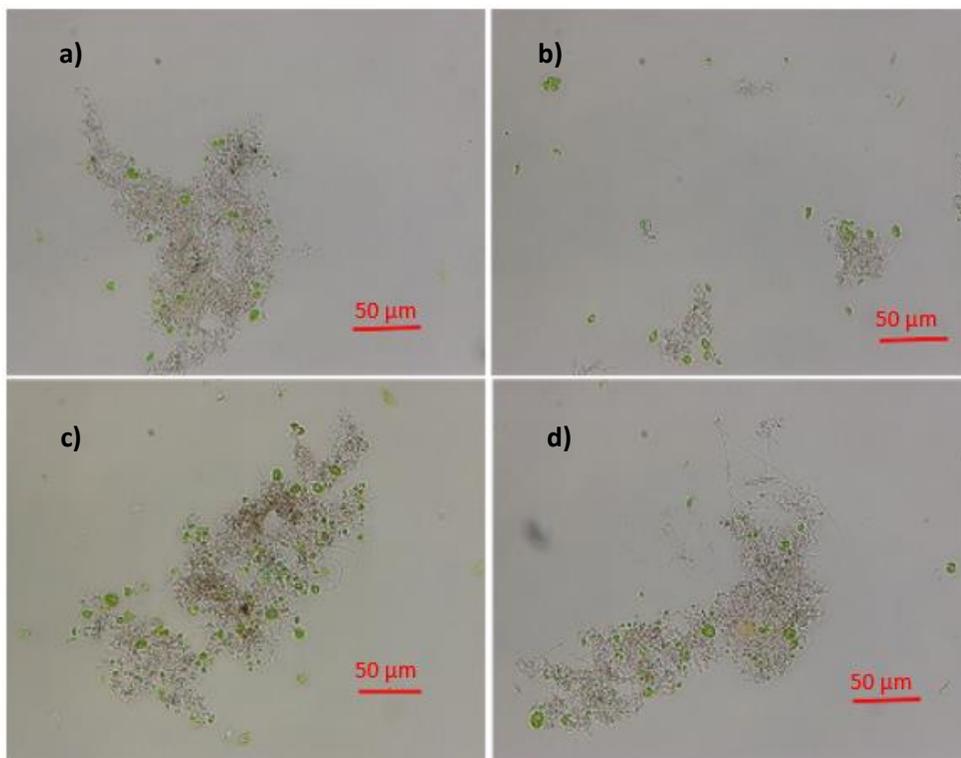


Figura 35 Cambios en la biomasa ARM-B. Fotografías tomadas en campo claro a 20X.

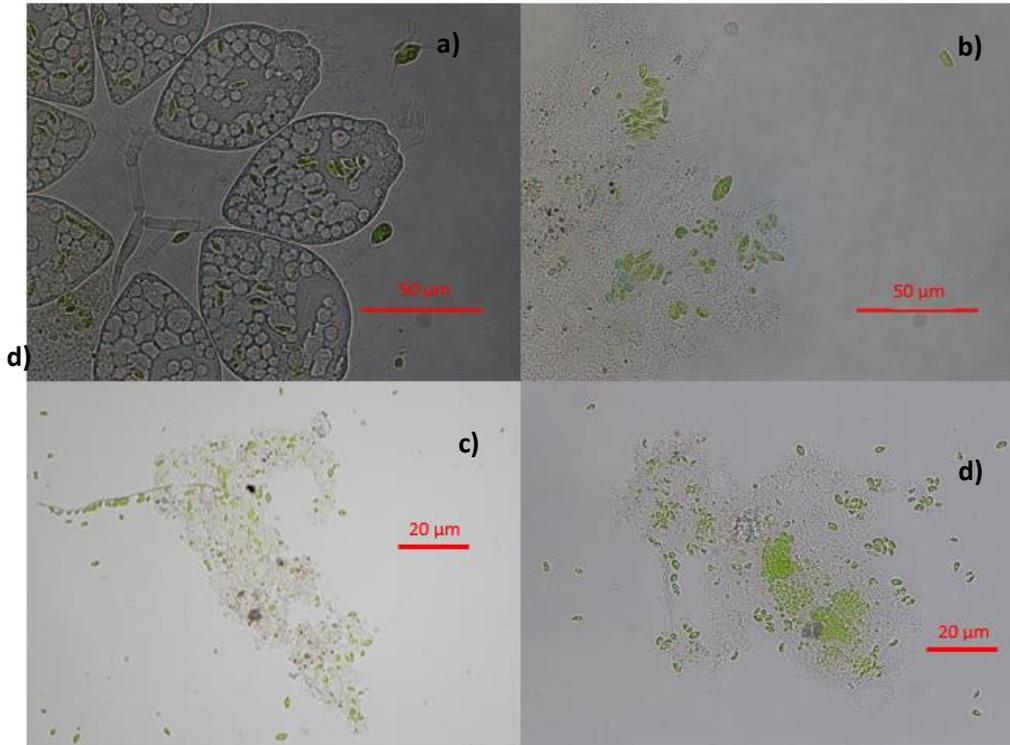


Figura 36 Cambios en la biomasa PC-M + B. Fotografías tomadas en campo claro a 20X.

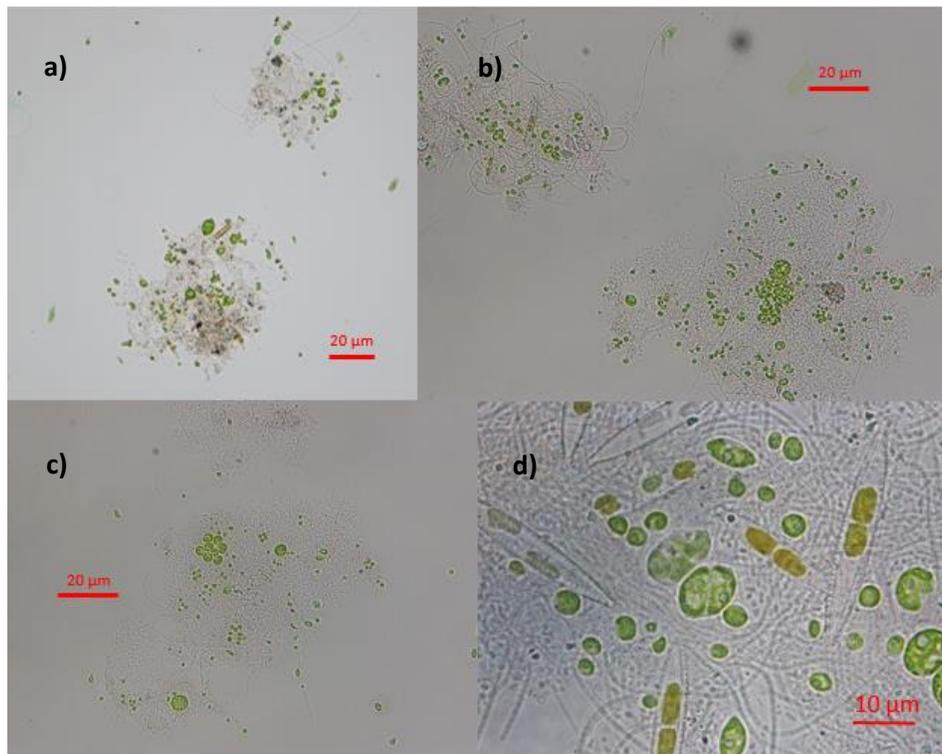


Figura 37 Cambios en la biomasa PC-B. Fotografías tomadas en campo claro. a), b) y c) a 20X y d) a 100X.

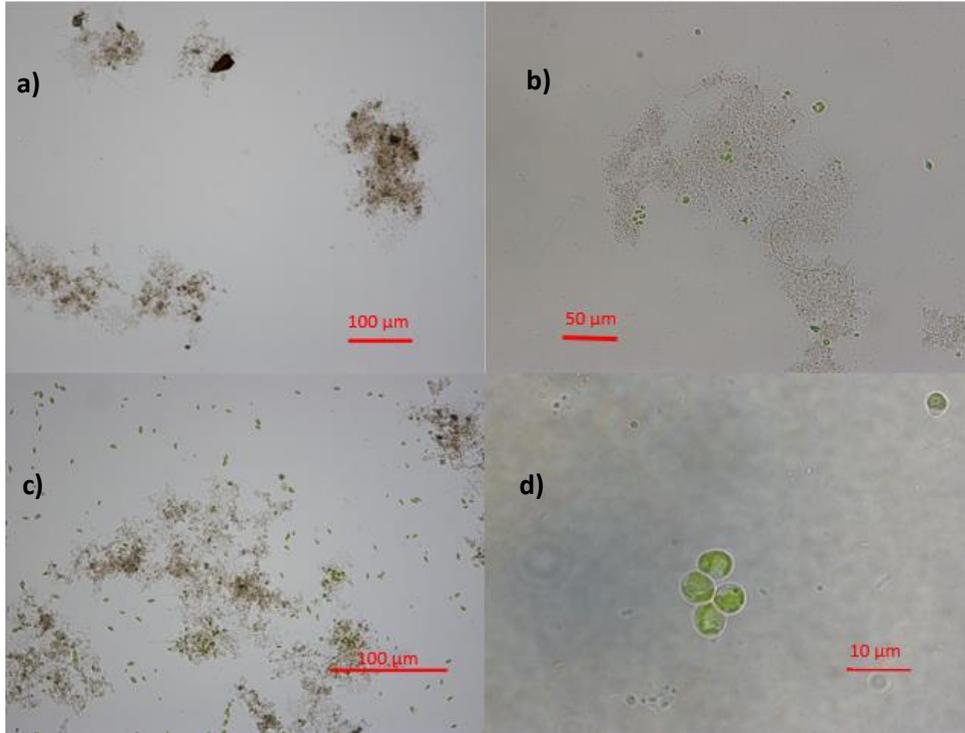


Figura 38 Cambios en la biomasa DA-M + B y DA-B. Fotografías tomadas en campo claro. a) 4X, b) y c) 10X y d) 100X.



Figura 39 Sedimentación de los reactores con (arriba) y sin (abajo) inóculo de microalgas

En cuanto a las observaciones con tinción con rojo Nilo, se comenzaron a hacer seguimientos cada que se terminaba un ciclo de la biomasa contenida en el reactor con ARM e inóculo de

bacterias y microalgas (Figura 40). Si bien en estas imágenes se pueden notar algunos puntitos amarillos al interior de las células, son realmente incipientes y se encuentran desde el principio del experimento (no hay acumulación extra de lípidos al interior).

Al término del último ciclo, se decidió hacer una tinción no sólo al reactor con ARM, sino también al de PC e inóculo de microalgas y bacterias, ya que los datos de estos reactores y la biomasa observada en campo claro parecía también prometedora para la acumulación de lípidos (Figura 41). En este reactor se encontraron microalgas no sólo con cambios bastante fuertes en su morfología pero también con muy alta cantidad de lípidos al interior de las células.

La razón por la cual se cree que hay una acumulación de lípidos en estos sistemas es por la relación N/P tan baja que se tiene para el caso de los purines de cerdo trabajados en el laboratorio. Xin et al. (2010) han mencionado la capacidad de las microalgas para la acumulación de lípidos al interior de las células cuando son sometidas a un estrés de limitación por fósforo, y este pudo haber sido el caso. También por esta buena acumulación de lípidos con el sustrato de purines de cerdo 1 (PC1) es que se decide hacer el siguiente y último ensayo con otros purines de cerdo (PC2) y con otro inóculo (inóculo maduro de microalgas-bacterias cultivadas en agua residual) para conocer si la acumulación de lípidos se daba principalmente por el sustrato (baja relación N/P) o por la especie de microalga utilizada.

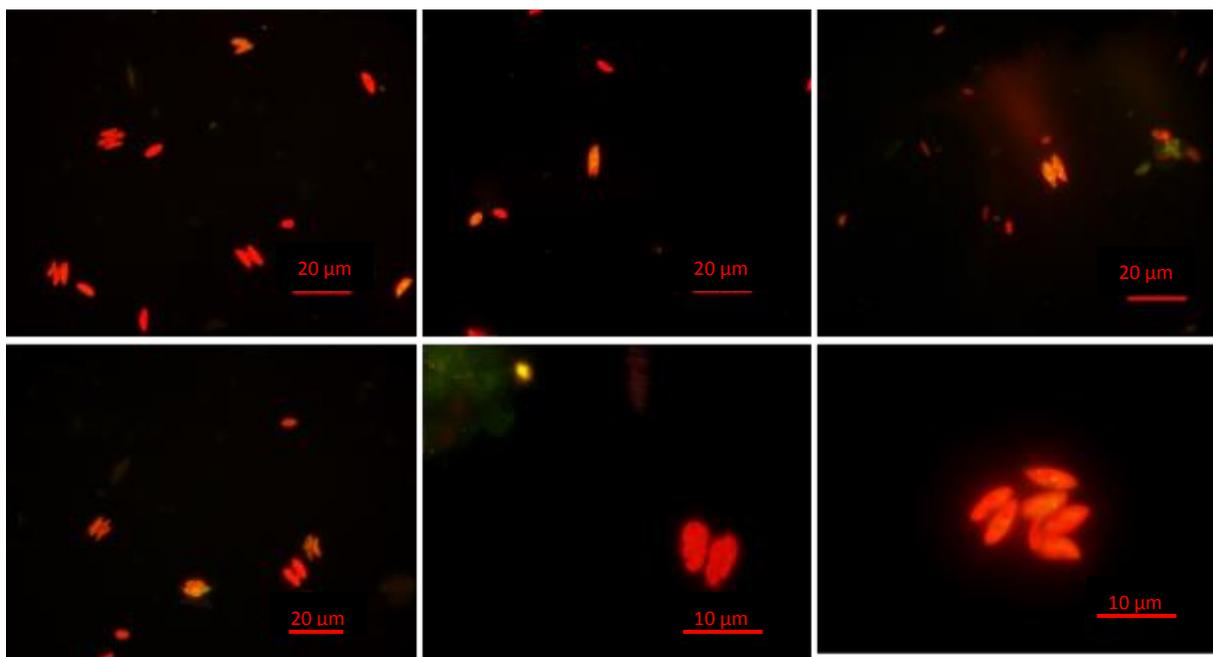


Figura 40 Tinción con rojo Nilo para reactor con ARM. Fotografías tomadas con microscopio de fluorescencia, excitación con láser entre 488-547 nm y emisión entre 560-600 nm. Fotografías con 20µm de escala: 20X y 10µm: 100X.

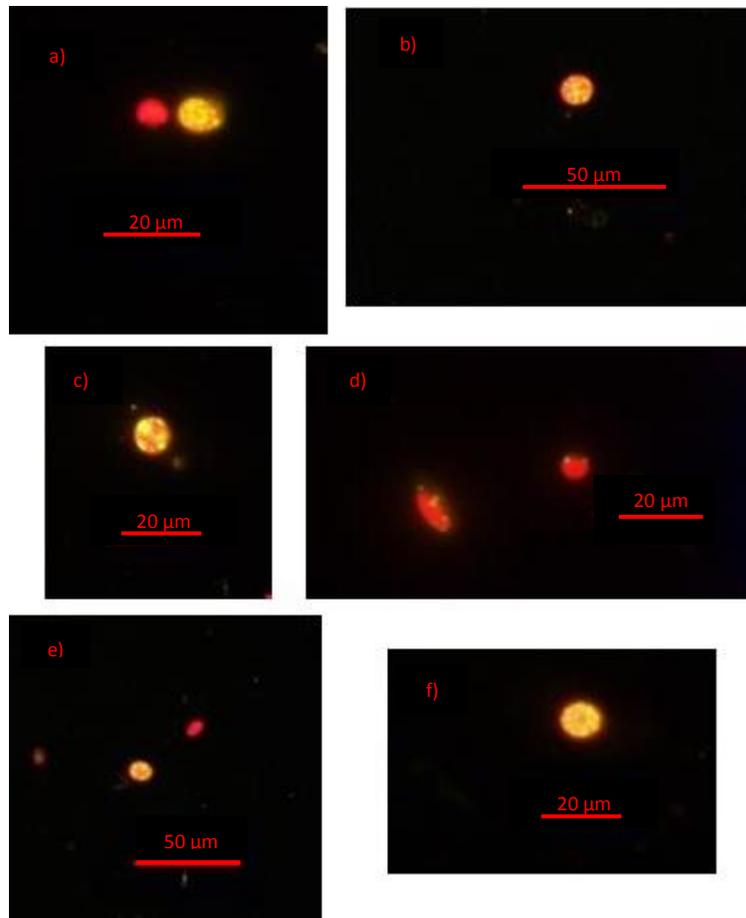


Figura 41 Tinción con rojo Nilo para reactor con purines de cerdo. Fotografías tomadas con microscopio de fluorescencia, excitación con láser entre 488-547 nm y emisión entre 560-600 nm. Fotografías a), b), c), d) y f) fueron tomadas a 40X, fotografía e) a 20X.

6.4. Remoción de nutrientes y materia orgánica con sistemas alga-bacteria contra sistemas por lodos activados operados por lotes

Por facilidad para presentar los resultados, en la Tabla 15 se encuentran identificados los reactores que serán comparados en éste experimento, los reactores sin luz (SL) son la representación de los reactores que trabajaron como lodos activados y son comparados contra los reactores con luz (CL) que son los sistemas alga-bacteria ya que las microalgas se desarrollaron en éstos reactores de una manera natural como se explicó en el experimento anterior. Los sustratos utilizados en éste experimento fueron presentados anteriormente en la Tabla 13.

Tabla 15 Identificación reactores con y sin luz

Reactor número	ARM- SL	ARM - CL	PC - SL	PC- CL	DA - SL	DA - CL
Sustrato utilizado	ARM: Agua Residual Municipal	ARM: Agua Residual Municipal	PC: Purines de cerdo	PC: Purines de cerdo	DA: Digestato Anaerobio	DA: Digestato Anaerobio
Iluminación	SL: Sin Luz	CL: Con Luz	SL: Sin Luz	CL: Con Luz	SL: Sin Luz	CL: Con Luz
Tiempo de reacción	1 día	4 días	1 día	4 días	1 día	4 día

6.4.1. Remoción de materia orgánica

Las remociones más altas de DQO fueron observadas para ARM y PC (Figura 42). Es interesante notar que los mayores porcentajes de remoción fueron alcanzados por los reactores que desarrollaron las microalgas y que no fueron aireados mecánicamente: $75 \% \pm 3.2$, $84 \% \pm 2.1$ y $66 \% \pm 8.9$ para ARM, PC y DA respectivamente. Esto indica que las pocas microalgas presentes en los sustratos pueden crecer y desarrollarse rápidamente proporcionando el oxígeno disuelto (durante el día) suficiente para que las bacterias heterótrofas puedan llevar a cabo la eliminación de la materia orgánica eficientemente. Esto prueba que los sistemas alga-bacteria no sólo no se tienen que inocular sino que no se tienen que airear para lograr remociones iguales o mejores que aquellas obtenidas por los SBR convencionales. Es bueno recordar que con estos sistemas no es necesario airear, pero los tiempos de reacción son 4 y hasta 10 veces mayores (Pires et al., 2013), es decir, requieren áreas mucho mayores. Como se mencionó anteriormente, en México el 31% de los tratamientos de aguas residuales instalados son operados por lagunas de estabilización lo que indica que el área podría no ser una limitante. Es importante anotar que el consumo de energía de los lodos activados se encuentra alrededor de 0.5 kW/h de energía eléctrica por kg de DQO removida y que si se operan adecuadamente y se utiliza la biomasa para generación de energía, estos sistemas podrían no consumir, sino generar esa misma cantidad de energía (Amin, 2009).

