04-031

EFFECT OF LIGHT INTENSITY ON NUTRIENT REMOVAL FROM AN ANAEROBIC MEMBRANE BIOREACTOR EFFLUENT WITH MICROALGAE

González Camejo, Josué [1]; Murgui Mezquita, Mónica [2]; Barat Baviera, Ramón [1]; Seco Torrecillas, Aurora [2]; Ferrer Polo, José [1]

[1] Universitat Politècnica de València, [2] Universidad de Valencia

In wastewater treatment with microalgae light is the most important parameter. It has to be supplied at the proper intensity to achieve their maximum nutrient removal performance. Three experiments were carried out with different light intensity (216, 432 and 648 µmolm-2s-1) in an indigenous microalgal-bacterial culture dominated by Scenedemus sp., ramaining constant pH (7.5 ± 0.3), solids retention time and hydraulic retention time (STR=HRT=8 days) and temperature (22 ± 1ºC). Ammonium removal reached 100% in all the experiments. Nevertheless, the presence of nitrite and nitrate at low light intensity was observed due to the elimination of some quantity of ammonium by nitrification. This fact confirmed the competence in the ammonium removal between microalgae and nitrifying bacteria. Regarding phosphorous, removal rate was 96% at low light intensity and 100% in the other experiments. It was concluded that an increase of light intensity benefits microalgae growth therefore reducing the competence with nitrifying bacteria, diminishing the nitrification process and accomplishing a higher soluble nitrogen removal rate. Besides, this light intensity raise allowed a higher phosphorus removal rate as microalgae are able to subtract an upper amount of this element than nitrifying bacteria.

Keywords: *"microalgae";"light intensity";"photobioreactor";"nutrient removal";"microalgae-bacteria competence"*

INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA EN LA ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DEL EFLUENTE DE UN REACTOR ANAEROBIO DE MEMBRANAS MEDIANTE MICROALGAS

En el tratamiento de aguas residuales con microalgas la luz es el parámetro más importante. Ésta debe aportarse a la intensidad adecuada para conseguir el rendimiento de eliminación máximo. Se realizaron tres experimentos a distintas intensidades lumínicas (216, 432 y 648 µmolm-2s-1) con un cultivo mixto de microalgas-bacterias dominado por Scenedemus sp., manteniendo constante el pH (7.5±0.3), tiempo de retención celular e hidráulico (TRC=TRH=8 días) y la temperatura (22±1ºC). La eliminación de amonio llegó al 100% en todos los experimentos, aunque se detectó presencia de nitrito y nitrato con la intensidad lumínica más baja, debido a que parte del amonio era eliminado por nitrificación. Esto confirmó la competencia por amonio entre algas y bacterias nitrificantes. En cuanto al fósforo, se alcanzó un 96% de eliminación a intensidad más baja y un 100% en el resto de experimentos. Se observó que un aumento de la intensidad lumínica favorece el crecimiento de las microalgas reduciendo así la competencia con las bacterias nitrificantes, disminuyendo la nitrificación y logrando una mayor eliminación de nitrógeno soluble del sistema. Además, este incremento de intensidad permitió mayor eliminación de fósforo, ya que las microalgas son capaces de eliminar una cantidad superior de este elemento que las bacterias.

Palabras clave: *"microalgas";"intensidad lumínica";"fotobioreactor";"eliminación de nutrientes";"competencia microalgas-bacterias"*

Correspondencia: Josué González Camejo jogonca4@upv.es

1. Introducción

Las microalgas ofrecen una solución sostenible para el tratamiento terciario de aguas residuales debido a su habilidad para eliminar nitrógeno y fósforo inorgánico. Al mismo tiempo, generan biomasa de alto valor añadido que puede emplearse para fabricar biocombustible (Chisti, 2007) o biogás (Collet & Hélias, 2011). Además, al tratarse de organismos fotosintéticos, son sumideros de dióxido de carbono; es decir, reducen la cantidad de este gas de efecto invernadero en la atmósfera.

Existen escasos estudios en los que se pruebe la viabilidad de acoplar el efluente de un Bioreactor Anaerobio de Membranas (AnMBR) con el posterior tratamiento con microalgas para la eliminación de nutrientes (Ruiz-Martínez et al., 2012). La tecnología AnMBR logra un efluente de gran calidad en lo referente a sólidos suspendidos totales (SST) y demanda química de oxígeno (DQO), al tiempo que produce una menor cantidad de fangos mientras genera biogás, lo que mejora el balance energético del proceso (Giménez et al., 2011). Sin embargo, este sistema no es capaz de eliminar de forma eficiente los nutrientes inorgánicos del agua (Razaviarani et al., 2013), que no pueden ser directamente emitidos a los cauces naturales porque pueden producir eutrofización, lo que reduce la biodiversidad del ecosistema acuático y reduce la calidad del agua.

El contenido en nitrógeno de las microalgas se encuentra en el intervalo 4-9% del contenido en materia seca (Reynolds, 2006). En general, las microalgas prefieren el amonio como fuente primaria de nitrógeno, ya que es más fácilmente asimilable (Wang et al. 2010, Znad et al. 2012); sin embargo, éstas emplean otras fuentes, como nitratos y nitritos en ausencia de amonio (Hii et al. 2011). En cuanto al fósforo, las microalgas aproximadamente poseen un 1% en peso seco (Lund, 1965). En cambio, como estrategia para asegurar el suministro de fósforo en momentos de escasez, las microalgas son capaces de acumular grandes cantidades de fósforo como polifosfato cuando existe una alta concentración en el medio. Este polifosfato puede ser empleado por las microalgas cuando el fósforo escasee (Vonshak, 1997).

El crecimiento de las algas y el consumo de nutrientes no sólo dependen de la disponibilidad de nutrientes en el medio; también de factores físicos como la intensidad de luz, la temperatura, el pH y de factores biológicos, como la competencia por amonio entre las microalgas y las bacterias nitrificantes.

La luz es el parámetro más importante relacionado con el crecimiento de las microalgas (Jonker & Faaij, 2013). Ésta debe suministrarse a la intensidad, duración y con la longitud de onda adecuadas para conseguir la productividad de biomasa algal máxima y la eliminación de nutrientes más eficiente (Termini et al. 2011). Si la intensidad de luz aplicada al cultivo es baja, debido a efectos ópticos como la dispersión y el oscurecimiento, la luz disponible para el desarrollo de las microalgas queda mayormente restringida a las zonas cercanas a la superficie iluminada (Znad et al., 2012), con lo que se produce fotolimitación. Por el contrario, una intensidad de luz demasiado alta puede dañar algunos centros de reacción del fotosistema II (PSII), lo que lleva a una reducción de la fijación del carbono necesario para realizar la fotosíntesis, provocando fotoinhibición (Jordan, 1996).

La temperatura es un factor muy sensible en el crecimiento de las microalgas y en las actividades metabólicas de las células algales. Generalmente, las temperaturas altas aceleran las actividades enzimáticas, particularmente aquellas implicadas en el ciclo de Calvin (Falkowski & Raven, 2007). En cambio, la velocidad de procesos como la fotosíntesis, la respiración o el crecimiento se reducen si se supera el valor óptimo de temperatura, llegando incluso a provocar la muerte de las células (Béchet et al., 2010). De hecho, en un estudio realizado por Chen et al. (2011) con las especies *Nannochloropsis*

oculata, Isochrysis aff. galbana, Tetraselmis chui y *Chaetoceros muelleri*, sólo ésta última fue capaz de crecer a una temperatura de 35 ºC. Li et al. (2010) observaron que *Scenedesmus sp*. LX1 era capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (10-30ºC), obteniendo el máximo valor de la velocidad de crecimiento a 25ºC.

Respecto a los factores biológicos, las Bacterias Amoniooxidantes (AOB) son el principal competidor de las microalgas por el consumo de amonio. Las bacterias AOB transforman amonio en nitrito mientras que las Bacterias Nitritooxiantes (NOB) llevan a cabo el segundo paso de la nitrificación oxidando nitrito a nitrato. Meseck et al. (2007) concluyeron que la presencia de bacterias nitrificantes en un cultivo de microalgas *Tetraselmis chui* provocó una disminución en su velocidad de crecimiento debido a su competición por nutrientes. Sin embargo, Risgaard-Petersen et al. (2004) observaron que las microalgas son la especie dominante en un cultivo algas-bacterias sin limitación de amonio, ya que crecen más rápido.

Tanto las microalgas como de las bacterias nitrificantes poseen similares intervalos de pH óptimos para el crecimiento. Painter y Loveless (1983) y Antoniou et al. (1990) determinaron que las bacterias nitrificantes crecían de manera óptima con valores de pH comprendidos entre 7,5-8,5. Por otro lado, la mayoría de especies de microalgas crecen más rápido con valores de pH entre 7,0 y 8,0. Posadas et al. (2015) observaron que la influencia de pH era despreciable en el rango de valores 7-9 respecto al rendimiento en el tratamiento de aguas residuales con *Scenedesmus sp.*

2. Objetivo

El objetivo del presente estudio es analizar el efecto de la intensidad de luz y de la temperatura en la eliminación de nutrientes del efluente de un reactor AnMBR mediante un cultivo mixto de microalgas-bacterias dominado por la especie *Scenedemus sp.,* así como su efecto en la competencia entre algas y bacterias nitrificantes.

3. Metodología

3.1. Inóculo y Condiciones Previas al Cultivo

Las microalgas usadas como inóculo se obtuvieron a partir de las paredes del decantador secundario de la EDAR del Barranco de Carraixet (Alboraya-Valencia, España). Consistía en un ecosistema complejo que contenía microalgas y bacterias (incluido cianobacterias). Previo a la siembra del fotobioreactor, el cultivo se aclimató al alimento en matraces de 0.25, 1 y 2L en un cultivo en batch con iluminación continua (23 μE $m^{-2} \cdot s^{-1}$).

El alimento consistía en un medio proveniente del efluente de una planta piloto AnMBR, con una carga de nutrientes de 47.8 mg $N\text{-}NH_4 \cdot L^{-1}$ y 6.1 mg $P\text{-}PO_4 \cdot L^{-1}$. Los detalles del funcionamiento de esta planta piloto han sido descritos previamente por Giménez et al. (2011) y Robles et al. (2015). La temperatura y el pH de los matraces se mantuvieron a 22ºC y 7.5, respectivamente. Bajo las citadas condiciones de operación se observó una pérdida de la biodiversidad del cultivo y *Scenedesmus* sp. se convirtió en el género dominante dentro del FBR. Existe amplio conocimiento acerca de la adaptabilidad del género *Scenedesmus* para crecer en aguas residuales (Kesaano & Sims, 2014).

3.2. Fotobioreactor: Descripción, Control y Modo de Operación.

El fotobioreactor a escala de laboratorio (FBR) consistía en un tanque cilíndrico transparente (20 cm de diámetro interno) con un volumen útil de 8L (ver Figura 1a). Para conseguir una correcta homogeneización y evitar la incrustación de algas en las paredes y el fondo del FBR, el cultivo se agitaba con un flujo de aire que circulaba a una velocidad de 1.0–1.2 $L \cdot min^{-1}$ a través de cuatro difusores de burbuja fina que estaban colocados en el fondo del

FBR. Para mantener un valor de pH fijo (7.5 ± 0.3), en el FBR se inyectaba CO_2 (99.9%) al caudal de aire desde una bala presurizada a 1.5 bar. Para optimizar la cantidad de CO_2 introducido al sistema, se colocó una tapa en la parte superior del FBR para recircular el aire retenido en el espacio entre la tapa y el cultivo.