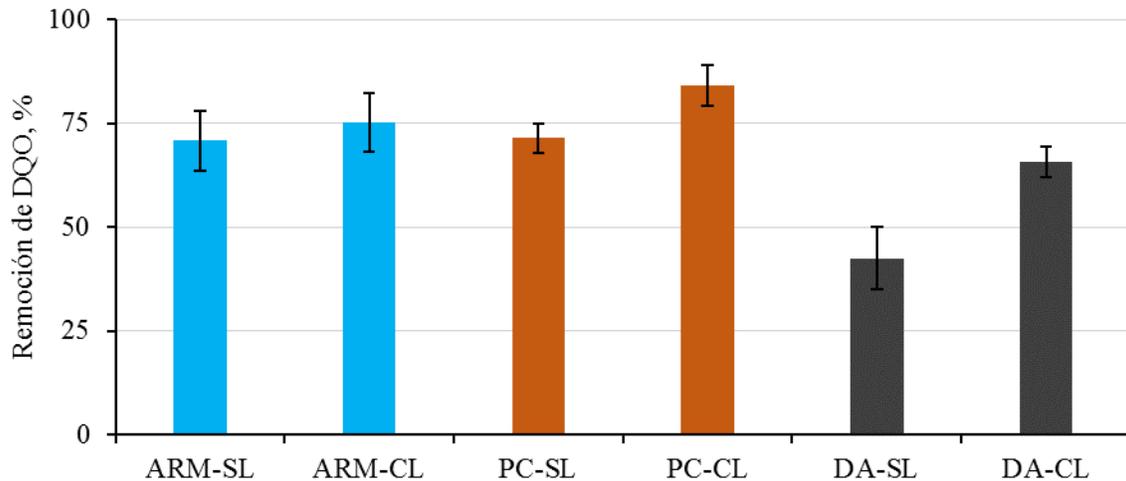


Figura 42 Porcentajes de remoción de DQO (media \pm SD) para los reactores con y sin luz.

6.4.2. Remoción de fósforo

En cuanto a la remoción de $P-PO_4^{3-}$, los mayores porcentajes de remoción se obtuvieron por los reactores que desarrollaron microalgas en la biomasa. Sin embargo, para este caso, la eliminación de fósforo fue menor para DA (29 y 30 %) que la obtenida para ARM y PC ($71 \pm 9,5$ y $76 \pm 4,2$, % respectivamente) (Figura 43). El pH se mantuvo en 8.0 y 8.5 para todos los reactores lo que indica que la remoción no se le puede atribuir a efectos de precipitación. En este caso, es más probable pensar que la eliminación se relaciona con la asimilación del fósforo al interior de la biomasa. Para sistemas por lodos activados, la relación recomendada es de 100:5:1 C:N:P (Tchobanoglous et al., 2002), y para sistemas microalga bacteria se tienen diferentes relaciones dependiendo de las especies de microalgas que se desarrollen al interior de los reactores. Como se explicó para el ensayo anterior, Lavoie y de la Noue (1985) definen una relación ideal alrededor de 30 para la especie *Scenedesmus*. En nuestro caso, los reactores sin luz que trabajaron con PC y DA alcanzaron productividades mucho mayores (Figura 44) a las presentadas con ARM como sustrato. Por ésta razón, el reactor ARM-SL tuvo una remoción de fósforo tan baja. Si se comparan las remociones de fosfatos de los reactores con luz (alga-bacteria) y los reactores sin luz (lodos activados) únicamente para PC y DA, se puede notar que las diferencias son muy pequeñas porque los reactores por lodos activados generan una cantidad de biomasa mucho mayor (casi 4 veces mayor) que los sistemas alga-bacteria que remueven esa misma cantidad de fosforo produciendo una cantidad de biomasa mucho menor.

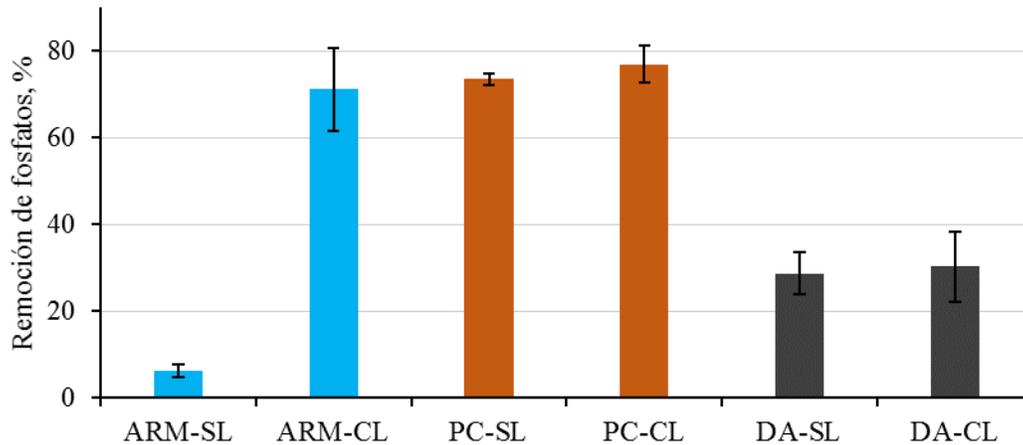


Figura 43 Remoción de $P-PO_4^{3-}$ (media \pm SD) de reactores con y sin luz

6.4.3. Productividad de biomasa

El crecimiento de la biomasa (medida como SSV) fue mayor para los reactores que no fueron iluminados y que fueron aireados mecánicamente (reactores SL) (Figura 44). Este comportamiento es normal en sistemas por lodos activados y por esta razón también se fijó un tiempo de reacción de un día, a diferencia de los sistemas alga-bacteria que tienen un tiempo de duplicación mayor y por tal un tiempo de reacción mayor (96 horas). Esto tiene ventajas y desventajas a la hora de escalar el sistema; la primera es que se producirá menor cantidad de lodos en estos sistemas por la misma razón, reduciendo el costo de su tratamiento y disposición final y la segunda es evidentemente el área que se necesita para los sistemas alga-bacteria es mucho mayor para lograr tiempos de reacción tan altos. Además de esto, la biomasa microalgal tiene grandes ventajas en comparación con la biomasa proveniente de un sistema netamente bacteriano ya que teóricamente es posible producir mayor cantidad de metano por los lípidos que acumulan éstas al interior de las células, como se explicó anteriormente. Si compramos nuestro sistema con Su *et al* (2011b), que también trabajó con un sistema microalga-bacteria tomando el inóculo del sedimentador final de una planta de tratamiento de aguas residuales, la productividad alcanzada por el sistema a los 4 y a las 8 días fue de 800 y 1000 mg SST/L/d. Autores como Hongyang *et al* (2011) que utilizaron cepas de microalgas como inóculo (*Chlorella pyrenoidosa*) alcanzaron productividades sólo de 380 mg/L/d.

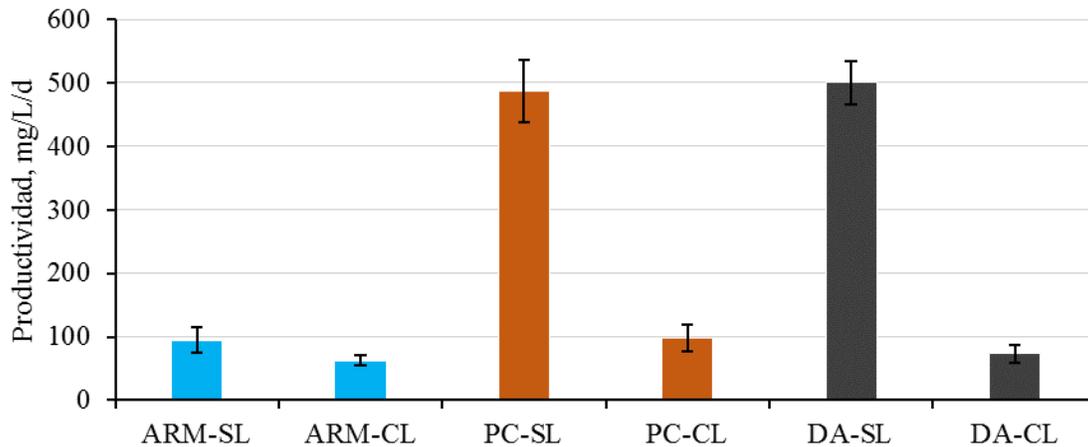


Figura 44 Productividad de biomasa (media \pm SD) de los reactores con y sin luz

6.4.4. Remoción de nitrógeno

La gran diferencia entre los sistemas por lodos activados contra los sistemas alga-bacteria radica en los mecanismos de remoción de amonio de las aguas residuales, para los sistemas por lodos activados, la mayor parte del amonio es nitrificado mientras que los sistemas con microalgas (con luz) asimilan la mayor parte (Figura 45). La remoción de nitrógeno total fue tan alta como 45 ± 9.8 % (Figura 46) y se observó una mayor remoción de nitrógeno total en los sistemas que desarrollaron microalgas y esto es conveniente por lo que se comentó anteriormente ya que cuando el nitrógeno es asimilado al interior de la biomasa, el nitrógeno puede ser removido del agua residual por medios de separación a diferencia de los reactores que nitrificaron la biomasa y éstos siguen en el agua a pesar de separar la biomasa.

La nitrificación en estos sistemas no se esperaba, pues se ha reportado que las bacterias nitrificantes se inhiben en presencia de materia orgánica y estos sistemas eran alimentados diariamente con cargas orgánicas considerables.

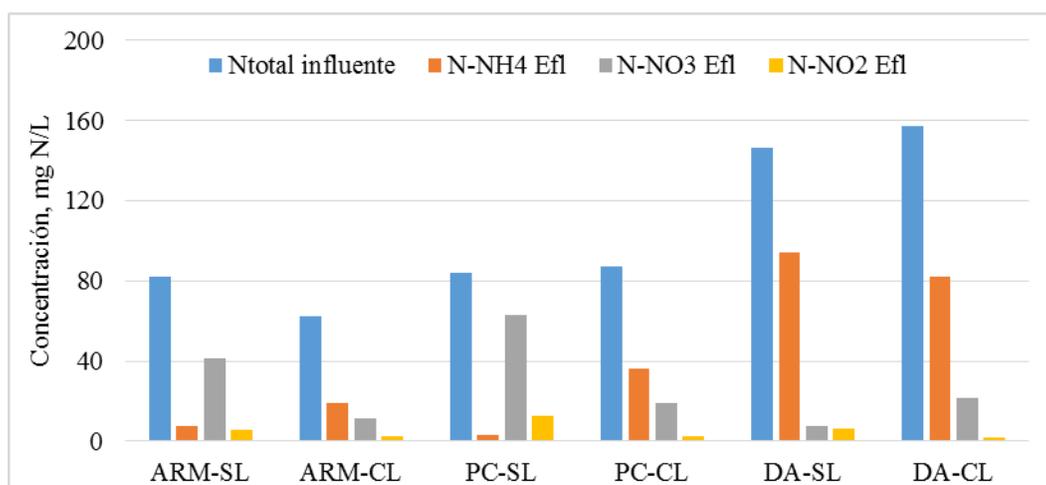


Figura 45 Valores promedios para nitrógeno total en el influente y las diferentes formas de nitrógeno en el efluente

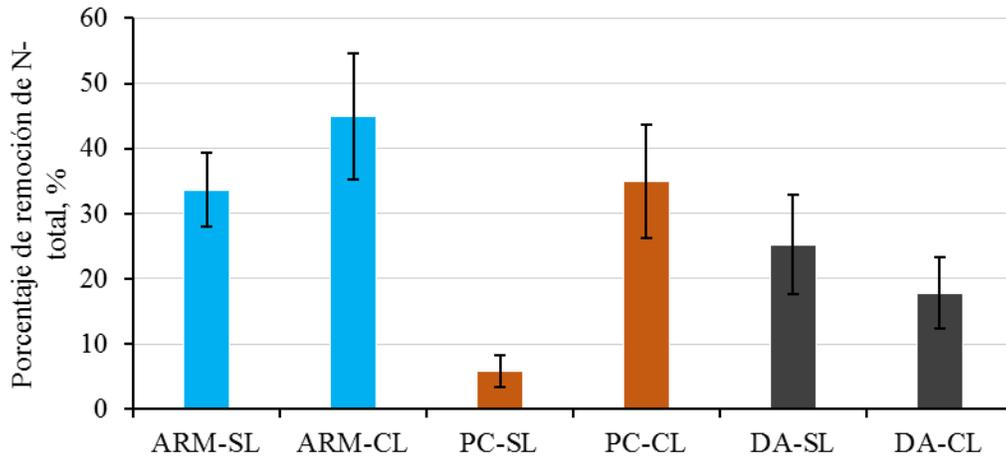


Figura 46 Remoción de nitrógeno total (media \pm SD) para los reactores con y sin luz.

6.4.5. Sedimentación de la biomasa

La Figura 47 muestra la configuración de los reactores SL que durante los seis ciclos de operación tuvieron constante agitación y aireación además de estar cubiertos con papel aluminio para evitar la entrada de la luz a los reactores.

Como se explicó anteriormente, estos reactores tenían una capacidad de sedimentar mucho mayor (80-150 mL/L en 30 minutos) que los reactores que se trabajaron anteriormente con microalgas con los cuales siempre era necesaria la centrifugación. En la Figura 49, Figura 48 y Figura 50 se pretende mostrar cómo a pesar de haber sido inoculados todos con lodo aerobio proveniente de una planta de tratamiento, se presentaron diferencias por los sustratos alimentados al sistema. Por ejemplo en la Figura 50 y en la Figura 51 se observa cómo el reactor PC-SL presenta un lodo esponjado comparado con el ARM-SL por ejemplo que tiene un lodo más compacto y un sedimentado más claro. El reactor DA-SL por el contrario es el clarificado más oscuro de los tres reactores y también es debido al sustrato utilizado ya que el digestato es de color bastante oscuro.

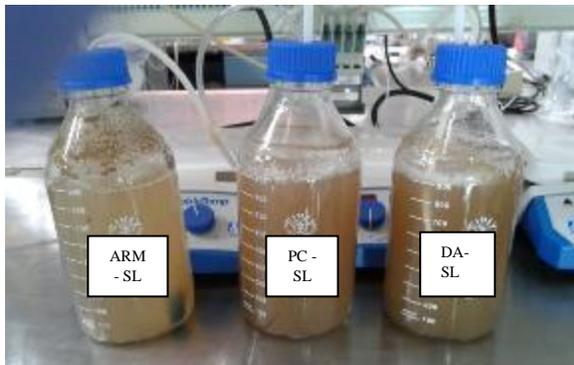


Figura 47 Reactores con aireación y agitación constante



Figura 48 Sedimentación reactor DA-SL



Figura 50 Sedimentación reactor PC-SL



Figura 49 Sedimentación reactor ARM-SL

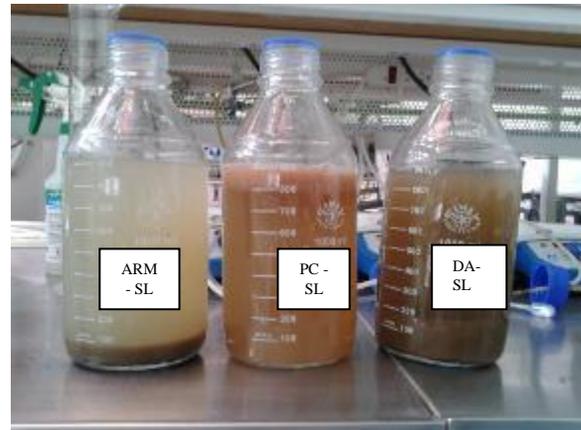


Figura 51 Sedimentación de los reactores último ciclo.

Lo más importante de éste experimento es notar que los sistemas microalga-bacteria pueden remover eficientemente la materia orgánica de tres diferentes sustratos y las remociones son comparables con los sistemas por lodos activados. Actualmente el cuello de botella de los sistemas microalga-bacteria y una de las grandes desventajas de éstos en comparación con los lodos activados es la capacidad de sedimentación aunque se han adelantado varios estudios donde se somete la biomasa a flotación o se aglomeran con polímeros naturales para la facilidad en su precipitación.

6.5. Evaluación del efecto del tipo de inóculo en la remoción de nutrientes y materia orgánica así como la producción de biomasa y producción de lípidos de los sistemas microalga-bacteria.

En la Tabla 16 se encuentran los datos de las caracterizaciones de los purines de cerdo 2 diluidos (PC 2) utilizados para este ensayo.

Tabla 16 Caracterización de los purines de cerdo (PC 2) diluidas utilizados para éste ensayo

Parámetro (unidades)	Purines de cerdo diluidos
Demanda Química de Oxígeno (mg DQO/L)	950.2 ± 98.3
Demanda Química de Oxígeno soluble (DQOs*/L)	899.0 ± 142.8
Sólidos Suspendedos Totales (mg SST/L)	67 ± 24
Sólidos Suspendedos Volátiles (mg SSV/L)	54 ± 11
Nitrógeno Total Kjeldahl (TKN) (mg N/L)	143.8 ± 10.3
Nitrógeno Orgánico (Norg) (mg N_{org}/L)	81.9 ± 10.4
Nitrógeno Amoniacal (mg N-NH₄⁺/L)*	77.9 ± 0.4
Nitritos (mg N-NO₃⁻/L)**	1.6 ± 0.4
Nitratos (mg N-NO₂⁻/L)**	0.4 ± 0.1
Fosfatos (mgPO₄³⁻-P/L)*	15.8 ± 1.0

*Filtrados con un filtro de fibra de vidrio de 1 µm. ** Filtrados con un filtro de celulosa de 0.45 µm.

La identificación de cada reactor con base al tipo de inóculo y de sustrato se presenta a continuación en la Tabla 17.

Tabla 17 Identificación de los reactores con diferentes tipos de inóculo

Identificación de los reactores	L.A.	L.M-B
Tipo de inoculación	Lodos Activados	Lodo maduro Microalga-bacteria

6.5.1. Dinámicas poblacionales de la biomasa microalgal

Como ha sido ya analizado en ensayos anteriores, para el final del segundo ciclo (9-10 días), los reactores que fueron inoculados únicamente con L.A, desarrollaron diferentes especies de microalgas. Lo que es interesante resaltar de este ensayo es que las microalgas que se desarrollaron naturalmente en los reactores con L.A (especies presentes en el sustrato) parecieran ser también las mismas que se desarrollaron en los reactores que habían sido inoculados con el L.M-B. Es decir, con el tiempo, las especies de microalgas presentes en L.M-B (filamentosas y diatomeas en su mayoría) fueron muriendo y las especies que fueron quedando coincidían con las presentes en los reactores con L.A (Figura 52). Este comportamiento puede llevar a concluir que el inóculo utilizado para arrancar estos sistemas no necesariamente se mantiene ni afecta la población que finalmente se va a desarrollar en el sistema bajo las condiciones establecidas. Ésta selección natural de diferentes especies de microalgas está basada en el sustrato, la diversidad de microalgas y la intensidad lumínica como ha sido analizado por diferentes autores (Assemany et al., 2015, 2014; Cho et al., 2015) y han concluido que esas variables influyen fuertemente la diversidad de las microalgas.

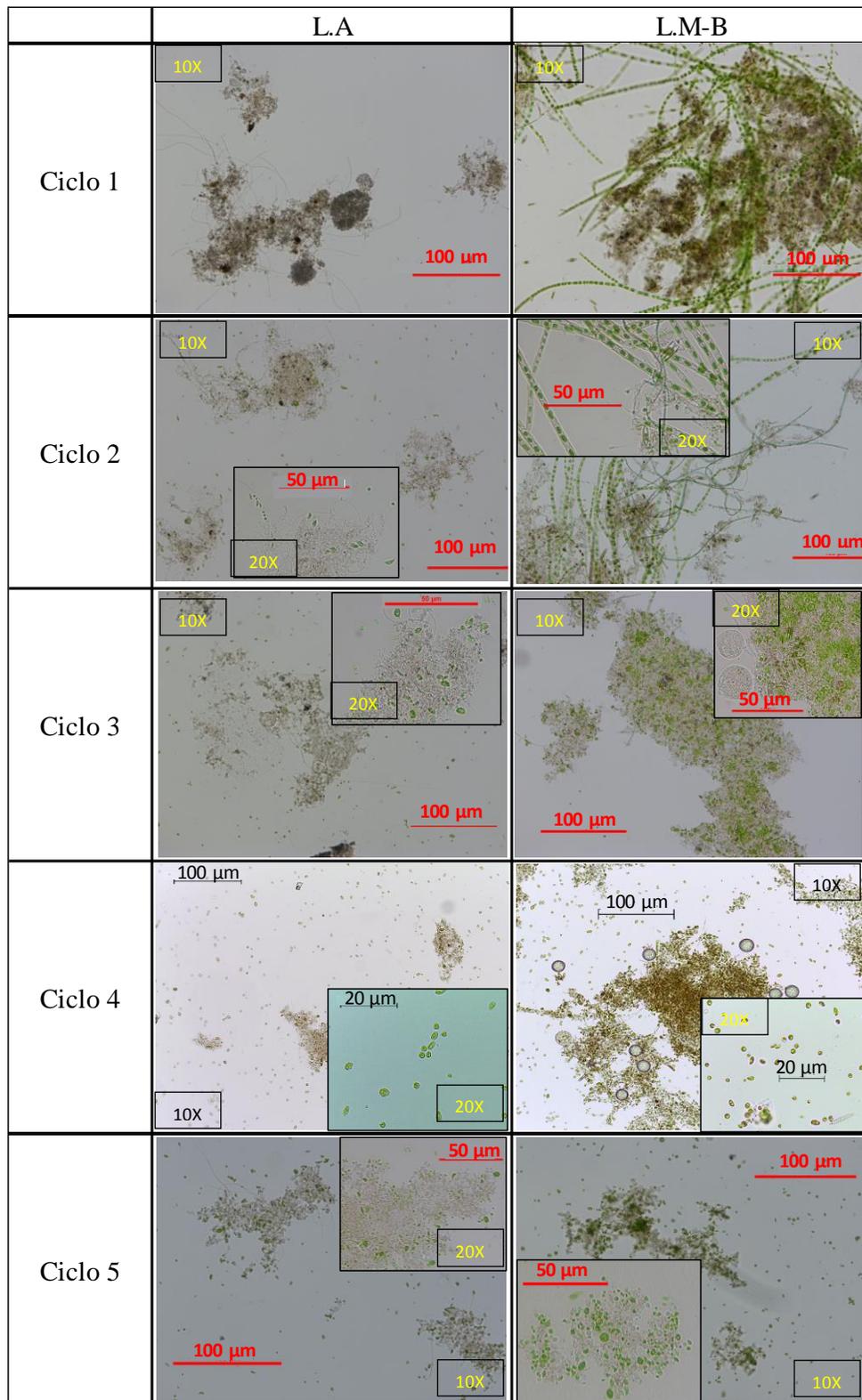


Figura 52 Cambios en la biomasa de los reactores con inóculo maduro y con lodos activados. Fotografías tomadas en campo claro: Aumentos señalados en cada fotografía.

6.5.2. Control de variables físicas

Los reactores que fueron inoculados con L.M-B se demoraron un poco más en aumentar los valores de OD durante los primeros dos ciclos. Esto se puede explicar porque las microalgas presentes en ese lodo maduro (sobretudo diatomeas y microalgas filamentosas) no se aclimataron al nuevo sustrato tan rápido como los reactores con lodos activados donde, al final del primer ciclo, un incremento significativo (de 0.12 a 10.6 mg O₂/L) se observó y (como parte de la biomasa se mantenía dentro del reactor para comenzar el siguiente ciclo) para los siguientes ciclos, la oxigenación del sistema se alcanzó más rápido alcanzando valores tan altos como 20 mgO₂/L en la mayoría de los casos (Figura 53). Para los últimos dos ciclos, ambos sistemas siguieron el mismo patrón. Éste comportamiento (acompañado del monitoreo microbiológico) muestra una tendencia de ambos sistemas para alcanzar las mismas condiciones sin importar la inoculación. Las dinámicas de pH (Figura 54) muestran un pequeño incremento dos días después de comenzar cada ciclo. Ésta tendencia es normal cuando se cultivan microalgas gracias al desbalance en el equilibrio de carbono. Generalmente, los valores de pH varían entre 8 y 8.8 unidades. La temperatura de los reactores se mantuvo en 27±3°C.

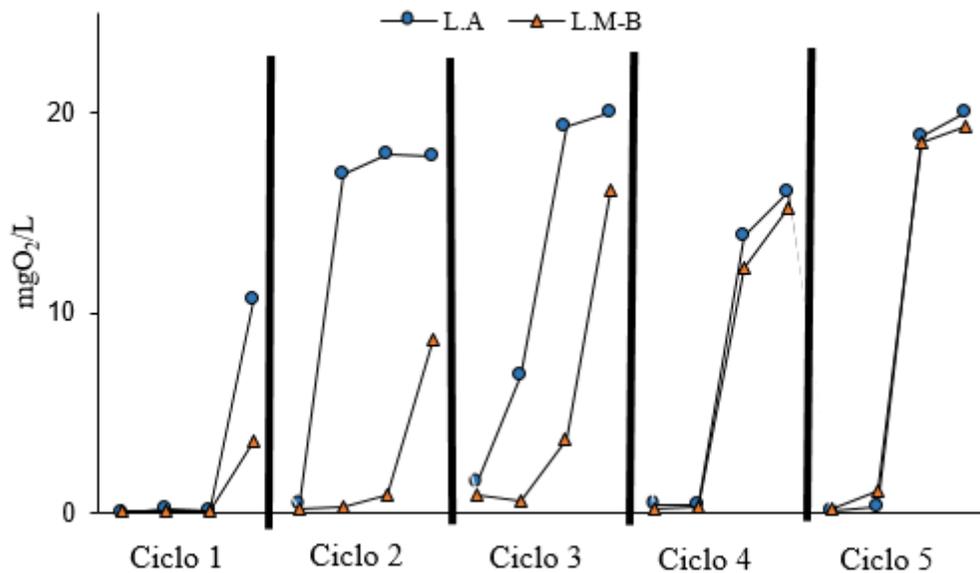


Figura 53 Dinámicas de OD de los reactores con diferentes tipos de inóculo durante todos los ciclos de operación

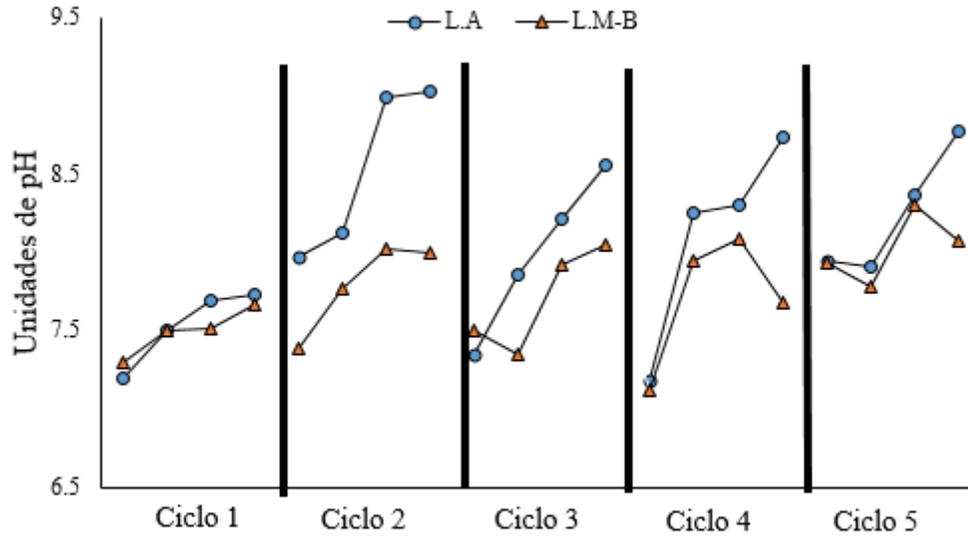


Figura 54 Dinámicas de pH de los reactores con diferentes tipos de inóculo durante todos los ciclos de operación

6.5.3. Remoción de materia orgánica

Las remociones de DQO fueron similares en ambos sistemas durante todos los ciclos de experimentación (Figura 55). A pesar de los bajos niveles de OD en el primer ciclo, las remociones para ambos fueron 79.7 ± 1.0 y 68.6 ± 2.5 % para L.A y L.M-B respectivamente. Esto se puede explicar porque las bacterias presentes en ambos inóculos comenzaron, como en los otros casos, un proceso anaerobio de la materia orgánica presente en los purines de cerdo. Después del primer ciclo, diferentes especies de microalgas se desarrollaron dentro de los reactores con L.A. y la oxigenación fotosintética del sistema fue suficiente para transformar el sistema a aerobio y remover exitosamente la materia orgánica de los purines de cerdo. De Godos et al (2009), utilizaron una laguna de alta tasa (HRAP) para tratar purines de cerdo diluidos con un tiempo de residencia hidráulico de 10 días y la remoción de DQO reportada fue de 76 ± 11 %, lo que es comparable con las remociones obtenidas en el presente trabajo. Otros autores (Baumgarten et al., 1999; Wang et al., 2010; Zhu et al., 2013) reportaron remociones de 65 al 82 % de DQO usando diferentes cepas de microalgas. Éste puede ser otra razón para creer que no es necesario inocular con microalgas para arrancar y operar un sistema microalga-bacteria y que remueve eficientemente la DQO.

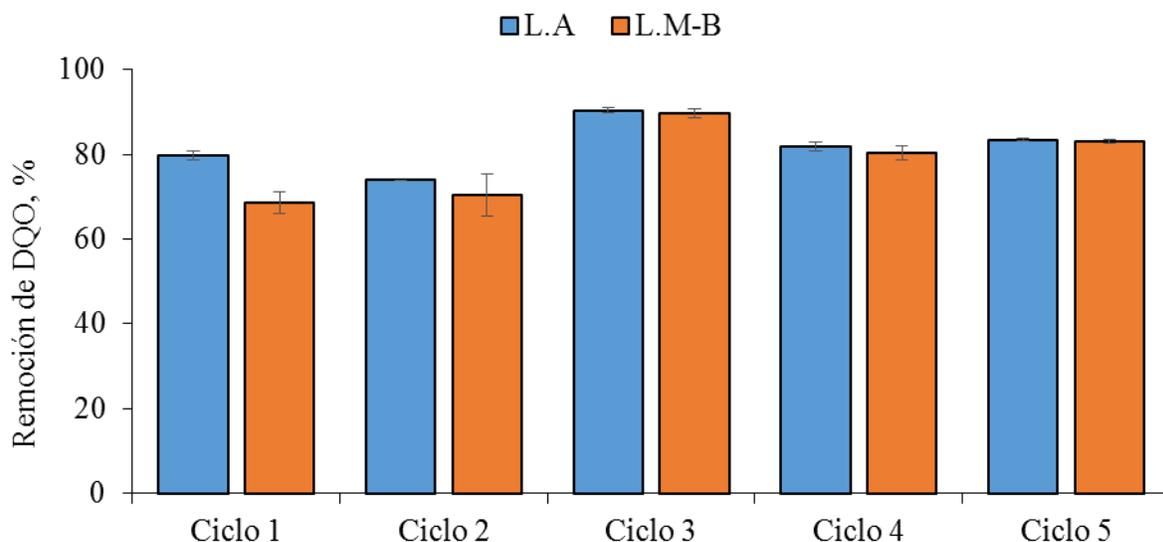


Figura 55 Remoción de DQO de reactores con diferentes tipos de inóculo

6.5.4. Remoción de nitrógeno y fósforo

Las dinámicas de remoción de amonio y fosfatos (Figura 56 y Figura 57) fueron bastante similares para cada sistema. En el primer ciclo, el sistema L.A no removió ninguno de los dos, por el contrario, los produjeron. Esto es un comportamiento normal y se ha observado a lo largo de los experimentos realizados en este trabajo y se explica por los bajos niveles de oxígeno disuelto y que durante el primer ciclo (4 días) lo que ocurrió fue nuevamente un proceso anaerobio y el fósforo y nitrógeno orgánico presente en el sustrato fue liberado al medio como inorgánicos (fosfatos y amonio) (Tchobanoglous et al., 2002). Después del primer ciclo, los sistemas L.M-B comenzaron a remover nutrientes lentamente, 3 ± 5.32 y 17.3 ± 10.3 % de N-NH_4^+ y 20.1 ± 3.5 y 27.6 ± 8.3 % de P-PO_4^{3-} para el 2^{do} y 3^{er} ciclo respectivamente. Como el primer ciclo de los reactores duró 8 días, los reactores con L.A alcanzaron la máxima remoción de nutrientes en este ciclo específicamente porque las microalgas comenzaron a desarrollarse a partir del tercer día. Se cree que esto no ocurrió para los sistemas inoculados con el inóculo de microalgas y bacterias maduro ya que las microalgas presentes en éste inóculo no pudieron aclimatarse al nuevo sustrato y lo que ocurrió fue un proceso anaerobio que también se ve representada en la baja productividad de biomasa.

Las remociones de ambos N y P fueron bajas el segundo ciclo que era de esperarse por la disminución en el tiempo de reacción (de 8 a 4 días), para el tercer ciclo se ve una diferencia marcada en cuanto a la remoción de ambos N y P ya que para este ciclo el OD del sistema L.A alcanzaba valores máximos (>20 mgO_2/L) mientras que el sistema L.M-B estaba siendo predominado por esas mismas especies de microalgas y las que estaban presentes en el inóculo eran casi insipientes y la mayoría se encontraban muertas y desintegradas (para el caso de las

microalgas filamentosas). Para el 4^{to} y 5^{to} ciclo (cuando ambos sistemas eran prácticamente iguales), removieron casi la misma cantidad de nutrientes.

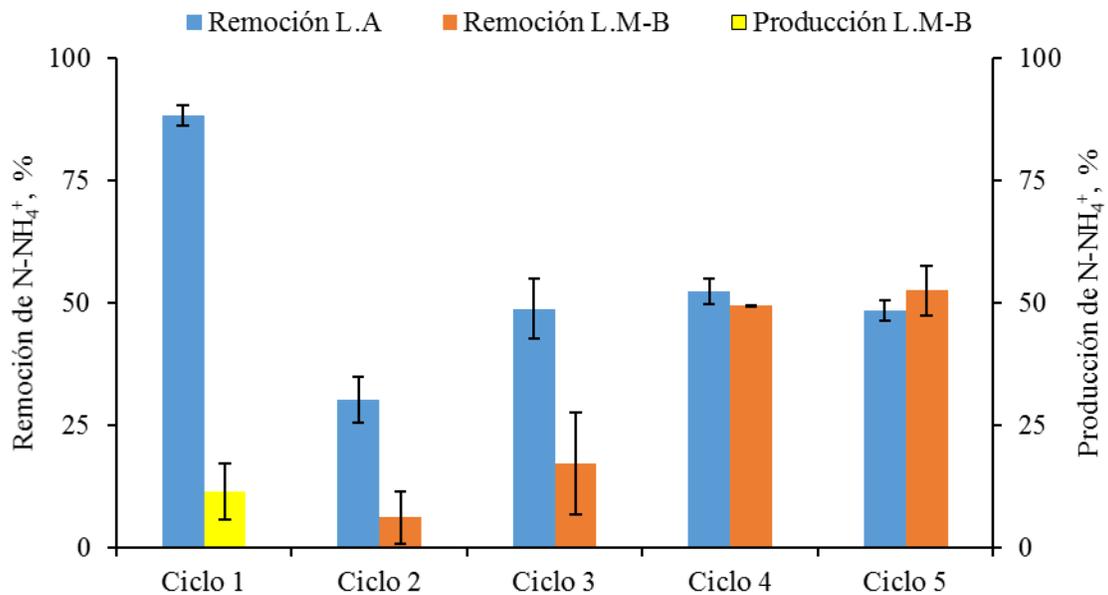


Figura 56 Remoción y producción de nitrógeno amoniacal durante todos los ciclos

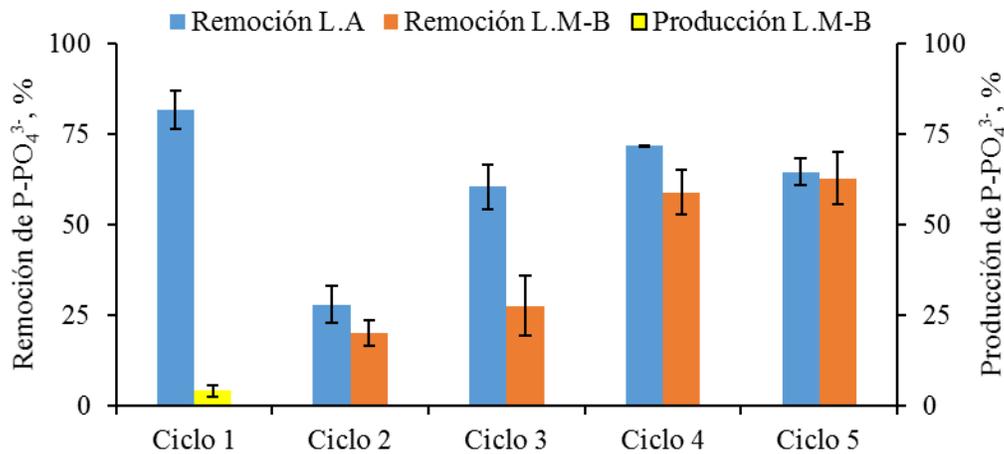


Figura 57 Remoción y producción de fosfatos durante todos los ciclos

6.5.5. Dinámicas de remoción de nitrógeno

Para comprender un poco mejor los porcentajes de remoción de nitrógeno amoniacal presentadas anteriormente (Figura 56), las diferentes especies de nitrógeno en el influente y en el efluente de los reactores son analizadas. Como el pH no fue superior a 8.8 unidades, la volatilización del amonio no se tiene en cuenta como una vía de remoción. En cuanto a la nitrificación, la

concentración de nitritos y nitratos tanto en la entrada como en la salida de los reactores fue demasiado baja lo que indica que no se llevaron a cabo procesos de nitrificación. Por el contrario, se observó que casi todo el nitrógeno amoniacal en la entrada era asimilado por la biomasa. Si se analizan las dinámicas de nitrógeno orgánico (N_{org}) e inorgánico (Figura 58) se observa que como se había concluido anteriormente, en el primer ciclo, el sistema L.A asimiló casi todo el $N-NH_4^+$ presente en el influente (y el N_{org}) incrementó casi esa misma cantidad; por el contrario el sistema L.M-B (donde se sospechaba de un sistema anaerobio) el $N-NH_4^+$ incrementó la misma cantidad que el N_{org} disminuyó. Si se observa el segundo ciclo, el cambio es casi imperceptible, y por tal, la remoción es muy baja para ambos.

Para los dos últimos ciclos, ambos sistemas removieron cerca del 50 % del $N-NH_4^+$ presente en el sustrato por vía asimilatoria ya que ambos comportamientos son casi iguales: El amonio decrece en la misma proporción que crece el nitrógeno orgánico.