Los parámetros físico-químicos del sistema, como la temperatura, pH y el oxígeno disuelto se monitorizaban en tiempo real mediante sondas. Para la medición de pH se utilizó un medidor multiparamétrico de la marca comercial Consort (CONSORT C832, Bélgica). Para la medición de la temperatura y el oxígeno disuelto se empleó un analizador multiparamétrico 4-star (Thermo Scientific) conectado a una sonda 087003RDO. Ambos equipos de medida se conectaron a un ordenador personal a través de un software de adquisición de datos.

El FBR operó de forma semicontinua sin separación de biomasa, con lo que el tiempo de retención hidráulico (TRH) coincidía con el tiempo de retención celular (TRC). El alimento procedía del mismo efluente del sistema AnMBR usado en el inóculo. Para mantener un TRC y TRH constante de 8 días, cada seis horas (4 alimentaciones diarias), una bomba peristáltica controlada mediante ordenador añadía 0.25 L de alimento. El volumen total del FBR permaneció constante gracias a un rebose situado en la parte superior.

3.3. Métodos Analíticos

Se evaluó la eliminación de nutrientes mediante el cultivo de microalgas mediante la medida diaria de la concentración de nitrógeno y fósforo inorgánico en la corriente influente (alimento) y en la fracción soluble del efluente del FBR (purga). Esta fracción soluble se obtenía mediante filtrado de la muestra de cultivo mediante filtros de fibra de vidrio con 0,45 mm de diámetro de poro. Los Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Volátiles (SSV), así como la concentración de clorofila se determinaron tres veces por semana para verificar la producción de biomasa y el contenido de clorofila. Los sólidos, la clorofila y los nutrientes (amonio, nitrito, nitrato y fosfato) se analizaron según lo establecido en Standard Methods (APHA, 2005). La concentración de clorofila total se obtuvo mediante el método tricromático, sumando el contenido de clorofila *a, b* y *c*.

3.4. Determinación de los Rendimientos de Eliminación y Productividad de Biomasa

El rendimiento del proceso se caracterizó por los rendimientos de eliminación obtenidos en el estado estacionario. Todos los rendimientos se calcularon diariamente, considerando la diferencia entre la corriente influente y efluente. El Rendimiento de Eliminación de Amonio (REA) correspondiente al porcentaje de eliminación de amonio eliminado tanto por las microalgas como por las bacterias AOB se calculó mediante la ecuación (1); mientras que el Rendimiento de Eliminación de Amonio mediante microalgas (REAm) correspondía al amonio eliminado únicamente mediante las microalgas. Para calcular REAm se consideró que todo el amonio consumido por las bacterias se había transformado en nitrito o nitrato (ver ecuación (2)). El Rendimiento de Eliminación de Fósforo (REF) era el correspondiente al porcentaje de eliminación de fósforo asimilado por las microalgas. Debido a que las microalgas eran el microorganismo dominante en el cultivo en los experimentos 1, 2 y 3, se asumió que la actividad de las microalgas era la única responsable de la eliminación del fósforo, y por tanto se calculó REF de forma análoga a REA. En cambio, en el experimento 4 se consideró una ligera variación (ver apartado *Efecto de la Temperatura*).

$$REA(\%) = \frac{(E_{NH4} - S_{NH4})}{\mathrm{E}_{NH4}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$REAm(\%) = \frac{(E_{NH4} - S_{NH4} - S_{NO2} - S_{NO3})}{E_{NH4}} \cdot 100 \quad (2)$$

Donde E corresponde a la corriente de entrada ($mg \cdot L^{-1}$) y S a la corriente de salida ($mg \cdot L^{-1}$).

Otro parámetro interesante para estudiar el buen funcionamiento del FBR es la productividad de biomasa (P). Este parámetro se calculó mediante la ecuación (3).

$$P(mgSSV \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}) = Q_{purga} \cdot SSV \cdot V_{FBR}^{-1} \quad (3)$$

Donde Q_{purga} corresponde al volumen diario de purga, SSV a la concentración de sólidos suspendidos volátiles y V_{FBR} al volumen útil del FBR.

3.5. Métodos Microbiológicos.

El número de células eucariotas se determinó mediante microscopía de epifluorescencia empleando 1000 aumentos y contando al menos 300 células y 100 de la especie o género más abundante para obtener un error menor al 20% (Pachés et al., 2012). La técnica FISH (Hibridación Fluorescente In Situ) se realizó una vez por semana para detectar la presencia de bacterias nitrificantes (AOB y NOB). La secuencia de las sondas de oligonucleótidos en este estudio fueron: NSO1125 para la detección de la Beta-Proteobacteria AOB, Ntspa712 para la mayoría de los miembros del filo Nitrospirae, NIT 3 para *Nitrobacter spp*; y la sonda EUBmix para el dominio Eubacteria, que consiste en una mezcla de EUB338, EUB338II and EUB338III. El protocolo necesario para llevar a cabo esta técnica se describe en Reyes et al. (2015). Las muestras hibridadas se observaron con un microscopio de epifluorescencia (Leica DM2500).