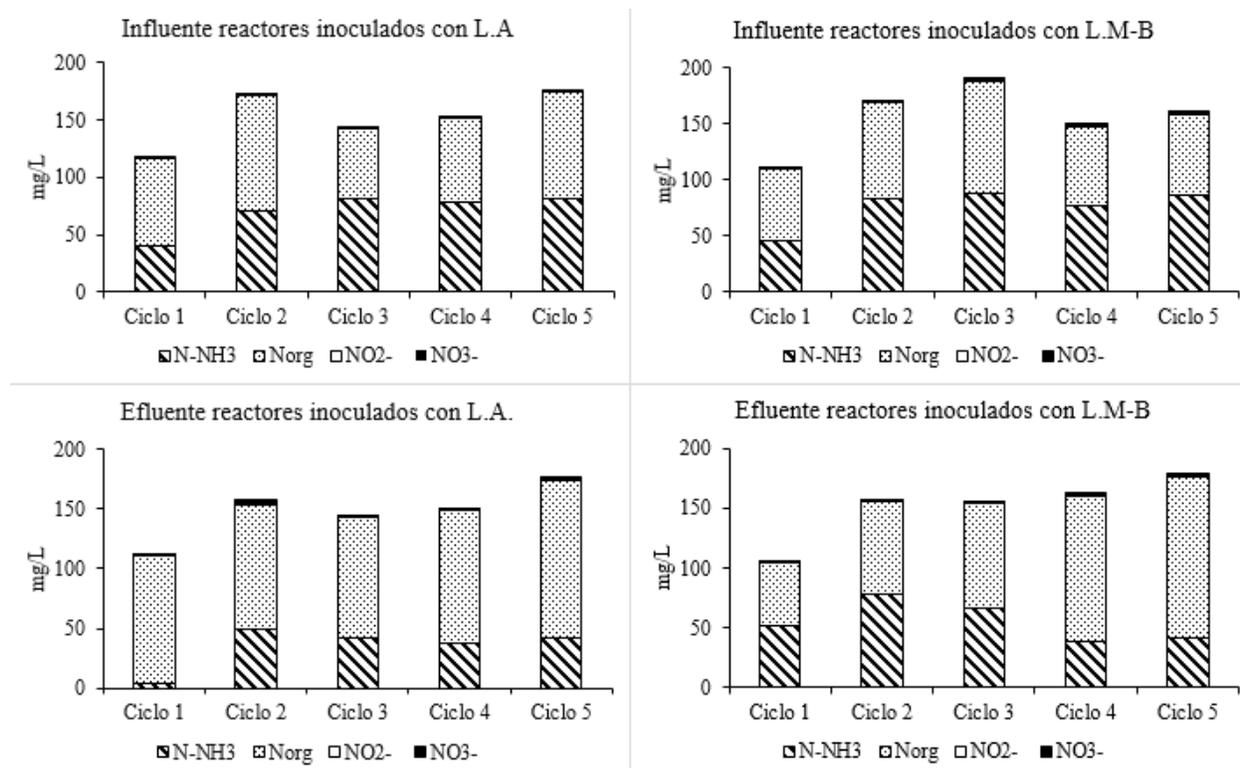


Figura 58 Mecanismos de remoción de nitrógeno amoniacal de los reactores con diferentes tipos de inóculo

6.5.6. Productividad de biomasa y clorofila

La productividad de biomasa de los sistemas L.A. tuvo un crecimiento constante, lo que es normal ya que la biomasa se aclimataba al nuevo sustrato de purines de cerdo y el crecimiento de la biomasa podría alcanzar su estado estacionario después de dos o tres meses de operación. Lo que es interesante notar aquí es que para el sistema L.M-B, la productividad de biomasa fue baja y hasta negativa (menor cantidad de biomasa al final que al principio del ciclo) para el primer y

segundo ciclo (gracias a los procesos anaerobios que se llevaban a cabo al interior de esos reactores). Ésta gráfica muestra una vez más que al final del tercer ciclo y para los dos ciclos siguientes (cuando el sistema tenía casi el mismo tipo de biomasa) el comportamiento de ambos sistemas fue muy similar. El sistema L.A terminó el primer ciclo con una concentración baja de clorofila comparada con el sistema L.M-B, pero después del segundo ciclo, la cantidad de clorofila en ambos sistemas estaban cerca y terminaron el experimento con concentraciones cerca de 800 μg clorofilaA/L. Esta es otra prueba de que el sistema L.M-B desarrolló las mismas especies de microalgas que los sistemas L.A y ambos sistemas terminaron el experimento siendo prácticamente duplicados.

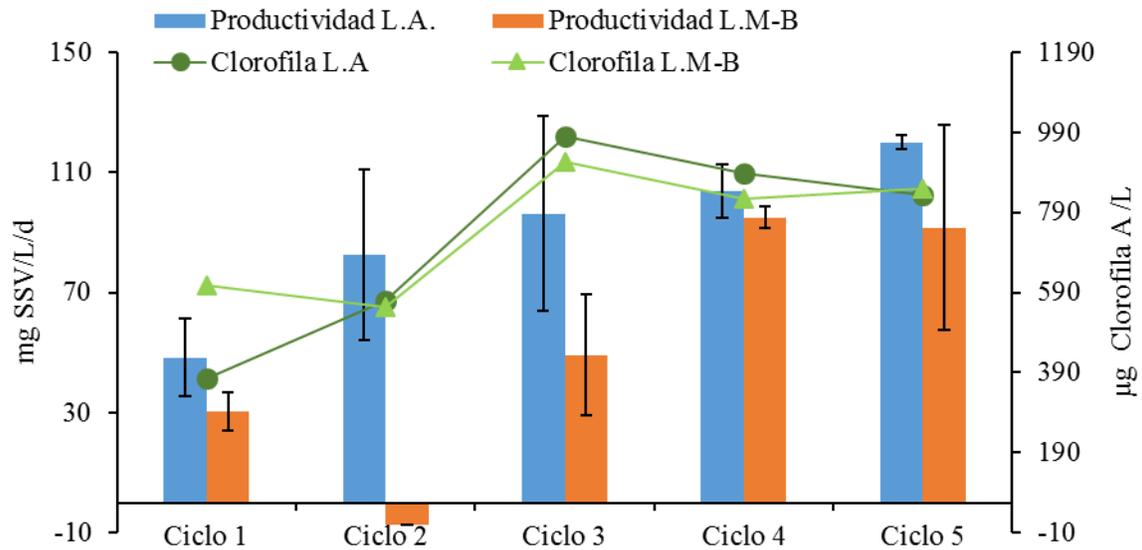


Figura 59 Productividad de biomasa y dinámicas de clorofila para los reactores con diferentes tipos de inóculo

6.5.7. Concentración de lípidos en la biomasa

Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo y a lo largo del mismo, los sistemas alga-bacteria no sólo tienen la ventaja del ahorro energético (no se requiere aireación mecánica) sino que también la biomasa que se produce en éstos sistemas tiene un valor agregado ya que teóricamente pueden acumular mayor cantidad de lípidos que los lodos activados (Amin, 2009; Borowitzka and Moheimani, 2012; Chisti, 2007; Sacristán de Alva et al., 2013). Los reactores con lodos activados comenzaron con una concentración de 4.15% y terminaron el experimento con una concentración de 13.12 % cuando ya la biomasa estaba conformada por ambos grupos de microorganismos: microalgas y microorganismos heterótrofos. Algunos estudios reportan concentraciones de lípidos de hasta el 30 %, pero estas concentraciones se logran cuando se somete al sistema a diferentes condiciones de estrés como luz, limitación por nutrientes, cambios de temperaturas, etc.

7. CONCLUSIONES

- Fue posible remover entre el 94 y el 85 % de materia orgánica y nutrientes respectivamente de aguas residuales municipales, 75 y 95 % de purines de cerdo y 55 y 70 % de digestato anaerobio con sistemas alga-bacteria.
- No es necesario inocular con microalgas un sistema alga-bacteria para remover eficientemente materia orgánica y nutrientes de diferentes residuos líquidos ya que la presencia de luz y nutrientes en el medio es suficiente para que las microalgas presentes en los sustratos encuentren las condiciones ideales y se reproduzcan al interior de los reactores.
- Se alcanzaron porcentajes de remoción de materia orgánica similares con sistemas microalga-bacteria y con sistemas por lodos activados (85 – 90 %) para purines de cerdo y agua residual municipal. Sin embargo, al tener un tiempo de retención hidráulica mayor, los sistemas alga.bacteria requieren más área para su construcción.
- En cuanto a los mecanismos de remoción de nitrógeno, los sistemas microalga-bacteria remueven nitrógeno amoniacal principalmente por mecanismos de asimilación (almacenado al interior de la biomasa) removiendo el nitrógeno de la fase líquida, mientras que los lodos activados remueven casi el 50 % de nitrógeno por medios de nitrificación permaneciendo en los efluentes líquidos y pudiendo causar problemas de contaminación aguas abajo de la descarga de estas aguas.
- La biomasa generada en un sistema microalga-bacteria para tratamiento de aguas residuales no dependerá del inóculo de microalgas utilizado, el sistema convergerá en una población específica de microalgas y bacterias que se adaptan a las condiciones ambientales y tipo de sustrato suministrado.
- Tras observaciones al microscopio realizando tinción con rojo nilo se observó que las microalgas presentes en los reactores alimentados con purines de cerdo presentaban una mayor cantidad de lípidos al interior de las células. Después de realizarle un análisis de contenido de lípidos a la biomasa seca generada en un sistema alimentado con purines de cerdo diluidos, el porcentaje de lípidos fue del 13.12 % a diferencia del inóculo inicial (lodos activados) que contenía 4.15 %.

8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Durante el período de experimentación se encontraron algunos puntos considerados importantes para tener en cuenta para futuros ensayos con sistemas microalga-bacteria:

- Llevar a cabo estudios de biología molecular de todos los sistemas para tener certeza de las especies que se tienen en los reactores así como un seguimiento periódico para conocer los cambios reales en la biomasa.
- Se recomienda medir en línea los nitritos y nitratos con una sonda para mayor precisión en la medición de la concentración de estos iones disueltos en el tiempo y lograr hacer un análisis más profundo de los mecanismos de remoción de nitrógeno.
- Al llevar a cabo los estudios, se debe cuidar que la agitación sea suficiente para mantener la biomasa alga-bacteria en suspensión. De acuerdo a los experimentos realizados, no se recomienda el uso de agitadores orbitales cuando se tienen volúmenes mayores a 250 mL ya que los flóculos del lodo activado por ejemplo tienden a permanecer en el fondo del reactor evitando una mezcla uniforme.
- En lo posible, utilizar siempre cultivos de microalgas frescos. Se observó que los resultados son diferentes cuando se utilizan inóculos que han sido almacenados por más de dos semanas en un cuarto a 4°C. En caso de utilizar estos inóculos, se recomienda un tiempo de re-activación del mismo no menor a una semana.
- El paso a seguir en esta investigación es llevar el proceso a escala piloto en condiciones ambientales reales para evaluar su comportamiento y para posteriormente diseñar una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales,

9. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS

- Artículo 2015 en prensa Water Science and Technology. DOI: 10.2166/wst.2015.544. *“Organic matter and nutrients removal from municipal, piggery and digestate wastewaters using a microalgae-bacteria system”* (ANEXO 4).
- Ponencia oral en el XXXIV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Monterrey, México, con el trabajo: *“Remoción de nitrógeno, fosforo y materia orgánica en aguas residuales municipales con microalgas y bacterias”*.
- Ponencia oral en el 2^{do} encuentro de jóvenes investigadores del estado de Querétaro, Querétaro, México, con el trabajo: *“Remoción de nitrógeno, fosforo y materia orgánica en aguas residuales municipales con microalgas y bacterias”*.
- Ponencia oral en 4th IWA Mexico Young Water Profesional Conference 2015, Guanajuato, México, con el trabajo: *“Organic matter and nutrients removal from municipal, piggery and digestate wastewaters using a microalgae-bacteria system”*.
- Exposición de poster en IWA Water & Industry Conference 2015, Västerås, Suecia, con el trabajo: *“Organic matter and nutrients removal from municipal, piggery and digestate wastewaters using a microalgae-bacteria system”*
- Ponencia oral en IV SOLABIAA Latin American Congress, Florianópolis, Brazil, con el trabajo: *“Effect of the inoculation in the organic matter and nutrients removal from a piggery wastewater using a microalgae-bacteria system”*.

10. REFERENCIAS

- Aitchison, P.A., Butt, V.S., 1973. The Relation between the Synthesis of Inorganic Polyphosphate and Phosphate Uptake by *Chlorella vulgaris*. *J. Exp. Bot.* 24, 497–510. doi:10.1093/jxb/24.3.497
- Amin, S., 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Convers. Manag.* 50, 1834–1840. doi:10.1016/j.enconman.2009.03.001
- APHA, A.P.H.A., AWWA, A.W.W.A., WPCF, W.E.F., 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22 edition. ed. American Water Works Association, Washington, DC.
- Aslan, S., Kapdan, I.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol. Eng.* 28, 64–70. doi:10.1016/j.ecoleng.2006.04.003
- Assemany, P.P., Calijuri, M.L., Couto, E. de A. do, de Souza, M.H.B., Silva, N.C., Santiago, A. da F., Castro, J. de S., 2015. Algae/bacteria consortium in high rate ponds: Influence of solar radiation on the phytoplankton community. *Ecol. Eng.* 77, 154–162. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.01.026
- Assemany, P.P., Calijuri, M.L., Santiago, A. da F., Couto, E. de A. do, Leite, M. de O., Bermudez Sierra, J.J., 2014. Effect of solar radiation on the lipid characterization of biomass cultivated in high-rate algal ponds using domestic sewage. *Environ. Technol.* 35, 2296–2305. doi:10.1080/09593330.2014.902111
- Bahr, M., Stams, A.J.M., Rosa, F.D. la, García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2011. Assessing the influence of the carbon oxidation-reduction state on organic pollutant biodegradation in algal–bacterial photobioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1527–1536. doi:10.1007/s00253-011-3204-8
- Baumgarten, E., Nagel, M., Tischner, R., 1999. Reduction of the nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 281–284. doi:10.1007/s002530051522
- Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R., 2012. *Algae for Biofuels and Energy*. Springer Science & Business Media.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Buitrón, G., Pérez, J., 2011. Producción de electricidad en celdas de combustible microbianas utilizando agua residual: Efecto de la distancia entre electrodos. *Tip Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas* 14, 5–11.
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 19, 360–369. doi:10.1016/j.rser.2012.11.030
- Cañizares-Villanueva, R.O., Ramos, A., Corona, A.I., Monroy, O., de la Torre, M., Gomez-Lojero, C., Travieso, L., 1994. Phormidium treatment of anaerobically treated swine wastewater. *Water Res.* 28, 1891–1895. doi:10.1016/0043-1354(94)90164-3
- Cea-Barcia, G., Buitrón, G., Moreno, G., Kumar, G., 2014. A cost-effective strategy for the bio-prospecting of mixed microalgae with high carbohydrate content: Diversity fluctuations in different growth media. *Bioresour. Technol.* 163, 370–373. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.079
- Cheng, K.H., Miller, A.G., Colman, B., 1972. An investigation of glycolate excretion in two species of blue-green algae. *Planta* 103, 110–116. doi:10.1007/BF00387361
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Cho, D.-H., Ramanan, R., Heo, J., Kang, Z., Kim, B.-H., Oh, H.-M., Kim, H.-S., 2015. Organic carbon, influent microbial diversity and temperature strongly influence microalgal diversity and biomass in raceway ponds treating raw municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2015.02.013

- CONAGUA, 2013. Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación. Comisión Nacional del Agua, México.
- Eixler, S., Karsten, U., Selig, U., 2006. Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia* 45, 53–60. doi:10.2216/04-79.1
- Fernández Morales, F. de J., (first), 2004. Efecto de vertidos industriales sobre la eliminación biológica de nutrientes de aguas residuales urbanas. Universidad de la Castilla - La Mancha.
- Fogg, G.E., Thake, B., 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. Univ of Wisconsin Press.
- Franchino, M., Comino, E., Bona, F., Riggio, V.A., 2013. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere* 92, 738–744. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.023
- García, J., Mujeriego, R., Hernández-Mariné, M., 2000. High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *J. Appl. Phycol.* 12, 331–339. doi:10.1023/A:1008146421368
- Garzón-Zúñiga, M.A., Buelna, G., 2014. Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 30, 65–79.
- Godos, I. de, Blanco, S., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R., 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresour. Technol.* 100, 4332–4339. doi:10.1016/j.biortech.2009.04.016
- Godos, I. de, Vargas, V.A., Blanco, S., González, M.C.G., Soto, R., García-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R., 2010. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresour. Technol.* 101, 5150–5158. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.010
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B., 1957. Anaerobic Digestion of Algae. *Appl. Microbiol.* 5, 47–55.
- Hammouda, O., Gaber, A., Abdelraouf, N., 1995. Microalgae and Wastewater Treatment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 205–210. doi:10.1006/eesa.1995.1064
- Hongyang, S., Yalei, Z., Chunmin, Z., Xuefei, Z., Jinpeng, L., 2011. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresour. Technol.* 102, 9884–9890. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.016
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater treatment with microalgae—a literature review. *Vatten* 62, 31.
- Lavoie, A., de la Noüe, J., 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach for wastewater biological tertiary treatment? *Water Res.* 19, 1437–1442. doi:10.1016/0043-1354(85)90311-2
- Lüring, M., 2003. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 39, 85–101. doi:10.1051/limn/2003014
- Martínez, M.E., Jiménez, J.M., El Yousfi, F., 1999. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 67, 233–240. doi:10.1016/S0960-8524(98)00120-5
- Munoz, R., 2005. *Algal-Bacterial Photobioreactors for the Degradation of Toxic Organic Pollutants* (dissertation). Lund University.
- Nicolla Powell, 2009. *Biological phosphorus removal by microalgae in waste stabilisation ponds* (Doctoral). Massey University, Palmerston North, New Zeland.
- Oswald, W.J., Gotaas, H.B., Golueke, C.G., Kellen, W.R., Gloyna, E.F., Hermann, E.R., 1957. Algae in Waste Treatment [with Discussion]. *Sew. Ind. Wastes* 29, 437–457.
- Park, J., Jin, H.-F., Lim, B.-R., Park, K.-Y., Lee, K., 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 8649–8657. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.142

- Perez, R., 2001. Porcicultura y contaminación del agua en La Piedad, Michoacán, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17, 5–13.
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simões, M., 2013. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5096–5105. doi:10.1007/s11356-013-1791-x
- Poot-Delgado, C.A., 2010. Microalgas marinas tóxicas.
- Prescott, G.W., 1984. How to know the freshwater algae. *Pict. Key Nat. Ser.*
- Rhee, G.-Y., 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake 1. *Limnol. Oceanogr.* 23, 10–25. doi:10.4319/lo.1978.23.1.0010
- Rosso, D., Stenstrom, M.K., Larson, L.E., 2008. Aeration of large-scale municipal wastewater treatment plants: state of the art. *Water Sci. Technol.* 57, 973. doi:10.2166/wst.2008.218
- Sacristán de Alva, M., Luna-Pabello, V.M., Cadena, E., Ortíz, E., 2013. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 146, 744–748. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.061
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Res.* 1, 20–43. doi:10.1007/s12155-008-9008-8
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 27, 409–416. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.03.001
- Soto Valencia, D.A., 2012. Capacidad de remoción de amonio y ortofosfato, a gran escala, de dos especies de microalgas, en aguas residuales municipales. Universidad Autónoma Metropolitana, México, DF.
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2012a. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresour. Technol.* 124, 157–162. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.037
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2012b. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresour. Technol.* 105, 67–73. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.113
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2011a. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Res.* 45, 3351–3358. doi:10.1016/j.watres.2011.03.046
- Su, Y., Mennerich, A., Urban, B., 2011b. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Res.* 45, 3351–3358. doi:10.1016/j.watres.2011.03.046
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D., 2002. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th edition. ed. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, Boston.
- Tolbert, N.E., Zill, L.P., 1956. Excretion of Glycolic Acid by Algae During Photosynthesis. *J. Biol. Chem.* 222, 895–906.
- Valdecantos, A., D. Fuentes, J., Cortina, J., Casanova, G., 2010. Aprovechamiento de los purines. Requisitos para su utilización agraria y comercial.
- Wang, L., Li, Y., Chen, P., Min, M., Chen, Y., Zhu, J., Ruan, R.R., 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 2623–2628. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.062
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 5494–5500. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.016

Y. Collos, J.A.B., 2002. Nitrogen metabolism in phytoplankton.

Zhu, L., Wang, Z., Takala, J., Hiltunen, E., Qin, L., Xu, Z., Qin, X., Yuan, Z., 2013. Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 137, 318–325. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.144

11. ANEXOS

ANEXO 1: RESUMEN DEL MÉTODO DE NITRÓGENO TOTAL KJELDAHL PARA AGUAS RESIDUALES

El procedimiento completo y manejo del equipo se encuentra en el documento: **PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL KJELDAHL EN LOS EQUIPOS AUTOMATIZADOS DE VELP SCIENTIFICA** entregado al Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA).

1. Principio de la prueba

En la presencia de H_2SO_4 , el sulfato de potasio (K_2SO_4) y catalizador de sulfato cúprico ($CuSO_4$), amino-nitrógeno de muchos materiales orgánicos es convertido a amonio. El amoníaco libre también se convierte a amonio. Después de la adición de la base, el amonio es destilado de un medio alcalino y absorbido en ácido bórico o sulfúrico. El amonio puede ser determinado colorimétricamente, por un electrodo selectivo de amonio o por titulación con un ácido mineral estándar.

2. Digestión de la muestra

A continuación se indican los pasos principales para llevar a cabo la digestión de las muestras.