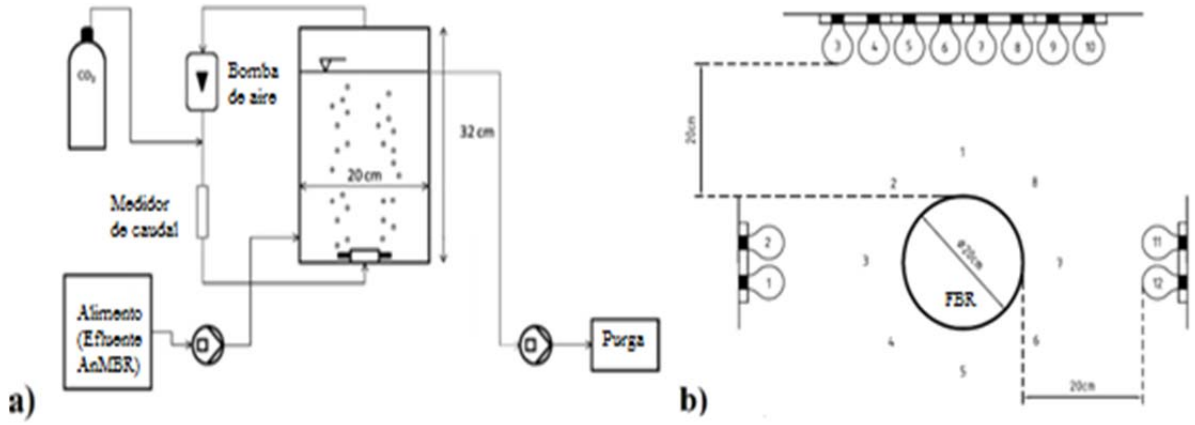
3.6. Diseño Experimental

Se llevaron a cabo 3 experimentos con 3 intensidades de luz diferentes: 23, 49 y 69 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, respectivamente; manteniendo constante la temperatura (22.3 ± 0.5 ºC), el pH (7.5 ± 0.3) y el resto de condiciones de operación: TRC y TRH de 8 días y carga de amonio y fósforo de 57.4 ± 2.2 mg $N\text{-}NH_4 \cdot L^{-1}$ y 7.0 ± 0.9 mg $P\text{-}PO_4 \cdot L^{-1}$, respectivamente. Además, se realizó un cuarto experimento en el que se mantuvo la misma intensidad de luz que en el experimento 3 (69 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), pero donde varió la temperatura (de 22.3 a 28.4ºC). Las condiciones de luz y temperatura, así como de oxígeno disuelto en los cuatro experimentos se muestran en la Tabla 1.

Como fuente de luz se colocaron lámparas fluorescentes (Sylvania Grolux, 18 W) en posición vertical alrededor del FBR a 20 cm de distancia como muestra la Figura 1b. Se encendieron 4 lámparas en el experimento 1 (posiciones 1, 2, 11 y 12); cuatro lámparas más se encendieron en el experimento 2 (posiciones: 5, 6, 7 y 8); y todas las lámparas se emplearon en los experimentos 3 y 4. Las lámparas fluorescentes permanecieron encendidas de forma continua: 24 horas de luz al día. Los datos correspondientes a la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) se midieron con un foto-sensor (HOBO_ Smart Sensor, s-lia-m003). Estos valores se calcularon como la media de los valores PAR medidos cada 45º (8 posiciones diferentes: ver Figura 1b).

Para controlar la temperatura en los experimentos 1, 2 y 3, el FBR se mantuvo dentro de una cámara climática que mantenía constante la temperatura. Sin embargo, en el experimento 4 se inhabilitó el control de la temperatura para estudiar el efecto de esta variable sobre el proceso.

Figura 1: Diseño experimental



a) Fotobioreactor cilíndrico a escala laboratorio (Ruiz-Martínez et al., 2012); b) Distribución de lámparas alrededor del FBR y posiciones del sensor PAR para la medición de la intensidad de luz.

Tabla 1: Condiciones de operación del fotobioreactor durante los experimentos.

Experimento	Días de operación	Intensidad de luz ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$)	Temperatura (ºC)	Oxígeno disuelto ($mg\ L^{-1}$)
1	18	23 ± 3	22.3 ± 0.3	8.5 ± 0.3
2	28	49 ± 7	22.3 ± 0.5	8.7 ± 0.2
3	34	69 ± 9	22.3 ± 0.5	9.1 ± 0.2
4	18	69 ± 9	28.8 ± 2.3	7.8 ± 0.4

4. Resultados

4.1. Efecto de la Intensidad Lumínica

El objetivo del primer grupo de experimentos (1, 2 y 3) fue evaluar la eliminación de nutrientes bajo tres intensidades lumínicas diferentes (23, 49 y 69 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, respectivamente), manteniendo la temperatura de trabajo constante. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos.

El Rendimiento de Eliminación de Amonio (REA) alcanzó valores cercanos al 100% en los tres experimentos (ver Tabla 2). Sin embargo, durante todo el experimento 1 se acumuló dentro del FBR tanto nitrito como nitrato, lo que era indicador que se estaba produciendo nitrificación por parte de las bacterias. Aunque algunos estudios señalan que las microalgas son capaces de consumir como fuente de nitrógeno tanto amonio como nitratos (Li, Hu & Zhang, 2011), en estos experimentos no se observó consumo de nitratos (datos no incluidos). En todos los experimentos el fósforo añadido con cada alimentación se consumía en la primera hora del ciclo de reacción tras la alimentación (datos no incluidos). Por tanto, el FBR estaba funcionando durante gran parte del tiempo en condiciones de limitación de fósforo. Las microalgas necesitan este fósforo para, entre otras cosas, sintetizar moléculas de ATP que utilizan como fuente de energía. Además, el consumo de nitritos y nitratos por parte de las microalgas requiere un aporte energético extra, ya que deben ser reducidos previamente por las enzimas nitrato y nitrito reductasa para su asimilación (Reynolds, 2006). En consecuencia, es posible que las microalgas del cultivo en estudio no poseyeran suficiente energía para consumir los nitritos y nitratos por culpa de la escasez de fósforo.