2.1. Selección del volumen de muestra



Para el análisis de Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK) en **muestras líquidas** (como aguas residuales), es importante tener en cuenta que durante el proceso de digestión, se generan salpicaduras y pérdidas de muestra cuando se trabaja con volúmenes superiores a **25 mL**, por tal, si la concentración de NTK esperada en la muestra es muy baja, se recomienda concentrar (calentamiento previo dentro de los tubos Velp en la base de calentamiento a una temperatura adecuada: 100-150°C) hasta tener un volumen aproximado de muestra de **5 mL** teniendo en cuenta que los cálculos en el sistema de destilación se harán con base al volumen INICIAL (antes de la concentración) utilizado.

Para la selección adecuada del volumen de muestra con base a la cantidad de nitrógeno orgánico total esperado en la muestra, se usa la siguiente tabla:

Concentración de Nitrógeno orgánico (mgN_{org}/L)	Volumen de muestra (mL)
0-1	500
1-10	250
10-20	100
20-50	50

NOTA: Si se va a analizar agua residual, se recomienda tener en cuenta la composición típica de un agua residual doméstica (fuente: Metcalf & Eddy, 2004), ver Ilustración 1.

Typical composition of untreated domestic wastewater Ref: Metcalf & Eddy, 2004

Contaminants	Unit	Concentration*		
		Low strength	Medium strength	High strength
Solids, total (TS)	mg/L	390	720	1230
Dissolved, total (TDS)	mg/L	270	500	860
Fixed	mg/L	160	300	520
Volatile	mg/L	110	200	340
Suspended solids, total (TSS)	mg/L	120	210	400
Fixed	mg/L	25	50	85
Volatile	mg/L	95	160	315
Settleable solids	mL/L	5	10	20
Biochemical oxygen demand, 5-d, 20°C (BOD ₅ , 20°C)	mg/L	110	190	350
Total organic carbon (TOC)	mg/L	80	140	260
Chemical oxygen demand (COD)	mg/L	250	430	800
Nitrogen (total as N)	mg/L	20	40	70
Organic	mg/L	8	15	25
Free ammonia	mg/L	12	25	45
Nitrites	mg/L	0	0	0
Nitrates	mg/L	0	0	0
Phosphorus (total as P)	mg/L	7	7	12
Organic	mg/L	1	2	4

Ilustración 1 Composición típica de un agua residual doméstica

2.2. Adición de muestra y reactivos al tubo de ensayo de vidrio de VELP.

⚠ Atención: Realice este paso en una campana de absorción de vapores, hágalo en el rack del equipo, utilice guantes, adicione el ácido y el peróxido lentamente como se observa en la Ilustración 2. Esta reacción es violenta y exotérmica, tenga presentes las medidas de protección recomendadas.

A continuación se describen las cantidades utilizadas para aguas residuales concentradas en nitrógeno (de 50 a 200 mgntk/l), si la muestra tiene condiciones diferentes, se deben realizar diferentes pruebas con diferentes volúmenes de muestra, ácido y peróxido hasta estandarizar.

- ➔ Adicione 5 mL de muestra en el tubo de ensayo de vidrio de VELP.
- ➔ Adicione 2 pastillas catalizadoras CM (Código CT0006650).
- ➔ Adicione 15mL de ácido sulfúrico concentrado (98-99%).
- ➔ Adicione 5 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

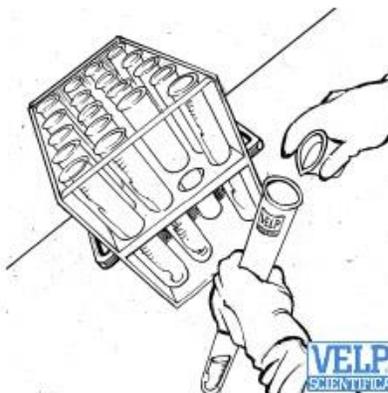


Ilustración 2 Adición de muestra y reactivos a los tubos VELP

2.3. Ubicar tubos en el digestor.

Los tubos con las muestras y los reactivos ubicados en la gradilla VELP (ver Ilustración 3), se montan en la parrilla de calentamiento apoyándola en los tornillos de la parte de atrás.

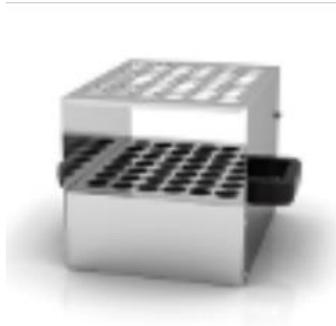


Ilustración 3 Gradilla para tubos VELP

Baje las muestras (esto lo puede hacer manual o automáticamente el equipo) al bloque de calentamiento de aluminio.

2.4. Tiempo y temperatura de digestión

Para la completa digestión de las cantidades de muestra y reactivos descritos anteriormente (para aguas residuales), es necesario que los tubos permanezcan a **420°C durante 60 minutos**. Para asegurar esto, se recomienda programar una **rampa de precalentamiento de 5-10 minutos a 400°C y luego una de 60 minutos a 420°C**. El programa se puede iniciar antes de instalar los tubos para ahorrar algo de tiempo y cuando el programa esté en la etapa de precalentamiento se pausa para insertar los tubos y se asegura el tiempo y la temperatura adecuada.

2.5. Fin de la digestión

Suba las muestras (automáticamente en la unidad de digestión DKL Kjeldahl) y deje enfriar. Separe la tapa de succión con las teclas  y  e introduzca la bandeja de goteo (*drip tray*) para recoger las gotas de ácido que se pueden caer de las campanas de cristal de las tapas de succión.

Ahora las muestras están listas para la **fase de destilación**.

La Ilustración 4 se presenta un esquema general de la metodología para la digestión de las muestras.

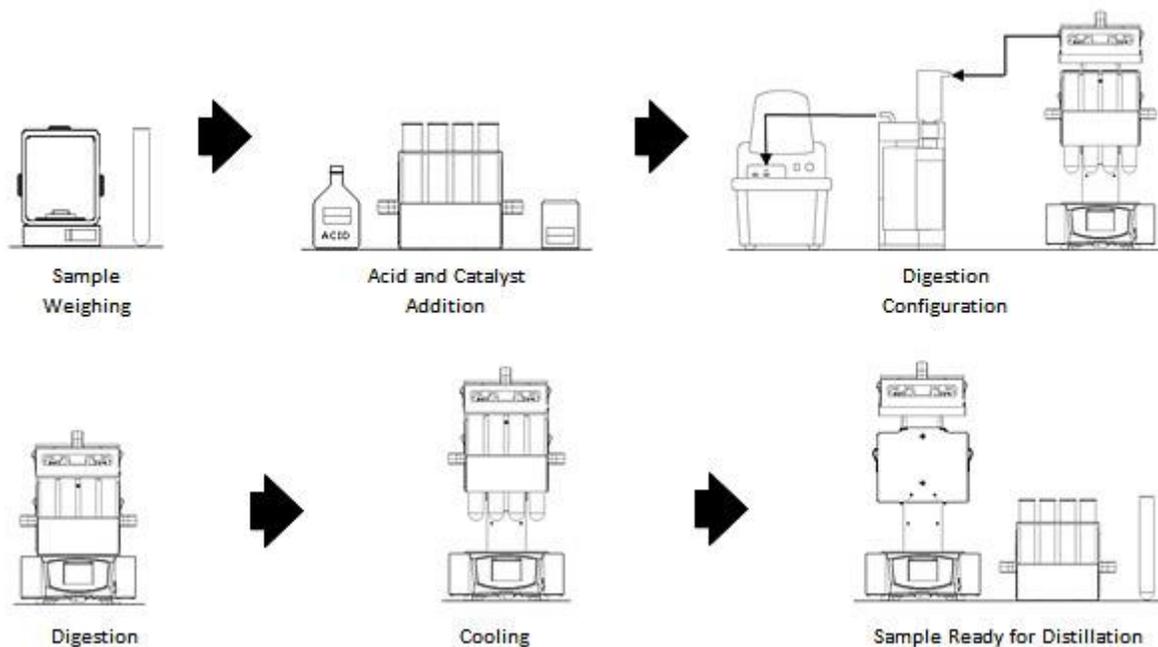


Ilustración 4 Esquema general de la etapa de digestión.

3. Destilación y titulación de las muestras

El objetivo que se busca en esta fase es que el sulfato de amonio presente en la muestra digerida, sea convertido a amoníaco gaseoso (NH_3), sea calentado y destilado. El gas amoníaco se atrapa en una solución donde se disuelve y se convierte a ion amonio (NH_4^+) otra vez y éste es determinado por titulación y colorimetría. Todos estos pasos se llevan a cabo automáticamente en el equipo.

3.1. Ubique un tubo de ensayo vacío y limpio en el equipo

Para ubicar el tubo de ensayo, abra la puerta de plástico y luego mueva hacia abajo la palanca azul y ubique el tubo asegurándose de que la manguera de teflón transparente permanezca dentro del tubo de ensayo y que el tubo mismo esté sobre la superficie blanca circular que se encuentra en la parte inferior de la cámara. Suelte la palanca azul y cierre cuidadosamente la puerta.

3.2. Encienda el equipo.

Al encender el equipo, este comenzará a hacer tres pasos simultáneamente:

- Pre-calentamiento (dura aproximadamente 3 minutos). La banda amarilla que aparece en la parte superior de la pantalla indica que está realizando el proceso de pre-calentamiento (“*pre-heating*”) y la cuenta-atrás indica el tiempo que resta para terminarlo.
- Verificación de flujo de agua para asegurarse que hay presencia de agua de enfriamiento.

c) El proceso de iniciación de la bureta para asegurarse de una correcta titulación.

3.3. Realización del análisis de las muestras.

Para la realización del análisis de muestras, siga los siguientes pasos:

- 3.3.1. Verifique que haya colocado un tuvo VELP vacío y limpio dentro del equipo (para llevar a cabo el análisis del blanco).
- 3.3.2. Seleccione “*Analysis*” del menú principal, ver Ilustración 5.



Ilustración 5 Selección de "Analysis" del menú principal

Le aparecerán cuatro sub-menús como lo indica la Ilustración 6.

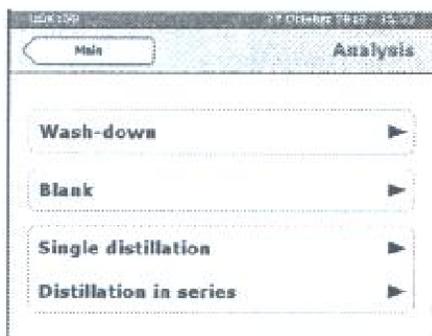


Ilustración 6 Sub-menús de la opción "Analysis"

Para regresar al menú principal, presione la flecha en la esquina superior izquierda: “Main”.

- 3.3.3. **Realización del blanco:** Use la pantalla táctil para seleccionar el sub-menú “*Blank*”. Aparecerá una ventana como la que se muestra en la Ilustración 7.

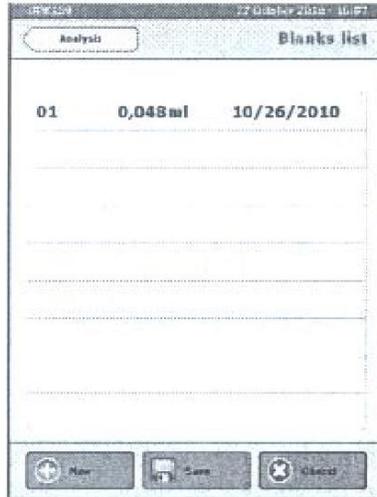


Ilustración 7 Lista de blancos

- Para realizar un nuevo blanco, presione “new” y le aparecerá el menú que se presenta en la Ilustración 8.

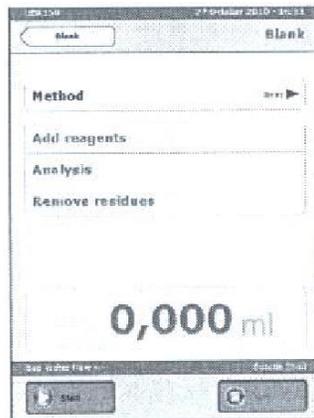


Ilustración 8 Menú para crear un nuevo blanco

- Presione “method” para acceder al menú de los métodos. Escoja el método de interés para hacer el blanco, **el método estandarizado por VELP y el personal del laboratorio del LIPATA para la realización de muestras de aguas residuales está identificado en el equipo como “VELP STANDARD” el cual utiliza las siguientes cantidades de reactivos:**
 - 50 mL de agua destilada
 - 25 mL de solución indicadora de ácido bórico
 - 60 mL de hidróxido de sodio al 30%
 - Utiliza HCl al 0,1N para la titulación.

De esta manera el análisis del blanco se llevará a cabo bajo las mismas condiciones operacionales que se utilizarán para analizar las muestras.

- Presione el botón “*Start*” para comenzar el análisis.
- Durante el análisis del blanco, se llevan a cabo las siguientes tres fases:
 - Adición de reactivos
 - Análisis
 - Remoción de residuos
- La bandera verde a la derecha indica que la fase se llevó a cabo correctamente, una “X” roja indica que no se terminó correctamente.
- Presione el botón “*Stop*” para detener el proceso en cualquier momento.
- Los mililitros de solución de titulación dosificados por la bureta son mostrados en la pantalla durante el análisis.
- Al final del análisis, la lista de blancos llevada a cabo es mostrada con los valores obtenidos al final de la fecha de análisis (un máximo de 9 blancos pueden ser mostrados).
- Los blancos más recientes van a estar en la parte superior de la lista.
- Repita estos pasos hasta obtener un blanco con valores menores a 0.1mgN.

3.3.4. Única destilación (*Single distillation*)

Esta opción se utiliza cuando se necesitan analizar muestras usando diferentes métodos o cuando sean pocas muestras (una o dos). Del menú de “*Analysis*”, seleccione la opción “*Single distillation*”. Le aparecerá un menú como se muestra en la Ilustración 9.

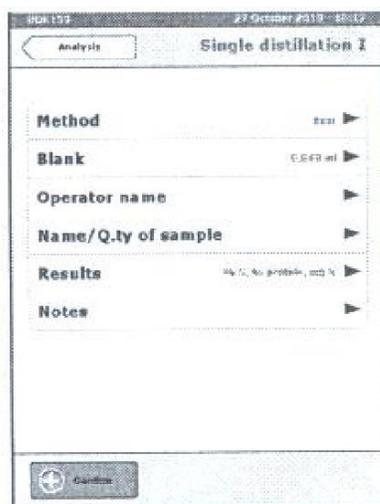


Ilustración 9 Menú de destilación única

Entre a los diferentes sub-menús y entre los parámetros requeridos para el análisis.

- **Method:** Escoja el método de interés, ya sea uno estándar o uno personalizado.
- **Blank:** Escoja el valor de blanco que será restado cuando se calculen los resultados.
- **Operator name:** Utilice el teclado alfanumérico que le aparece en pantalla para entrar o modificar el nombre del operador.
- **Presione “Save” para confirmar.**
- Cuando presione “Name/Q.ty of sample” le aparecerá una ventana como la que se muestra a continuación en la Ilustración 10.

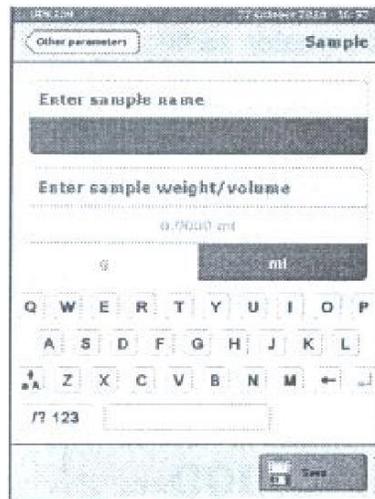


Ilustración 10 Ventana para entrar el nombre y el volumen de la muestra

- **Enter sample name:** Utilice el teclado alfanumérico para ingresar un nombre para la primera prueba. (Máx 15 caracteres)
- **Insert w/v sample:** Utilice el teclado alfanumérico para ingresar el peso o el volumen de muestra.
- Seleccione la unidad de medida (g ó mL)
- **Presione “Save” para confirmar.**
- **Presione “Results” y le aparecerá una ventana que se muestra a continuación en la Ilustración 11.**

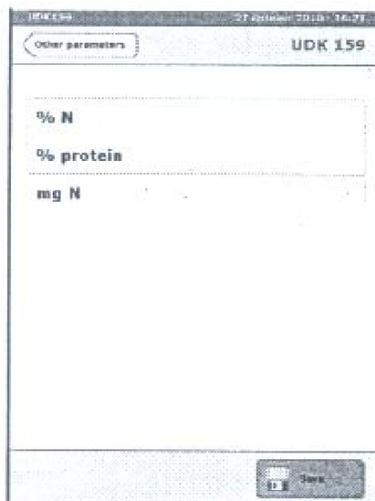


Ilustración 11 Unidades de medida para los resultados

- Escoja entre las tres unidades de medida para el resultado final así como los mililitros (mL) de solución de titulación utilizada y mostrada durante el análisis.
- **Presione “Save” para confirmar.**
- **Presione “Confirm” para confirmar los parámetros de análisis,** ver Ilustración 12.



Ilustración 12 Menú para los parámetros del análisis

- Ubique el tubo de ensayo con la muestra en su puesto y presione “START”.

⚠ Atención: Use guantes resistentes al calor para tomar el tubo proveniente de la fase de digestión que puede estar caliente. Use mascarilla para trasladar el tubo de una unidad (digestión) a otra (destilación), pues todavía se pueden estar desprendiendo gases tóxicos.

3.3.5. Destilación en Series (*Distillation in series*)

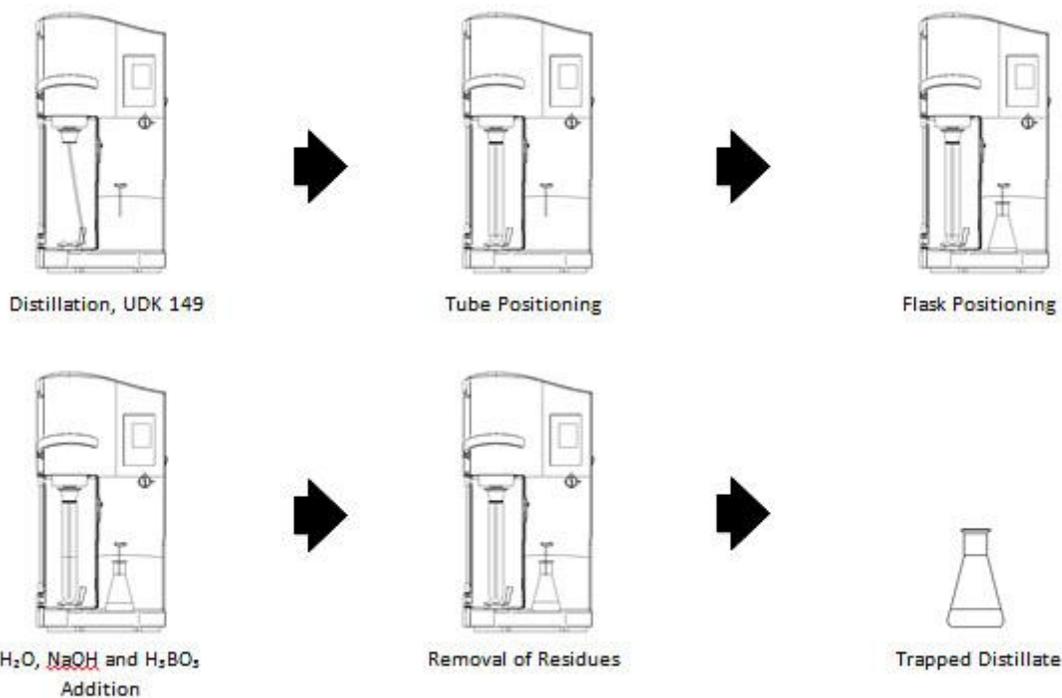
Las destilaciones en series se recomiendan para muestras con el mismo tipo de muestra y volumen/peso, puesto que todas las muestras a analizar se entran al sistema en serie.

Del menú de “*Analysis*” use la pantalla táctil para seleccionar “*Distillation in series*”.