Por consiguiente, teniendo en cuenta la presencia de nitritos y nitratos y el hecho que el amonio fue la única fuente de nitrógeno para las microalgas, se consideró relevante calcular el Rendimiento de Eliminación de Amonio únicamente por las microalgas (REAm). Este rendimiento fue significativamente inferior en el experimento 1, incrementándose al aumentar la intensidad de luz en los experimentos 2 y 3 (74, 98 y 99%, respectivamente, ver Tabla 2). Este hecho confirmó la competición entre las microalgas y las bacterias nitrificantes por el amonio, que se producía de manera más notoria con una intensidad de luz baja. La presencia de bacterias nitrificantes en el inóculo junto con las condiciones de trabajo (temperatura, pH, oxígeno disuelto y disponibilidad de nutrientes) permitieron el crecimiento de estos organismos, provocando la acumulación de nitritos y nitratos en el medio anteriormente mencionada. En el experimento 2, tras aumentar la intensidad de luz aplicada al FBR, se observó una reducción inmediata de la concentración de nitritos y nitratos, llegando a concentraciones inferiores a 0.5 $mgN \cdot L^{-1}$. Esta situación se mantuvo durante el experimento 3 (ver Figura 2). Por esta razón, se asume que la competición por amonio no tuvo lugar en los experimentos 2 y 3, con una iluminación de 49 y 69 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, respectivamente. Se deduce, por tanto, que bajo esas condiciones de iluminación las algas eran más competitivas que las bacterias AOB en la toma de amonio y la nitrificación no tenía lugar de forma significativa. En lo referente al fósforo, se alcanzó un alto Rendimiento de Eliminación de Fósforo (REF) en todos los experimentos: 98, 99 y 99% en experimentos 1, 2 y 3 respectivamente.

En conclusión, se deduce que un incremento de la intensidad de luz conlleva un aumento del REAm gracias a la limitación del proceso de nitrificación que provoca el desarrollo de las microalgas, obteniendo un cultivo más eficiente en la eliminación de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales. Esta afirmación se corrobora mediante el hecho que la densidad de las células eucariotas en el cultivo aumentó al aumentar la intensidad lumínica: 6.6, 11.9 y 13.5 ($x10^9$) $cels \cdot L^{-1}$, respectivamente (ver Tabla 2). Los datos obtenidos para las tres intensidades lumínicas en estudio concuerdan con los presentados por Hu et al. (2005), que concluyeron que la irradiación óptima para *Scenedesmus quadricauda* estaba en el rango 60‑70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

El recuento celular no reveló ninguna variación en la composición del cultivo, por lo que *Scenedesmus* sp. se mantuvo como género dominante (>99% en todos los experimentos). La población bacteriana fue despreciable en comparación con la población de microalgas (ver Figuras 3a y 3b).

Los datos de sólidos suspendidos siguieron la misma evolución que la concentración de células, obteniendo una mayor cantidad de sólidos al aumentar la luz: 543, 830 y 860 $mgSST \cdot L^{-1}$, respectivamente (ver Tabla 2). En cuanto a la productividad de biomasa se siguió una evolución similar: 50.5, 81.0, 93.5 $mgSSV \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ para los experimentos 1, 2 y 3, respectivamente. El mayor porcentaje de sólidos suspendidos volátiles se alcanzó en el experimento 3 (91%).

El contenido de clorofila respecto a la biomasa se redujo cuando aumentaba la intensidad de luz (ver Tabla 2). Esto concuerda con lo expuesto por Chen et al. (2011), que sostenían que las algas se adaptan a los cambios de luz variando el contenido de clorofila de sus células. A bajos niveles de irradiación, uno de los mecanismos para mejorar el potencial fotosintético es la síntesis de una mayor cantidad de clorofila para aumentar la capacidad de absorción de fotones (Reynolds, 2006); por tanto, la relación clorofila-sólidos volátiles debe ser mayor a menor intensidad de luz. Por el contrario, a intensidades altas, las algas reducen el ratio de clorofila-carbono para disminuir la absorción de fotones y protegerse así contra la fotoinhibición (Chen et al., 2011).

Tabla 2: Valores medios ± desviaciones estándar en estado estacionario (Exp. 1, 2 y 3) y valores al final del experimento 4.

Parámetro	Units	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
SST	mg L^{-1}	543 ± 10	830 ± 45	860 ± 62	549
SSV	%	79 ± 3	88 ± 4	91 ± 6	79
Cél. eucariotas (x10^9)	Céls·L^{-1}	6.6 ± 0.0	11.9 ± 1.6	13.5 ± 3.2	5.37
REAm	%	74 ± 3	98 ± 4	99 ± 0,4	73
REA	%	97 ± 5	100 ± 0	100 ± 0	99
REF	%	98 ± 1	99 ± 1	99 ± 1	98 (73)*
Clorofila total	mgClgSSV^{-1}	4.18 ± 0.99	2.44 ± 0.52	1.88 ± 0.44	3.50
Productividad	mgSSV·L^{-1}·d^{-1}	50.5 ± 9.6	81.0 ± 8.3	93.5 ± 8.5	53.4

*Entre paréntesis, REF de microalgas.

Figura 2: Evolución de la concentración de nutrientes y la temperatura durante todo el periodo experimental.