El procedimiento es igual al de la única destilación, sólo que esta vez se ingresan todos los nombres y volúmenes de muestra, método de análisis, nombre del operador y notas de una sola vez, y el equipo indica cuándo hay que hacer el cambio de un tubo a otro con las diferentes muestras. Recuerde usar guantes resistentes al calor para manipular los tubos que salen del equipo, pues están a altas temperaturas.

NOTA: Para análisis de muestras de agua residual, purines de cerdo diluídos, aguas residuales con algas, etc, utilice el método personalizado llamado “VELP STANDARD” tanto para el blanco, como para los análisis. Fue probado con un estándar de cloruro de amonio, como lo indica el *Standard Methods*.

RESUMEN DE LA TÉCNICA:



ANEXO 2: PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LÍPIDOS EN MICROALGAS MEDIANTE TINCIÓN CON ROJO NILO.

Objetivo: Observar lípidos acorde a la tinción de rojo Nilo en microalgas.

FASE #1

1. Crecimiento de microalgas *Chlorella vulgaris* (tomado del cepario de la Facultad de Ciencias de la UNAM) en medio Bold modificado con el doble de nitrógeno para acelerar el crecimiento.

1.1. Crecimiento de arranque.

- Adicionar 110mL de medio Bold modificado en dos Enlermeyer de 125mL.
- Adicionar a cada Enlermeyer 1,5mL de inóculo de *Chlorella vulgaris*.

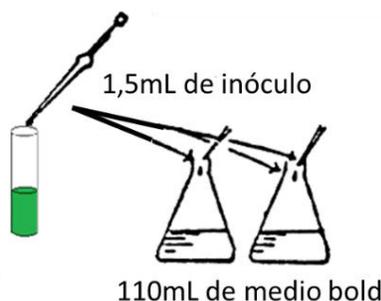


Ilustración 13 Crecimiento el inóculo de chlorella vulgaris en medio Bold modificado

En la Ilustración 13 se observa un esquema de esta fase. Después de la adición del inóculo, dejar 7 días en constante agitación. La iluminación ($95 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) se realizó por fotoperiodos de 12 horas para permitir el crecimiento del inóculo.

1.2. Crecimiento para producción de biomasa

- Adicionar 1440mL de medio Bold modificado en un Enlermeyer de 2L
- Adicionar 160mL del inóculo de *Chlorella vulgaris* crecido en la fase de arranque (80mL de cada uno)

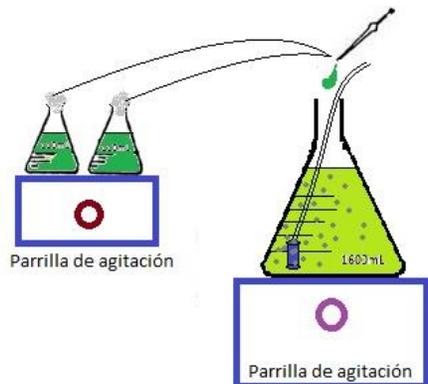


Ilustración 14 Cultivo de Chlorella en mayor volumen

En la Ilustración 14 se observa un esquema de esta fase. Después de la adición del inóculo, dejar 7 días en constante agitación y aireación continua. La iluminación ($95 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) se realizó con fotoperiodos de 12 horas para permitir el crecimiento del inóculo.

FASE #2

2. Crecimiento para producción de lípidos

Teóricamente, las microalgas acumulan más lípidos al interior de la célula cuando se someten a ciertas condiciones de estrés, por ejemplo, la limitación por nitrógeno.

Para este ensayo se deben preparar 2 litros de medio Bold pero sin fuente de nitrógeno (nitratos).

- Adicionar 1440mL de medio Bold sin nitratos en un Erlenmeyer de 2L
- Centrifugar y lavar con agua destilada 160mL de la solución de *Chlorella vulgaris* crecida en la fase para producción de biomasa.
- Adicionar al medio (14400mL de medio Bold sin nitrógeno)

En la Ilustración 15 se observa un esquema de esta fase. Después de la adición del inóculo, dejar 7 días en constante agitación y aireación continua. La iluminación ($95 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) se hará con fotoperiodos de 12 horas para permitir el crecimiento del inóculo.

Después de terminada la fase de cultivo, medir SSV del cultivo con limitación y del cultivo sin limitación por nitrógeno y luego centrifugar y guardar el inóculo en el cuarto frío para hacer posteriores mediciones.

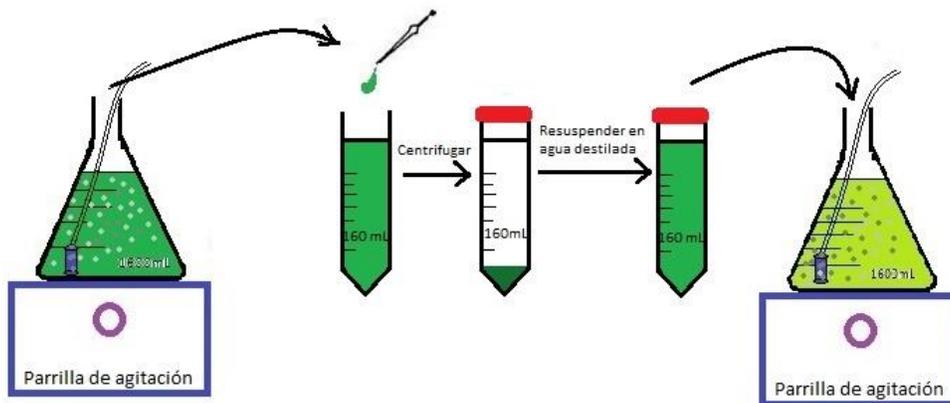


Ilustración 15 Crecimiento de Chlorella. bajo condiciones de limitación de nitrógeno

FASE #3

3. Determinación cualitativa de lípidos en *Chlorella vulgaris* mediante tinción con rojo Nilo

El siguiente procedimiento se realizará para la biomasa de *Chlorella* cultivada sin limitación por nitrógeno y la biomasa con limitación para observar diferencias entre ellas.

3.1. Reactivos

- Colorante rojo Nilo
- Acetona
- Buffer fosfato salino (PBS)

3.2. Protocolo

3.2.1. Preparación muestra de microalgas

Centrifugar 10 mL de suspensión de microalgas de 100 mg SSV/L a 3600 rpm por 10 min y re-suspender en 10 mL de buffer fosfato salino (PBS).

3.2.2. Preparación buffer fosfato salino (PBS)

Para un litro de PBS agregar: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄. Posteriormente ajustar el pH a 7.4 con HCL. Almacenar a temperatura ambiente.

3.2.3. Preparación soluciones rojo Nilo

Pesar en balanza analítica 2 mg de rojo Nilo y disolver en 2 mL de acetona. Almacenar la solución (solución A) a 5 °C en un frasco ámbar. Para realizar la tinción de lípidos, en un tubo eppendorf de 1.5 mL adicionar 1 mL de acetona y 150 µL de la solución A, obteniendo una solución de rojo Nilo de 150 µg/mL (solución B).

3.2.4. Tinción de lípidos con rojo Nilo y determinación de fluorescencia

En un tubo poner 1.98 mL de muestra de microalgas en PBS y 20 µL de solución B de rojo Nilo y agitar con vortex durante un minuto. Posteriormente, incubar la muestra a 35 °C por 10 min en oscuridad. La señal del rojo Nilo es capturada en un microscopio de fluorescencia mediante excitación con láser entre 488-547 nm (488, 490, 530, 547 nm), y emisión entre 560-600 nm (575, 580, 585 nm). El rojo Nilo reacciona con lípidos neutros entregando una fluorescencia de color amarillo.

Resultados encontrados

FASE #1

4. Crecimiento de microalgas *Chlorella vulgaris* en medio Bold modificado

4.1. Crecimiento de arranque.



Ilustración 16 Crecimiento de Chlorella vulgaris en medio Bold (doble de N), día 0

En la Ilustración 16 se observa el montaje experimental del día 0 después de la adición de 1.5mL de inóculo de *Chlorella vulgaris* a cada Erlenmeyer con agitación constante.

Después de 7 días el crecimiento fue exitoso y se tomó esta biomasa para inocular en el siguiente paso.

4.2. Crecimiento para producción de biomasa



Ilustración 17 Crecimiento para producción de biomasa en 1600mL con 10% de inóculo

En la Ilustración 17 se observa el montaje experimental para el crecimiento de biomasa en 1600mL utilizando 160mL de la biomasa crecida en la fase #1 (7 días después).



Ilustración 18 Crecimiento de la biomasa en el día 7

En la Ilustración 18 se puede observar el cambio en el color de la biomasa 7 días después presentando una concentración promedio de 118mg SSV/L.

FASE #2

5. Crecimiento para producción de lípidos

En vista de que la cantidad de SSV obtenidos en el ciclo anterior fue relativamente bajo, no se tomaron 160 mL sino 500mL del cultivo anterior (con nitrógeno), para lograr una cantidad de biomasa apropiada para la toma de muestras. El centrifugado se re-suspendió en 1600mL de medio Bold sin nitrógeno y se sometió a aireación constante con un fotoperíodo de 12 horas.

6. Determinación cualitativa de lípidos en *Chlorella vulgaris* mediante tinción con rojo Nilo

6.1. Determinación cualitativa de lípidos con rojo Nilo para *Chlorella vulgaris* sin limitación por nitrógeno

Luego de realizar los pasos necesarios para observar al microscopio las células, se observó que la cepa de *Chlorella vulgaris* había sido contaminada por otras microalgas presentes en el ambiente de trabajo (no se trabajó bajo condiciones estériles) del laboratorio entre las cuales se pudieron identificar filamentosas, *Scenedesmus* y algunas diatomeas.

El procedimiento para la observación de lípidos se realizó diariamente a partir de los 3 días de ayuno. La observación más evidente es una deformación y ensanchamiento en las células de *Scenedesmus*, estas deformaciones se han reportado en la literatura cuando se someten a condiciones de estrés.

A partir de los tres días se lograron observar los lípidos dentro de las células (puntitos amarillos) pero no en todas las células, muchas se observaban sólo rojas: la clorofila se ve de color rojo a esa longitud de onda, lo que indica que, como se ha reportado en la literatura, el colorante de rojo Nilo no logra penetrar las paredes celulares gruesas y rígidas de muchas especies de microalgas (entre ellas las algas verdes como es *Chlorella* y *Scenedesmus*). Se observaban muchas veces los lípidos en un solo cenobio de los 4 o los 8 presentes en *Scenedesmus* como se observa en la Ilustración 19 En *Chlorella vulgaris* sí se lograban ver con más nitidez dos o más puntitos dentro de las células como se observa en la Ilustración 20.



Ilustración 19 *Scenedesmus* sin pretratamiento



Ilustración 20 Chlorella vulgaris sin pretratamiento

Para ayudar a la penetración del colorante en la célula, se probaron diferentes métodos:

- Sonicar por 30 segundos después de la adición del colorante.
- Sonicar por 30 segundos antes de la adición del colorante.
- En lugar de realizar la re-suspensión de las células en buffer de fosfatos, hacerlo en solventes orgánicos: Etanol, Glicerol, DMSO.

Después de realizar los procedimientos con sonicación y solventes, se encontró que:

- Con la sonicación después de la adición del colorante, no se lograba ver el color rojo ni el color amarillo de los lípidos, la célula sufría un daño tal que a esa longitud de onda se observaba como desteñida.
- Con la sonicación antes de la adición del colorante, se lograron observar con mucha claridad y muy brillantes los lípidos dentro de las células pero el rojo de la clorofila perdía intensidad, como se observa en la Ilustración 21 para el caso de Chlorella y en la Ilustración 22 para el caso de Scenedesmus.



Ilustración 21 Chlorella con sonicación antes de la adición del colorante

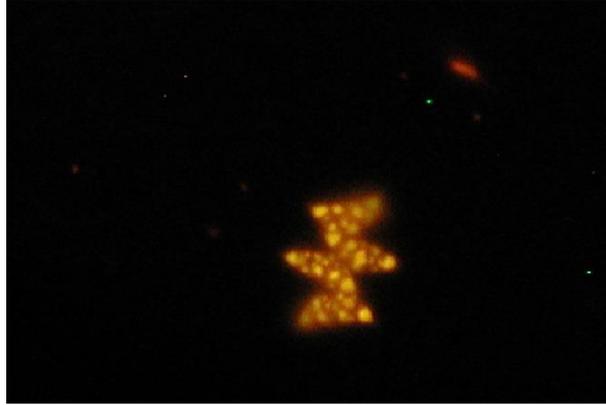


Ilustración 22 Scenedesmus con sonicación antes de la adición del colorante, célula deformada.

- Tanto con DMSO como con Etanol, las microalgas sufrían un efecto de desteñido (similar a lo ocurrido con la sonicación después de la adición del colorante).
- Con Glicerol se lograron observar las microalgas con colores intensos (tanto de rojo como de amarillo que indicaban la presencia de lípidos al interior) y los puntitos amarillos se observaron por igual en todos los cenobios para el caso de Scenedesmus como se observa en la Ilustración 23 y en la Ilustración 24 se observan en 40X un poco borrosas pero se logra ver cómo en todas las células se diferencian bien los puntos amarillos en un fondo rojo (clorofila).

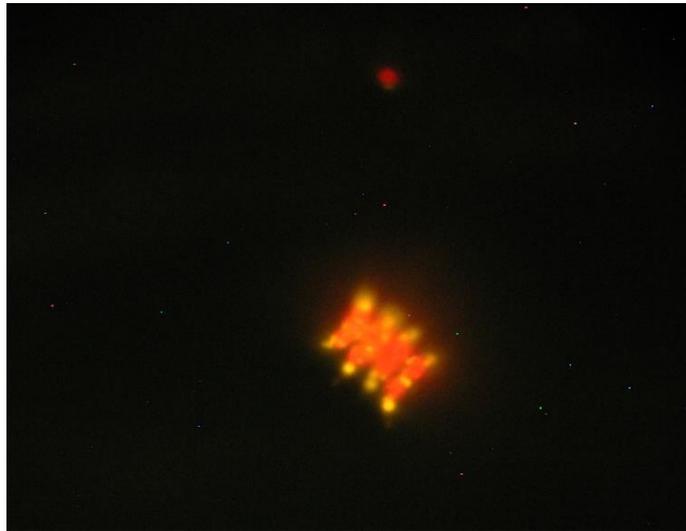


Ilustración 23 Scenedesmus con pretratamiento con Glicerol en 100X

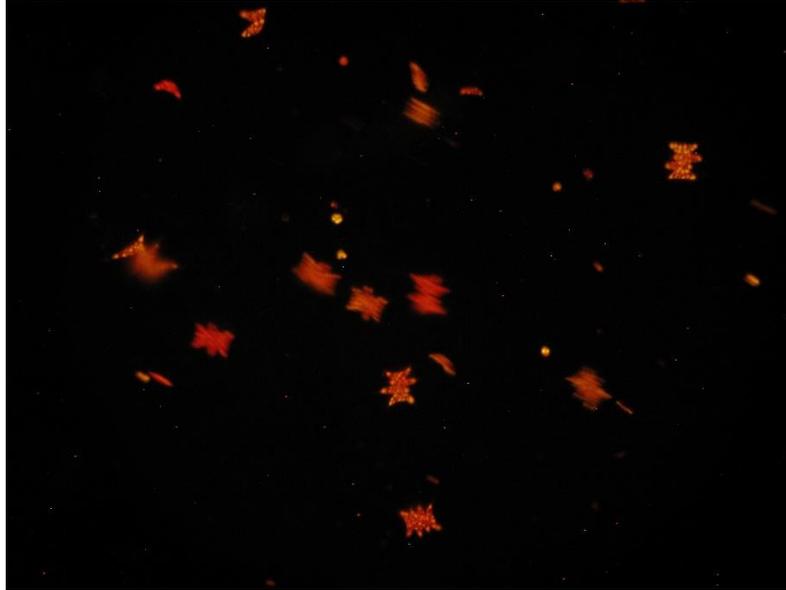


Ilustración 24 Scenedesmus y Chlorella con pretratamiento con Glicerol en 40X

Es importante tener en cuenta que el colorante de rojo Nilo es altamente fotosensible lo que dificulta un poco la toma de imágenes ya que si el usuario se detiene por más de un minuto en la imagen (en el microscopio), la muestra pierde el color y lucen completamente amarillas, esto puede ser una imagen engañosa ya que no son lípidos, como se observa en la Ilustración 25.

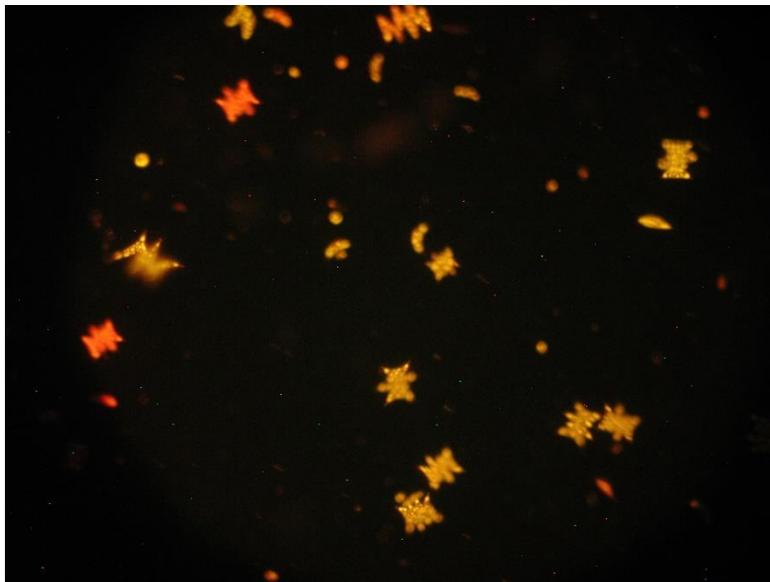


Ilustración 25 Muestra con sobre-exposición a la luz

ANEXO 3: TABLAS DE ANOVA

Definición de variables para ANOVA:

SC: Suma de Cuadrados

GL: Grados de Libertad

MC: Media Cuadrada

Φ_0 : Estadístico calculado

F: Estadístico comparativo de tablas

Tabla 18 Anova de velocidades de remoción de DQOs

V_{DQO}	SS	GL	MC	Φ_0	F
Tipo de agua	31745.19	2	15872.60	5.44	3.40
Inóculación	1252.23	1	1252.23	0.43	4.30
Tipo de agua x inóculo	592.23	2	296.11	0.10	3.40
Error	70003.39	24	2916.81		
Totales	103593.04	29			

Tabla 19 Anova de velocidades de remoción de NH_3

V_{NH_3}	SS	GL	MC	Φ_0	F
Tipo de agua	234.59	2	117.30	1.32	3.40
Inóculo	19.75	1	19.75	0.22	4.26
Tipo de agua x inóculo	0.08	2	0.04	0.00	3.40
Error	2133.68	24	88.90		
Totales	2388.10	29			

Tabla 20 Anova de velocidades de remoción de $P-PO_4^{3-}$

$V_{PO_4^{3-}}$	SS	GL	MC	Φ_0	F
Tipo de agua	173.81	2	86.91	69.49	3.55
Inóculo	10.94	1	10.94	8.74	4.41
Tipo de agua x inóculo	4.17	2	2.08	1.67	3.55
Error	22.51	18	1.25		
Totales	211.42	23			

Tabla 21 Anova de tasas de remoción de NH₃

Y_{NH3}	SS	GL	MC	Φ₀	F
Tipo de agua	0.02	2	0.01	0.48	3.40
Inóculo	0.02	1	0.02	1.14	4.26
Tipo de agua x inóculo	0.01	2	0.00	0.25	3.40
Error	0.44	24	0.02		
Totales	0.49	29			

Tabla 22 Anova de tasas de remoción de PO₄³⁻

Y_{PO43-}	SS	GL	MC	Φ₀	F
Tipo de agua	0.05	2	0.03	24.89	3.55
Inóculo	0.00	1	0.00	0.32	4.41
Tipo de agua x inóculo	0.01	2	0.00	1.63	3.55
Error	0.02	18	0.00		
Totales	0.08	23			

**ANEXO 4: ARTÍCULO 2015 EN PRENSA. WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY.
DOI: 10.2166/WST.2015.544**

Effect of microalgae inoculation on the start-up of microalgae-bacteria systems treating municipal, piggery and digestate wastewaters.

Effect of microalgae inoculation on the start up of microalgae-bacteria systems treating municipal, piggery and digestate wastewaters

Liz Arango, Flor M. Cuervo, Armando González-Sánchez and Germán Buitrón

ABSTRACT

The effect of the inoculation of a microalgae-bacteria system on the removal of nutrients and organic matter using municipal, piggery and digestate wastewaters was evaluated. Three conditions for each substrate were evaluated: (1) inoculation with activated sludge and illumination, (2) inoculation with activated sludge without illumination and (3) inoculation with activated sludge plus a native microalgae consortium under illumination. The illuminated reactors that were inoculated only with activated sludge developed microalgae after 12 operation days. In these reactors, the formation of flocs was observed affecting the sedimentation of the biomass positively. The removal of COD, ammonium and phosphorous reached 84%, 65% and 77%, respectively.

Key words | domestic wastewater, microalgae, piggery wastewater, thermophilic anaerobic digestate

Liz Arango
Germán Buitrón (corresponding author)
Laboratory for Research on Advanced Processes
for Water Treatment, Unidad Académica
Cajalá, Instituto de Ingeniería,
Universidad Nacional Autónoma de México
(UNAM),
Circ. Juriquilla 2001, Núcleo Querétaro,
México
E-mail: gbuitron@iia.unam.mx

Flor M. Cuervo
Departamento de Biotecnología,
Universidad Autónoma Metropolitana-Cajalá

Armando González-Sánchez
Coordinación de Ingeniería Ambiental,
Instituto de Ingeniería, UNAM

Q1

Q3

INTRODUCTION

In Mexico, approximately 230 m³/s of wastewater are generated in urban centers, and from those wastewaters, only 35% of the organic matter is removed. Moreover, 30% of the plants installed in the country are operated by activated sludge systems, and 31% of them utilize stabilization ponds (CONAGUA 2013), which provides a great opportunity to propose new and low-cost treatment systems. Aeration is an energy-intensive process, accounting for 45–75% of the total plant energy costs in activated sludge processes (Rosso *et al.* 2008). Microalgae-bacterial systems are gaining popularity for wastewater treatment due to their ability to remove organic matter and nutrients (Oswald *et al.* 1957; Bahr *et al.* 2011; Hres *et al.* 2013). Microalgal photosynthesis produces the O₂ required by heterotrophic bacteria to oxidize organic matter, and the bacteria produce the CO₂ required by the microalgae to perform photosynthesis. Contrasting conventional aerobic treatment systems, the BOD removed by photosynthetic oxygenation requires no energy inputs and produces enough algal biomass to generate methane, which can produce electric power.

doi:10.2166/wst.2015.544

With sufficient nutrients and a light source, microalgae can grow on a variety of substrates. The growth of microalgae cultures in wastewater systems has been reported (Park *et al.* 2010); however, interest in the use of microalgae-bacterial systems for domestic and industrial wastewaters has been increasing because of the improvement in the settling characteristics (Godos *et al.* 2010; Su *et al.* 2011). Several studies have used digestate for microalgae cultivation (Zhu *et al.* 2013; Xu *et al.* 2015). Researchers have observed that microalgal growth is affected by the presence of organic matter and nutrients in anaerobic effluent, as well as the presence of other heterotrophic microorganisms (Muñoz & Guieysse 2006; Uggetti *et al.* 2014).

The objective of the present work was to evaluate the removal of nutrients and organic matter from a microalgae-bacterial system using three different substrates: municipal, piggery and digestate wastewaters. The inoculation effect on the reactor performance was also evaluated by using both microalgae-bacteria and activated sludge only. The productivity and lipid accumulation were evaluated in the biomass of each system.

METHODOLOGY

Microalgae and bacteria inoculum

The microalgae inoculum was obtained from a mixed consortium cultivated in the laboratory, which was first collected from a lake near the campus and cultivated in a batch reactor using bold medium (Cea-Barcia *et al.* 2014). The inoculum samples contained a mixture of green algae, which was identified by cell morphology using a microscope (Prescott 1984). Prominent genera included *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Monoraphidium* and *Chlorella* (Cea-Barcia *et al.* 2014). The inoculum was grown in bold media, containing 833 mg/L Volatile Suspended Solids (VSS). The bacteria inoculum was obtained from the aeration tank of a municipal wastewater (MWW) treatment plant near the campus and contained 2740 mg VSS/L.

Wastewater

Three types of wastewater were studied: MWW, piggery wastewater (PWW) and digestate from an anaerobic thermophilic reactor (ADE). The MWW was collected from a wastewater treatment plant located in Santa Rosa Jauregui, Queretaro, Mexico. The sampling point was chosen after preliminary treatment (coarse and fine screening and primary sedimentation). The MWW was stored in a cold room at 4 °C. The MWW was collected every 10 days. The PWW was collected from a farm with a capacity of 6000 pigs and was sieved with a 200 µm steel sieve. The ADE was collected from the effluent of a thermophilic anaerobic digester (53 °C) that treated the excess sludge of an activated sludge municipal wastewater treatment in Queretaro City. In a previous study (data not shown), a treatability test was performed using 500, 1000 and 2000 mg COD/L of PWW and

ADE. No significant growth of microalgae was observed with 2000 mg COD/L; however, biomass production was higher with 1000 mg COD/L (121 mgVSS/L/d) than 500 mg COD/L (52 mgVSS/L/d). Therefore, the best results with respect to microalgal biomass production and nutrient removal were obtained with 1000 mg COD/L and this concentration was used in the present study. The characteristics of the wastewaters are presented in Table 1. The dilution factor for PWW and ADE was 1:49 and 1:29, respectively.

Experimental strategy

This study was conducted in three parallel systems using the real wastewaters that were previously described. Each treatment system consisted of a series of glass bioreactors with 0.9 L of useful volume (Table 2). Three conditions for each substrate were evaluated: inoculation with activated sludge under illumination (B), inoculation with activated sludge plus a native microalgae consortium under illumination (M + B). In the last system, the reactors were also inoculated with activated sludge but were covered with aluminum foil to prevent light illumination and microalgae growth (AS).

The experimental array and the amount of biomass inoculated in each reactor are presented in Table 2. The reactors were maintained at 25 °C. Constant mixing was provided using a magnetic stirring bar to avoid biomass sedimentation. To evaluate the system under controlled radiation conditions in the lab, four white LED lamps of 20 W were used to illuminate the reactors with 10 klx. Illuminance was measured (Extech LT300, luxometer) at the exterior surface of the glass (Figure 1) and photo periods of 12 hours per day.

The experiments were conducted in batch mode. To determine the reaction time, the evolution of COD, VSS

Table 1 | Characteristics of wastewater

Parameter	Units	Municipal wastewater (MWW)	Piggery wastewater (PWW)	Anaerobic digestate (ADE)
Soluble chemical oxygen demand (COD)	mg O ₂ /L	412 ± 152	834 ± 170	954 ± 271
Ammonia	mg N-NH ₄ ⁺ /L	62.7 ± 8.1	63.6 ± 7.4	94 ± 12.4
Total phosphate	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	14.6 ± 1.9	3.8 ± 3.1	16.3 ± 2.2
N/P ratio		3.0-5.0	19.0-22.0	5.0-6.0
Nitrate	mg N-NO ₃ ⁻ /L	6.1 ± 0.26	10.6 ± 0.50	5.5 ± 0.48
Nitrite	mg N-NO ₂ ⁻ /L	1.5 ± 0.3	1.41 ± 0.08	3.0 ± 0.82
pH	pH Units	7.8 ± 0.5	8.1 ± 0.4	7.7 ± 0.6
Volatile suspended solids	mg VSS/L	150 ± 50	250 ± 30	400 ± 70

Table 2 | Experimental array and biomass inoculated in each reactor

Condition Reactor	Microalgae (M), bacteria (B) and Illumination			Bacteria and Illumination			Bacteria, no Illumination		
	MWW-M + B	PWW-M + B	AD-M + B	MWW-B	PWW-B	AD-B	MWW-AS	PWW-AS	AD-AS
Amount, mg of B	90	90	90	270	270	270	270	270	270
Amount, mg of M	180	180	180	-	-	-	-	-	-
Initial biomass concentration (mgVSS/L)	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Illumination	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No
Aeration	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes

MWW: municipal wastewater; PWW: piggy wastewater; AD: anaerobic digestate.



Figure 1 | Experimental set-up for the illuminated reactors.

and N-NH_4^+ was followed in the illuminated reactors during the first 8 days. The AS systems were daily fed with a reaction time of 24 hours. After this first cycle, five more cycles were performed and the mean values were reported. At the end of each cycle, 100 mL samples from the reactors were collected for analysis. During all the experiments, the VSS was kept constant by removing the unnecessary amount from the reactors at the end of every cycle. The biomass in the AS systems presented good sedimentability (200–300 mL/L), contrary to the illuminated reactors. Therefore, in that later case, centrifugation was necessary to separate the biomass from the clarified supernatant. A two-way ANOVA in a Completely Randomized Design using a factorial array of 3×3 with 5 replicas, corresponding to the number of batch cycles, was used in the experiment. The multiple comparisons of both the principal factors and the interactions between factors were made by the Fisher Least Significant Differences method under a significance level of 0.05 using Microsoft Excel.

Analytical procedure

The COD (micro-COD for a 0 to 1500 mg/L range) and N-NH_4^+ were determined by following the 8000 HACH and 10031 HACH colorimetric methods. N-NO_2^- and N-NO_3^- were analyzed following the 10237 and 10206 HACH methods (diazotization method and dimethylphenol method). The VSS concentration was analyzed according to standard methods (APHA, A.P.H.A., AWWA, A.W.W.A., WPCF, W.E.F., 2003). For P-PO_4^{3-} , the 10127 HACH colorimetric method was performed (molybdovanadate with acid persulfate digestion method). Dissolved oxygen (OD) and pH were measured in-situ using OD and pH probes (YSI Incorporated 50B model and OAKTON pH 510 Series). For the morphologic identification of microalgae, a LEICA DM500 microscope with the image acquisition system (LEICA ICC50 HD) was used, and the Prescott (1984) morphological identification guide was followed. Nile red methodology was used to determine the lipids inside the microalgae cells qualitatively. A modification to the technique using a glycerol solution was introduced for a better penetration of the stain inside the cell, instead of the phosphate buffer solution as presented by Doan & Obbard (2010).

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of the reaction time for the illuminated reactors

The COD, VSS and NH_4^+ concentrations were measured during the first 8 days to determine the reaction time of each cycle based on nitrogen and organic matter removal and the biomass produced. As shown in Figure 2, the COD removal for the reactors with MWW and PWW that

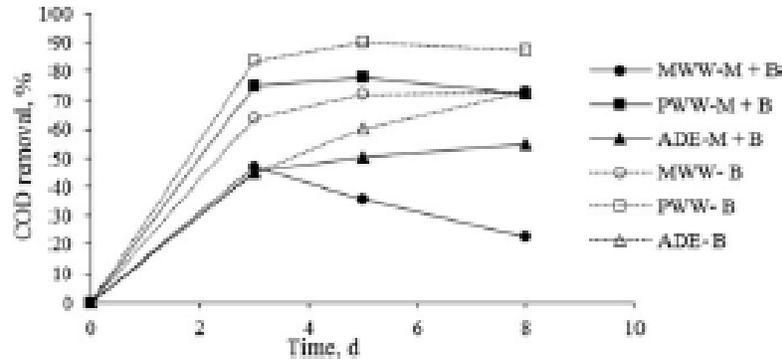


Figure 2 | Dynamics of soluble COD removal in the reactors with and without inoculum of microalgae. Results from the first adaptation cycle.

were first inoculated with microalgae reach a maximum removal after 3 and 5 days, respectively, and then decreased, indicating the liberation of organic matter. We expected the system to have the maximum COD removal; therefore, a reaction time of 4 days was selected. The removal time was confirmed, particularly because the highest ammonia removal was reached after 4 days (Figure 3). The dynamics of the biomass growth are shown in Figure 4. As shown in Figure 4, after the third day, the reactors that were inoculated with microalgae presented a peak and were stabilized until the last day. This behavior was not observed for the reactors that were inoculated only with activated sludge because in the first cycle, a small quantity of microalgae was present, which was not enough to keep the system aerated. Therefore, the bacterial growth was limited.

After the first cycle, the color in the reactors that were inoculated only with activated sludge changed to a pale green, and some diatoms and other microalgae genera developed. This was an indication that native microalgae develop if the conditions are adequate and a microalgae-bacteria

system can be developed (Figure 5). Once the duration of the cycles was determined, the illuminated reactors were operated for 5 cycles of 96 hours (4 days), and the activated sludge systems were operated for 5 cycles of 24 hours.

COD removal

Figure 6 presents the average results for COD removal for 5 cycles, obtained after the first adaptation cycle. The reactors were operated as sequencing batch reactors with a cycle duration of 4 days, with the exception of the AS reactor, which had cycles that lasted one day. The highest COD removal values were observed for MWW and PWW. The anaerobic digestate presented the lower values of COD removal that can be explained for the recalcitrance of the humic substances present in this effluent. Interestingly, the highest percentages were reached with the reactors that were illuminated and were not inoculated with microalgae: $74 \pm 2.7\%$, $84 \pm 2.1\%$ and $69 \pm 3.35\%$ for MWW, PWW and ADE, respectively. Of particular interest is the use of different

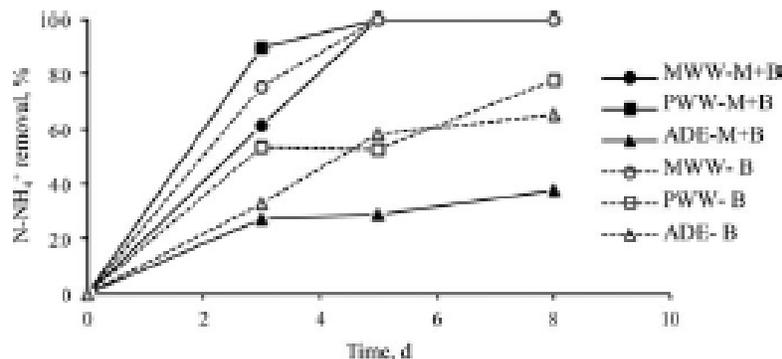


Figure 3 | Dynamics of N-NH_4^+ removal in the reactors with and without inoculum of microalgae. Results from the first adaptation cycle.

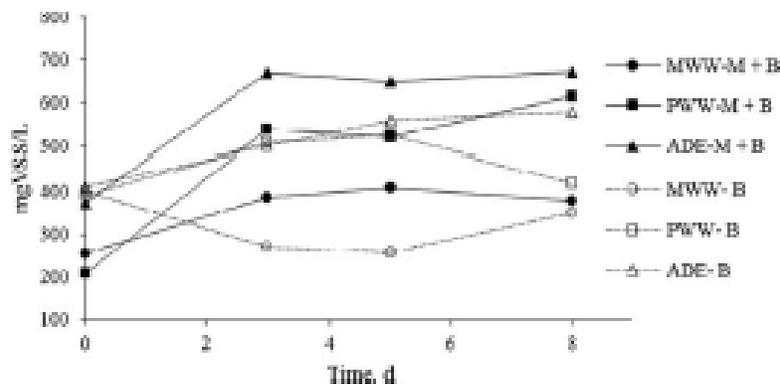


Figure 4 | Dynamics of biomass growth in the reactors with and without inoculum of microalgae. Results from the first adaptation cycle.

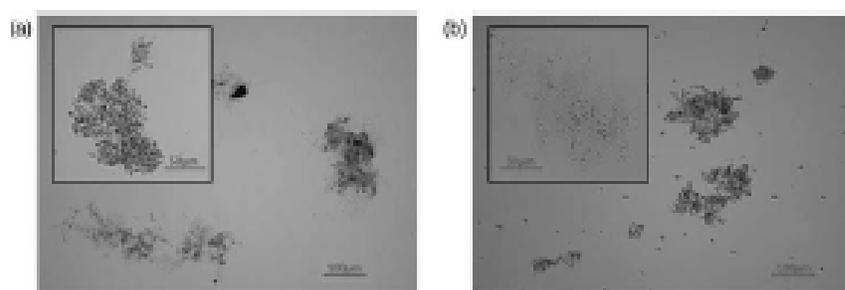


Figure 5 | (a) Micrographs of the reactor PWW-0 at day 0 (typical AS flocs) and (b) Reactor PWW-0 at day 13 (formation of microalgae-bacterial flocs).

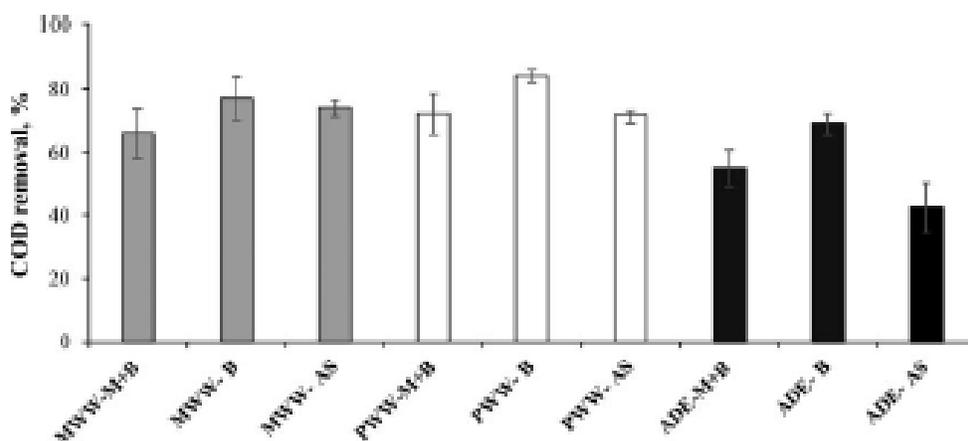


Figure 6 | Percentage of COD removal (mean \pm SD) for the three wastewaters for 5 cycles (cycles 3-4). Illuminated reactors inoculated with microalgae and activated sludge (M+B); illuminated activated sludge (B) and activated sludge without illumination (AS).

species of microalgae to start up a microalgae-bacteria system, which is found in most of the studies that investigate the treatment of wastewaters. For example, Su *et al.* (2012)

compared the nutrient removal capacity of four different microalgae species. Nevertheless, COD and nutrient removal were lower or similar than those obtained in this

study have been reported elsewhere (Godos *et al.* 2010; Honggang *et al.* 2011; Hernández *et al.* 2013). However, ANOVA analysis demonstrates that no significant differences were found between the two types of inoculation. That indicates that the few microalgae present in the substrates can grow easily and rapidly because they are able to adapt to that environment.

After microalgae reached a significant concentration in the reactors, the DO increased from $0.7 \pm 0.4 \text{ mg O}_2/\text{L}$ (measured immediately after feeding the reactors) to $18.3 \pm 0.5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ (for PWW and MWW). In operational terms, the systems have sufficient oxygen for effective heterotrophic bacterial oxidation of the organic matter (Tchobanoglous *et al.* 2002). However, because the reaction time in algae-bacteria systems is four times that of the activated sludge systems, the area of the first must be much greater, which could be a limitation in areas where land is not available.

P- PO_4^{3-} removal

The highest percentage of P- PO_4^{3-} removal was obtained with the reactors under illumination, as shown in Figure 7. The illuminated reactors for MWW and PWW presented high P removals ($77 \pm 4.3\%$ and $76 \pm 8.5\%$, respectively), independent of the presence of microalgae. The presence of microalgae was significant in the case of the ADE effluent. A higher removal was observed when the reactor was inoculated ($68 \pm 10\%$) than in the reactor without microalgae ($30 \pm 8.2\%$). P- PO_4^{3-} removal achieved by the use of MWW in the AS system was low ($6.3 \pm 1.5\%$), but typical for activated sludge systems (Tchobanoglous *et al.* 2002). The lower values of phosphorous removal obtained for

MWW can be explained by the low biomass productivity obtained with MWW because this effluent has lower a COD concentration than PWW or ADE (Table 1).