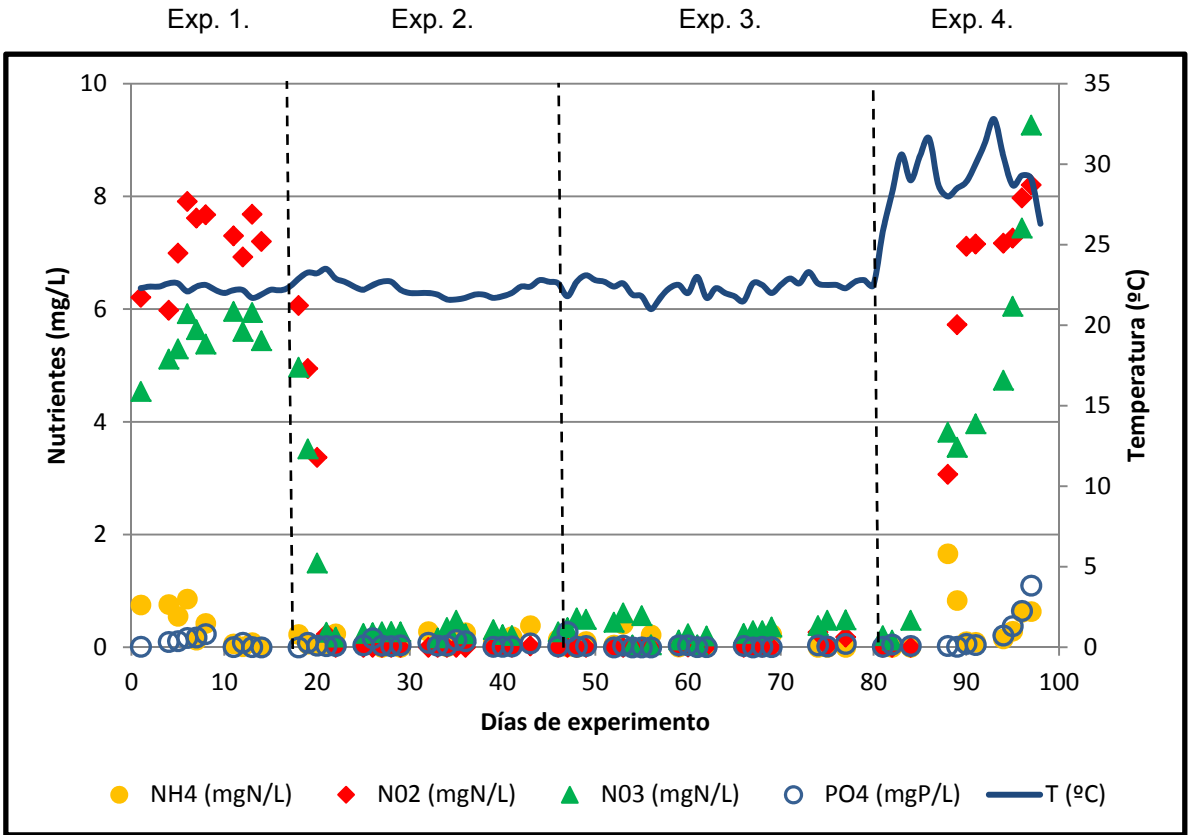
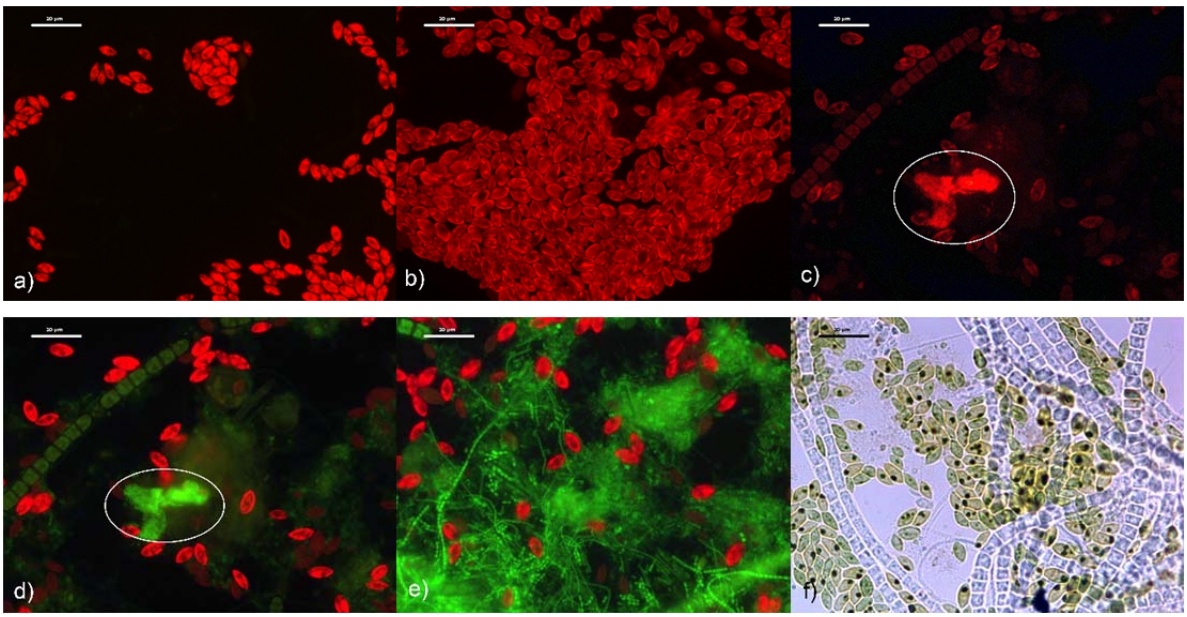


Figura 3: Imágenes obtenidas mediante método FISH.



Muestras observadas bajo microscopio de epifluorescencia (Leica DM2500/ DFC420c cámara digital) usando un objetivo 63x . Barra de escala = 20µm.