There are two methods to remove phosphorus from wastewaters. One method is physical removal through precipitation at pH higher than 9, and the other method is accumulation by the biomass. In our experiments, the pH increased as much as 8.5, indicating that not all the phosphorous removal could be attributed to physical removal. In this case, it is more likely that the removal was related to a biological process. Microalgae and bacteria use phosphorus to synthesize cellular constituents, and the amount of phosphorous used is related to their stoichiometry. Microalgae can take up much more phosphorus than what is necessary for survival when the external phosphorus concentration is limited. This extra phosphorus is stored as polyphosphate for use as an internal resource. However, despite having no limiting conditions, the storage of polyphosphate can be present (luxury uptake) and is typical of the normal metabolism of microorganisms (Erdler *et al.* 2006). Powell (2009) studied the luxury uptake of phosphorus by *Scenedesmus* sp. in waste stabilization ponds and found that this species of microalgae does indeed have extra phosphorus storage inside its cells as polyphosphate granules.

Other authors (Aslan & Kapdan 2006) state that the ideal N/P ratio for *Scenedesmus* sp. is approximately 30; lower ratios would constitute a phosphorus pool for microalgae and will not over-accumulate as they would when the ratio is approximately 30. In our case, PWW presented the highest N/P ratio (up to 22) and the use of this substrate represented the only case when all the reactors (with and without light) reached high removals (75–85%).

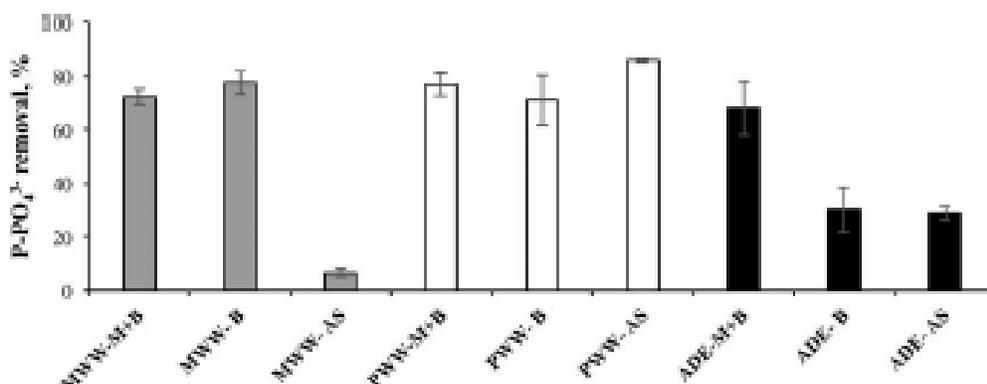


Figure 7 | P- PO_4^{3-} removal (mean ± SD) for the three wastewaters. Results for 5 cycles (cycle 2–6). Illuminated reactors inoculated with microalgae and activated sludge (M + B); Illuminated activated sludge (B) and activated sludge without illumination (AS).

Nitrogen removal

There are three ways in which ammonium can be removed from the wastewaters: nitrification (conducted by nitrifying autotrophic bacteria), stripping (when the pH is higher than 9) and assimilation (conversion of ammonium to organic nitrogen inside of cells). Figure 8 presents the average total nitrogen concentrations in the influent and the different nitrogen species in the effluent. The reactor performance improved with respect to the data present in Figure 3, which can be explained by the adaptation of the microorganisms after several operation cycles. Interestingly, some nitrification was occurring as the concentration of nitrites and nitrates were present in the effluent. For the

case of the effluents MWW and PWW, high nitrification was obtained for the aerated reactors without light (activated sludge).

Removal of total nitrogen was as high as 58 ± 12.0% for MWW-M + B, as presented in Figure 9. In general, higher ammonium removal was observed in the systems inoculated with microalgae indicating that, as the microalgae develop, the assimilation process is enhanced. This is also convenient because inorganic (soluble) nitrogen is converted to organic nitrogen (inside the biomass cells). Nitrogen removal up to 50–60% of $N-NH_4^+$ has been reported using diluted wastewaters with COD of 150 mg/L (Su et al. 2021). The results found in this current study are similar to those obtained with a mixed culture of microalgae (*Scenedesmus obliquus*,

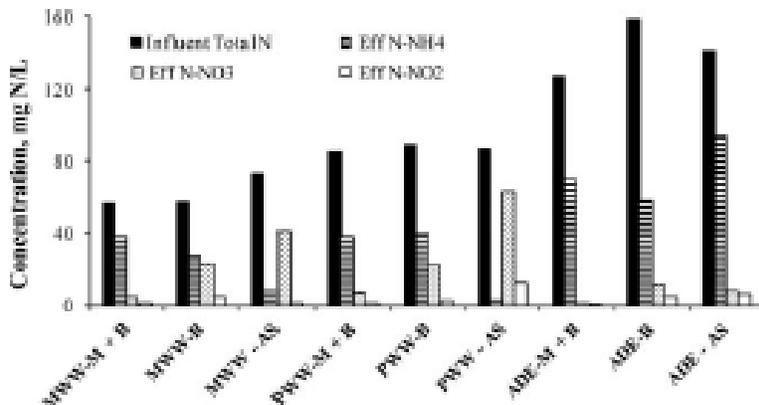


Figure 8 | Average values for total nitrogen in the influent and the different nitrogen forms in the effluent for the three wastewaters. Results for 5 cycles (cycle 3-6), illuminated reactors inoculated with microalgae and activated sludge (M + B); illuminated activated sludge (B) and activated sludge without illumination (AS).

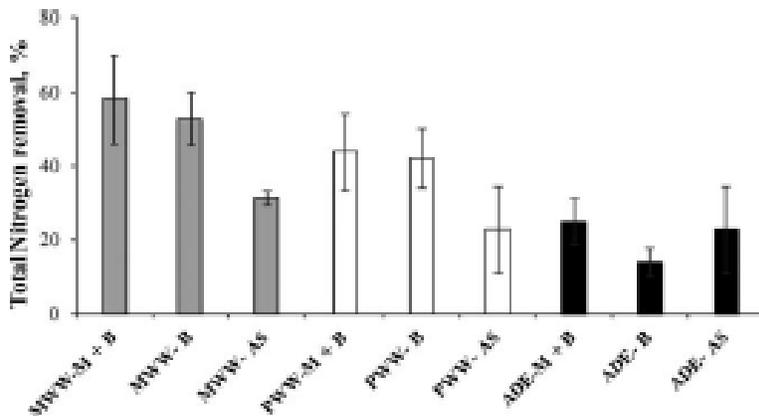


Figure 9 | Total nitrogen removal (mean ± SD) for the three wastewaters. Results for 5 cycles (cycle 3-6), illuminated reactors inoculated with microalgae and activated sludge (M + B); illuminated activated sludge (B) and activated sludge without illumination (AS).

Chlorella sorokiniana, *Spirulina platensis*, *Euglena nidida*) with activated sludge and PWW. Nitrogen removal varied from 21 to 39% (Godos et al. 2010).

Biomass productivity

Figure 10 presents the biomass productivity obtained for each wastewater. The productivity of the biomass was the highest for the AS reactors (not illuminated), attaining 650 ± 34 mg/L/d. This behavior is normal for activated sludge and SBR systems and explains the reason for higher retention times for algae-bacteria systems. This implies that the area needed for algae-bacteria systems will be 4 times higher than an activated sludge SBR reactor. On the other hand, the amount of sludge produced by the algae-bacteria systems would be 4 to 6 times lower, thus reducing the cost of treatment and final waste disposal. Finally, the algae-bacteria systems present a great advantage compared to an activated sludge system because it is theoretically possible to produce higher amounts of biofuels, such as methane, due to the storage of lipids inside the cells (Amin 2009).

Considering the illuminated reactors, the highest productivities were reached by the reactors that were not inoculated with microalgae. As the COD was lower for MWW, no comparable results with respect to biomass growth can be obtained. PWW and ADE had similar initial concentrations of COD. Thus, productivities can be compared. At this point, the ADE system presented the lower productivity, indicating the possible presence of a toxic compound that limited efficient microalgal reproduction.

The biomass productivity varied from 17 to 260 mg/L/d, depending on the substrate and the microalgae that was utilized (Woertz et al. 2009; Park & Craggs 2011; Sacristán de Alva et al. 2015).

Lipid accumulation and floc formations in the reactors illuminated

After the 3rd cycle, the reactors that were inoculated only with activated sludge turned as green as the reactors that had been inoculated with microalgae. The micrographs (Figure 11) indicate that the non-inoculated reactors developed microalgae species, such as diatoms, *Chlorella*, and filamentous microalgae. More importantly, microalgae-bacterial flocs (aggregates) were formed in the reactors that were illuminated and inoculated with activated sludge. In this case, the microalgae developed and attached naturally to the flocs (Figure 5(b)). This was not the case for the reactors that were inoculated with microalgae, which remained in suspension in the liquid. The floc formation also positively affected the sedimentation of the biomass. After one hour of settling, the volume settled of the biomass for reactors PWW-B and MWW-B ranged from 200 to 300 mL/L; however, the reactors that were inoculated with microalgae did not settle at all.

At the end of the cycles, biomass samples were collected from each of the reactors that were illuminated. Microalgae were stained with Nile red to evaluate the presence of lipids inside the cells. For all the wastewaters, the presence of lipids was confirmed (Figure 12). The clear (yellow) dots

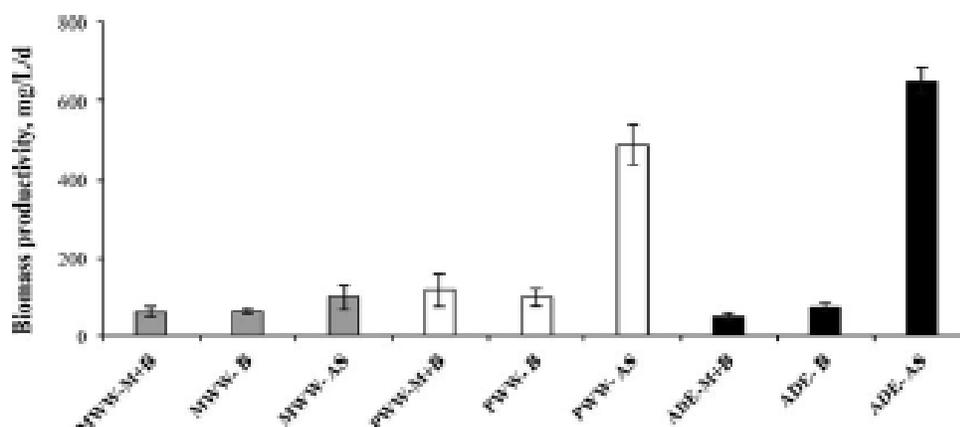


Figure 10 | Biomass productivity for the microalgae-bacteria and activated sludge systems. Results for 5 cycles (cycle 2-6).

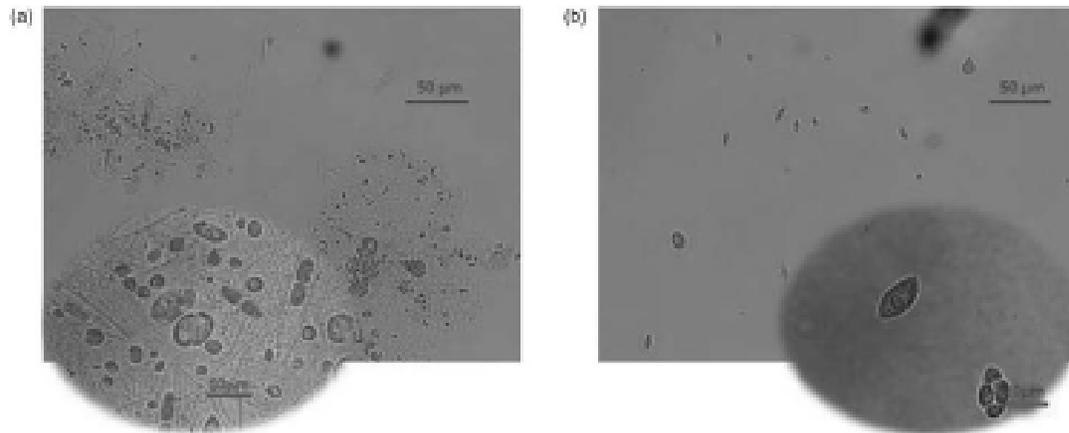


Figure 11 | Microorganisms developed after the 2nd cycle in the reactor without inoculum of microalgae (a) and with inoculum of microalgae (b).

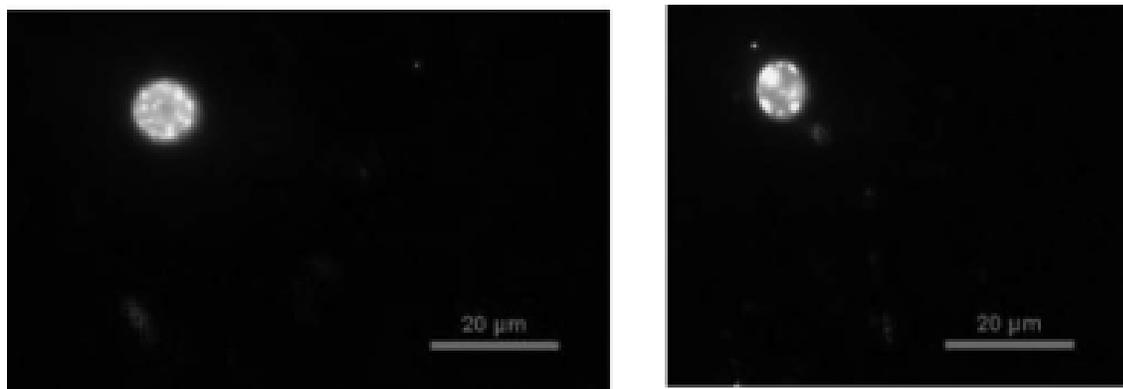


Figure 12 | Lipid content inside the microalgae cells in the reactor fed with PWW.

inside the cell represent the lipids, while the dark (red-orange) parts correspond to chlorophyll. The accumulation can also be explained by the N/P ratio obtained with the PWW. At higher N/P ratios, lower concentrations of phosphorus are present in the medium, and consequently, the microalgae accumulate (Xin *et al.* 2010).

This laboratory-scale study provided valuable information for large-scale application in countries with sufficient sunlight intensity. The versatility of the microalgae-bacteria systems and their ability to eliminate pollutants from different types of wastewaters without spending energy for aeration was demonstrated. In a system operated for long periods, the biomass can be adapted, which can improve the removal efficiencies respect to those obtained in this study.

CONCLUSIONS

This study assessed the ability of a microalgae-bacteria system to remove carbon, nitrogen and phosphorous using piggery and municipal wastewaters, as well as the digestate from a thermophilic anaerobic reactor. The illuminated reactors inoculated only with activated sludge developed microalgae after 12 operation days. In such reactors, the formation of flocs was observed, which had positive effects on the sedimentation of the biomass; the COD, ammonium and phosphorous removal were as high as 84%, 65% and 77%, respectively. This finding suggests that no microalgae inoculum is necessary to start up a microalgae-bacteria system. The accumulation of lipids in the microalgae biomass was observed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support of the projects DGAPA (PAFIT IN101716) and CONACYT. Gloria Moreno and Jaime Pérez are acknowledged for their technical assistance.

REFERENCES

- Amin, S. 2009 Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Convers. Manag.* 50, 1834–1840. Doi:10.1016/j.enconman.2009.05.001
- APHA, A.P.H.A., AWWA, A.W.W.A., WPCF, W.E.F. 2012 *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22 edn. American Water Works Association, Washington, DC.
- Aslan, S. & Kaplan, I. K. 2006 Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removed from synthetic wastewater by algae. *Ecol. Eng.* 28, 64–70. Doi:10.1016/j.ecoeng.2006.04.005
- Q5 Bañe, M., Stams, A. J. M., De la Rosa, F., García-Encina, P. A. & Muñoz, R. 2011 Assessing the influence of the carbon oxidation-reduction state on organic pollutant biodegradation in algal-bacterial photobioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1527–1536. Doi:10.1007/s00253-011-3204-8
- Cea-Barcía, G., Buitrón, G., Moreno, G. & Kumar, G. 2014 A cost-effective strategy for the bio-prospecting of mixed microalgae with high carbohydrate content: diversity fluctuations in different growth media. *Bioresour. Technol.* 163, 370–373. Doi:10.1016/j.biortech.2014.04.079
- CONAGUA, 2013 Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación. ed Comisión Nacional del Agua, México, p. 298.
- De Godoa, I., Vargas, V. A., Blasco, S., González, M. C. G., Soto, R., García-Encina, P. A., Becerra, E. & Muñoz, R. 2010 A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggy wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresour. Technol.* 101, 5150–5158. Doi:10.1016/j.biortech.2010.02.010
- Duan, T.-T. Y. & Ohmad, J. P. 2010 Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. *J. Appl. Phycol.* 25, 895–901. Doi:10.1007/s10811-010-9608-5
- Eider, S., Karsten, U. & Selig, U. 2006 Phosphorus storage in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cells and its dependence on phosphate supply. *Phycologia* 45, 53–60. Doi:10.22216/0479.1
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M. & García-González, M. C. 2013 Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae-bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresour. Technol.* 135, 598–603. Doi:10.1016/j.biortech.2012.09.029
- Hongyang, S., Yali, Z., Chunmin, Z., Xuefei, Z. & Jimpeng, L. 2011 Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. *Bioresour. Technol.* 102, 9884–9890. Doi:10.1016/j.biortech.2011.08.016
- Muñoz, R. & Guayaso, B. 2006 Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res.* 40, 2799–2815.
- Oswald, W. J., Gotsas, H. B., Golucko, C. G., Kellen, W. R., Glynn, E. F. & Hermann, E. R. 1997 Algae in waste treatment. *Sci. Ind. Wastes* 29, 437–457.
- Park, J. B. K. & Cragg, R. J. 2011 Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use. *Water Sci. Technol.* 63, 2403. Doi:10.2166/wst.2011.200
- Park, J., Jin, H.-P., Lim, B.-R., Park, K.-Y. & Lee, K. 2010 Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 8649–8657. Doi:10.1016/j.biortech.2010.06.142
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G. & Simões, M. 2013 Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5096–5105. Doi:10.1007/s11356-013-1791-x
- Rowell, N. 2009 Biological Phosphorus Removal by Microalgae in Waste Stabilisation Ponds. Doctoral Thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Prescott, G. W. 1984 *How to Know the Freshwater Algae*. WC Brown, Dubuque, Iowa, p. 293.
- Rizzo, D., Stenstrom, M. K. & Larson, L. E. 2008 Aeration of large-scale municipal wastewater treatment plants: state of the art. *Water Sci. Technol.* 57, 973. Doi:10.2166/wst.2008.218
- Sacristán de Alva, M., Luna-Palacio, V. M., Cadena, E. & Ortiz, E. 2013 Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 146, 744–748. Doi:10.1016/j.biortech.2013.07.061
- Sa, Y., Mennerich, A. & Urban, B. 2011 Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Res.* 45, 3351–3358. Doi:10.1016/j.watres.2011.03.046
- Sa, Y., Mennerich, A. & Urban, B. 2012 Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresour. Technol.* 124, 157–162. Doi:10.1016/j.biortech.2012.08.037
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L. & Stensel, H. D. 2002 *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4th edn. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, Boston.
- Uggetti, E., Sialve, B., Ladrille, E. & Steyer, J. P. 2014 Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: the role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresour. Technol.* 152, 437–443.
- Wierzb, I., Feller, A., Lundquist, T. & Nelson, Y. 2009 Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *J. Environ. Eng.* 135, 1115–1122. Doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000129
- Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G. & Ying-Xue, S. 2010 Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 5494–5500. Doi:10.1016/j.biortech.2010.02.016

Xu, J., Zhao, Y., Zhao, G. & Zhang, H. 2013 Nutrient removal and biogas upgrading by integrating freshwater algae cultivation with piggery anaerobic digester liquid treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6493–6501.

Zhu, L. D., Wang, Z. M., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Peng, P. Z. & Yuan, Z. H. 2013 Nutrient removal and biohydrogen production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Res.* 47, 4294–4302.

First received 30 June 2015; accepted in revised form 8 October 2015. Available online 26 October 2015