(a, b) Exp. 2, *Scenedesmus* sp. como especie dominante; (c) Exp. 4, muestra hibridada con la sonda NSO1225 (rojo). Se señala un grupo de bacterias AOB señalada mediante un círculo blanco; (d) Exp. 4, muestra hibridada con sonda EUBMIX: EUB 338 I+ EUB 338 II + EUB 338 III (verde); (e) Exp. 4, muestra hibridada con sonda EUBMIX (verde) permite identificar diversos grupos de bacterias; (f) Exp. 4, imagen en campo claro mostrando la coexistencia de *Scendesmus* sp. y *Cianobacteria*.

4.2. Efecto de la Temperatura

El objetivo de comparar los experimentos 3 y 4 era estudiar cómo afectaba la temperatura con la misma intensidad de luz incidente: 69 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Durante el experimento 3, la temperatura se mantuvo bajo control a 22.3 ± 0.5ºC. En el experimento 4, se desconectó el control de temperatura y ésta varió libremente según los cambios en las condiciones ambientales del laboratorio (28.8 ± 2.3ºC, ver Figura 2). En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos al final del experimento 4.

Se observó un incremento continuo de la concentración de nitrito y nitrato después de la desconexión del control de temperatura (ver Figura 2). REA permaneció cercano al 100%, al igual que en el experimento 3, pero considerando sólo la eliminación mediante microalgas (REAm), se llegó a obtener un valor mínimo de 73% al final del experimento 4.

Respecto al cultivo microalgas-bacterias, se detectó un cambio considerable en el experimento 4. A pesar que *Scenedesmus* sp. continuaba siendo el género de microalga dominante (>99%), su densidad se redujo en un 72%, desde un valor máximo en el experimento 3 de $19.2 \cdot 10^9$ céls$\cdot L^{-1}$ hasta un valor mínimo en el experimento 4 de $5.37 \cdot 10^9$ céls$\cdot L^{-1}$. Además, se observó una proliferación considerable de distintos grupos de bacterias. La técnica FISH permitió identificar bacterias AOB (ver Figura 3c), así como detectar (pero no identificar) la presencia de otro tipo de bacteria (ver Figuras 3d y 3e). La visualización mediante microscopía de campo claro fue suficiente para observar el incremento en el número de *Cianobacterias* filamentosas en el experimento 4 (ver Figura 3f). Esto podría explicar el aumento en el contenido de clorofila al final del experimento 4 hasta 3.50 mg$\cdot$gSSV^{-1} (ver Tabla 2).

Debido a esta variación sustancial en el cultivo del FBR, se calculó de forma separada la cantidad de fósforo eliminado por las microalgas y por las bacterias. Considerando que el ratio de N/P consumido por las microalgas en el experimento 3 permaneció constante (7.70), y que el nitrógeno consumido por las microalgas era el correspondiente a REAm, REF mediante microalgas disminuyó hasta el 73% al final del experimento 4. Sin embargo, REF total (debido a microalgas y bacterias) alcanzó en ese momento un 98%.

SST y %SSV disminuyeron en el experimento 4 hasta valores mínimos de 519 mgSST·L^{-1} y 75 %, respectivamente. Este hecho hace pensar que el aumento de la temperatura en el experimento 4, junto con la proliferación de bacterias conllevó al deterioro del cultivo de microalgas.

Los resultados obtenidos en los experimentos 3 y 4 sugieren que la temperatura alta redujo la actividad metabólica de las microalgas, ya que, a pesar de la disponibilidad de nitrógeno (como nitrato) y de fósforo, la densidad de células de microalgas disminuyó y el cultivo pasó a estar dominado por las bacterias.

Breuer et al. (2013) obtuvieron una temperatura óptima para el crecimiento de *S. obliquus* por encima de los 27,5 ºC. Por otro lado, Cabello et al. (2015) verificaron que este óptimo dependía de la disponibilidad de nutrientes para *S. obtusiusculus* (35 ºC bajo condiciones normales y 28.5 ºC bajo condiciones de limitación). En consecuencia, parece que un cultivo puro de microalgas es capaz de crecer en el rango de temperaturas registrado en el experimento 4. En cambio, el presente estudio se realizó con un cultivo mixto de microalgas-bacterias, en el que el equilibrio establecido entre estos dos grupos de microorganismos es delicado. En el experimento 4, la competencia entre microalgas y bacterias provocó la acumulación continua en el sistema de nitritos, nitratos e incluso de fosfatos, lo era indicador que las bacterias estaban desplazando totalmente a las microalgas. Por el contrario, en el experimento 1 la competencia microalgas-bacterias llegó a un equilibrio, de forma que la concentración de nitritos y nitratos permaneció aproximadamente constante y se consiguió eliminar todo el fósforo, al contrario que en el experimento 4 (ver Figura 2).

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio prueban que la presencia de bacterias nitrificantes implica una competición por amonio entre microalgas y bacterias, reduciendo la eficacia del cultivo en la eliminación de nutrientes de las aguas residuales.

Se alcanzaron rendimientos de eliminación muy altos (cercanos al 100%) bajo una iluminación media de 49-69 µE·m^{-2}·s^{-1} y temperatura estable (22 ºC). Por tanto, con control de la nitrificación, se podría emplear un cultivo de microalgas como tratamiento terciario para cumplir con los requisitos de emisión de nutrientes que marca la Directiva Europea 91/271/CEE Sobre el Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas. Para poblaciones entre 10 000 y 100 000 habitantes equivalentes estos límites son 15 mgN·L^{-1} y 2 mgP·L^{-1}.

Se detectó que bajo la misma temperatura, las algas se mostraban más competitivas que las bacterias cuando se aumentaba la intensidad de luz. Sin embargo, con igual intensidad lumínica las bacterias dominaban el cultivo a temperaturas altas. Deberían realizarse ensayos futuros para confirmar si un incremento gradual de la temperatura conjuntamente con la intensidad de luz supondría el desarrollo de un cultivo de microalgas más robusto, reduciendo la competición de las bacterias nitrificantes por el amonio.

6. Referencias

Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., & Svoronos, S.A. (1990). Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Research*, *24* (1), 97–101

APHA, AWWA, & WPCF (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater.* (21 edición). Washington, DC, Estados Unidos: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF).

Béchet, Q., Shilton, A., Fringer, O.B., Muñoz, R., & Guieysse, B. (2010). Mechanistic modeling of broth temperature in outdoor photobioreactors. *Environmental Science Technology*, *44* (6), 2197–2203.

Breuer, G., Lamers P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., & Wijffels, R.H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technolo*gy, *143*, 1–9.

Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., & Morales, M. (2015). Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology,* 181, 128–135.

Chen, X., Goh, Q.Y., Tan, W., Hossain, I., Chen, W.N., & Lau, R. (2011). Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource Technology*, *102*, 6005–6012.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*, 294-306.

Collet, P., & Hélias, A. (2011) Life Cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology, 102*, 207-214.

Falkowski, P.G., & Raven, J.A. (2007). *Aquatic Photosynthesis* (Edición 2). Princeton, Estados Unidos: Princeton University Press.

Giménez J.B., Robles, A., Carretero, L., Durán, F., Ruano, M.V., Gatti, M.N., Ribes, J., Ferrer, J., & Seco, A. (2011). Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology*, *102*, 8799-8806.

Hii, Y.S., Soo, C.L., Chuah, T. S., Mohd-Azmi, A., & Abol-Munafi, A. B. (2011). Interactive effect of ammonia and nitrate in the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp. *Journal of Sustainability Science and Management*, *6*, 60-68.

Hu, X.Z., Jing, X.C., Zhu, Z.S., Ma, Z.Y., & Yi, W.L. (2005). The primer detecting of photocompete and simulate predominance of *Micorcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda* in TaiHu. *Journal of Agro-Environment Science*, *24*, 538–643.

Jonker, J.G.G., & Faaij, A.P.C. (2013). Techno-economic assessment of microalgae as feedstock for renewable bio-energy production. *Applied Energy*, *102*, 461-475.

Jordan, B. (1996). The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Advances in Botanical Research*, *22*, 97–162.

Kesaano, M., & Sims, R.C. (2014). Algal biofilm based technology for wastewater treatment. *Algal Research*, *5*, 231–240

Li, X., Hu, H.Y., Gan, K., & Yan, J. (2010). Growth and nutrients removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering, 36*, 379–381.

Li, X., Hu, H.Y., & Zhang, Y.P. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp*. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology, 102*, 3098–3102

Lund, J. W. G. (1965). The ecology of the freshwater phytoplankton. *Biological Reviews*, *40*, 231–93.

Meseck, S. L., Smith, B. C., Wikfors, G. H., Alix, J. H., & Kapareiko, D. (2007). Nutrient interactions between phytoplankton and bacterioplankton under different carbon dioxide regimes. *Journal of Applied Phycology*, *19*, 229-237.

Pachés, M., Romero, I., Hermosilla, Z., & Martinez-Guijarro, R. (2012). PHYMED: An ecological classification system for the Water Framework Directive based on phytoplankton community composition. *Ecological Indicators, 19*, 15-23.

Painter, H.A., & Loveless, J.E. (1983) Effect of temperature and pH value on the growth-rate constants of nitrifying bacteria in the activated sludge process. *Water Research, 17* (3), 237–248.

Posadas, E., Morales, M.M., Gómez, C., Acién, F. G., & Muñoz, R. (2015) Influence of pH and CO2 source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chem. Eng. J.*, *265*, 239-248.

Razaviarani, V., Buchanan, I.D., Malik, S., & Katambula, H. (2013). Pilot-scale anaerobic codigestion of municipal wastewater sludge with restaurant grease trap waste, *Journal of Environmental Management*, *123*, 26–33.

Reyes, M., Borrás, L., Seco, A., & Ferrer, J. (2015). Identification and quantification of microbial populations in activated sludge and anaerobic digestion processes. *Environmental Technology, 36***,** 45-53.

Reynolds, C.S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation)*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.

Risgaard-Petersen, N., Nicolaisen, M.H., Revsbech, N.P., & Lomstein, B.A. (2004). Competition between Ammonia-Oxidizing Bacteria and Benthic Microalgae. *Applied Environmental Microbiology*, *70* (9), 5528-5537.

Robles, Á., Durán, F., Ruano, M. V., Ribes, J., Rosado, A., Seco, A., & Ferrer, J. (2015). Instrumentation, control, and automation for submerged anaerobic membrane bioreactors. *Environmental Technology, 36* (14), 1795-1806.

Ruiz-Martínez, A., Martín García, N., Romero, I., Seco, A., & Ferrer, J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource Technology, 126*, 247–253.

Termini, I.D., Prassone, A., Cattaneo, C., & Rovatti, M. (2011). On the nitrogen and phosphorus removal in algal photobioreactors. *Ecological Engineering*, *37*, 976–980.

Unión Europea. Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre tratamiento de las aguas residuales urbanas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, 30 de mayo de 1991, núm. 135, pp. 40-52.

Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (arthrospira). Physiology, cell-biology and biotechnology.* Londres, Reino Unido: Taylor & Francis Ltd.

Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R., (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162* (4), 1174-1186.

Znad, H., Naderi, G., Ang, H.M., & Tade, M.O. (2012). CO2 biomitigation and biofuel production using microalgae: photobioreactors developments and future directions. En Zeeshan Nawaz & Shahid Naveed, *Advances in Chemical Engineering*, (pp. 229-244). Sydney, Australia: InTech.