



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

**TRATAMIENTO DE DIGESTATOS EMPLEANDO SISTEMAS MICROALGA –
BACTERIA**

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

PRESENTA:
DANIELA CÉSPEDES GIRALDO

TUTOR PRINCIPAL
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ-INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

COMITÉ TUTORAL
DR. ARMANDO GONZÁLEZ SÁNCHEZ-INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

**DR. JUAN SEBASTIÁN ARCILA HENAO-FACULTAD DE INGENIERÍA Y
ARQUITECTURA, UCM**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: M. I. Mercedes Ramírez Camperos

Secretaria: M. en C. Gloria Moreno Rodríguez

1er. Vocal: Dr. Juan Sebastián Arcila Henao

2do. Vocal: Dr. Armando González Sánchez

3er. Vocal: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) del Instituto de Ingeniería UNAM – Unidad Académica Juriquilla en Santiago de Querétaro, Qro.

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo de los proyectos ECOS-Nord-CONACYT proyecto número 296514 "Caracterización morfológica y funcional de gránulos fototróficos utilizados en el tratamiento de aguas" y CYTED a través del proyecto de Red RENUWAL P319RT002 "Red Iberoamericana para el Tratamiento de efluentes con Microalgas"

Al Doctor Germán Buitrón por su asesoría, recomendaciones y apoyo durante la realización de este proyecto de investigación, al comité tutorial conformado por el Doctor Juan Sebastián Arcila quien me impulsó a realizar este proceso y al Doctor Armando González, ambos con sus contribuciones enriquecieron esta investigación.

Al Instituto de Ingeniería por el apoyo personal, académico, científico y profesional.

Al equipo de trabajo del LIPATA, especialmente al Maestro Jaime Pérez por su apoyo en el uso de equipos, ánimos y consejos brindados. Al Licenciado Javier Villanueva por su apoyo con los trámites administrativos, transporte de muestras y préstamo de herramientas necesarias para el desarrollo del proyecto. En Ciudad Universitaria a la Ingeniera Cristina y a la Licenciada Lucy por su siempre atenta respuesta a mis inquietudes y por su colaboración en la realización de todos los trámites a distancia.

En Colombia a la Universidad Católica de Manizales, mi alma máter la cual me encaminó a continuar este camino de ciencia e investigación.

DEDICATORIA

Para mis papás Alberto y Rita, quienes desde el primer momento me apoyaron en este proceso, me escucharon y me levantaron cuando sentía que no podía más, ustedes, mi motor y máximo apoyo en cada proceso que emprendo.

Para mi hermano Félix, por su apoyo incondicional y por la energía que siempre me brindó en este proceso.

Para mi mejor amiga Yani, que aun con toda la distancia de por medio, siempre estuvo para escucharme, animarme y motivarme.

Para mis amigos Antonio y Deni, mi familia mexicana, mi lugar de paz y mi refugio.

Para el amor de mi vida Sansón, mi compañero fiel durante todas las noches de desvelo, bastaba verte a mi lado descansar para sentir tranquilidad y trabajar a gusto.

Para todos los que creyeron y confiaron en mí, les dedico esto.

“La vida es cuesta arriba, pero la vista es estupenda” H.M.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
2. SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA.....	14
2.1. TRATAMIENTO DE EFLUENTES EMPLEANDO SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA.....	14
2.1.1. Uso de microalgas y bacterias	14
2.1.2. Biomasa microalga-bacteria.....	18
2.1.3. Agregación natural	19
2.2. REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y NUTRIENTES POR MEDIO DE LOS SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA	20
2.3. DESAFÍOS DEL TRATAMIENTO DE EFLUENTES PROVENIENTES DE DIGESTATOS POR MEDIO DE SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA.....	21
2.3.1. Turbiedad.....	21
2.3.2. Toxicidad por amoniaco/amonio	22
2.4. TIPOS DE REACTORES UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES	23
2.4.1. Sistemas cerrados.....	24
2.4.2. Sistemas abiertos	24
2.5. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN EL DESEMPEÑO DE LOS REACTORES	27
2.5.1. Influencia de la luz.....	27
2.5.2. Influencia de la temperatura.....	28
2.5.3. Influencia del pH.....	28
2.5.4. Influencia de los nutrientes.....	29
2.6. CARACTERÍSTICAS DEL DIGESTATO	30
2.7. TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICA	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
3.1. POSTULADOS.....	34
3.2. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1. OBJETIVO GENERAL	35
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5. METODOLOGÍA A EMPLEAR	36
5.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
5.2. DESCRIPCIÓN DEL HRAP A LA INTEMPERIE	38
5.3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA	39
5.4. IRRADIANCIA SOLAR.....	40

5.5.	PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS.....	40
5.6.	INÓCULO.....	40
5.7.	AGUA RESIDUAL PARA EL CRECIMIENTO DEL CONSORCIO MICROALGA-BACTERIA.....	41
5.8.	DIGESTATO ANAEROBIO.....	41
5.9.	MUESTREO.....	41
5.10.	PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.....	42
5.10.1.	Sólidos suspendidos totales y volátiles.....	42
5.10.2.	Demanda química de oxígeno.....	42
5.10.3.	Nitrógeno amoniacal.....	42
5.10.4.	Fosfato.....	43
5.10.5.	Nitrato.....	43
5.10.6.	Nitrito.....	43
5.10.7.	Nitrógeno total Kjeldhal.....	43
5.10.8.	Observaciones al microscopio.....	44
5.10.9.	Índice volumétrico de lodos (IVL) y porcentaje de sedimentabilidad.....	44
5.10.10.	Velocidad de sedimentación (VS).....	45
5.10.11.	Extracción y cuantificación de EPS (carbohidratos y proteínas).....	45
5.10.12.	Granulometría.....	46
5.11.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	47
5.11.1.	Fase 1: Montaje y arranque de reactores de alta tasa a la intemperie.....	47
5.11.2.	Fase 2: Tratamiento en modo continuo de la fracción líquida de digestato empleando agregados microalga-bacteria en reactores de alta tasa a la intemperie.....	48
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
6.1.	EXPERIMENTO 1.....	51
6.1.1.	Fase 1.....	51
6.1.2.	Fase 2.....	57
6.1.3.	Perfil de radiación fotosintéticamente activa.....	71
6.2.	EXPERIMENTO 2.....	72
6.2.1.	Fase 1.....	72
6.2.2.	Fase 2.....	77
6.2.3.	Perfil de radiación fotosintéticamente activa.....	91
6.2.4.	Comparación con la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021.....	93
7.	CONCLUSIONES.....	94
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de microalgas.....	16
Tabla 2. Revisión de TRH y eficiencias de remoción de nutrientes para efluentes de digestato provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales.....	32
Tabla 3. Etapas del experimento 1.....	49
Tabla 4. Etapas del experimento 2.....	50
Tabla 5. Caracterización fisicoquímica del agua residual primaria con el inóculo de lodo.....	51
Tabla 6. Características del influente y efluente.....	55
Tabla 7. Cargas orgánicas del experimento 1.....	58
Tabla 8. Características fisicoquímicas de la fracción líquida del digestato.....	58
Tabla 9. Concentración de metales de la fracción líquida del digestato.....	59
Tabla 10. Comportamiento de SST en el influente y efluente.....	61
Tabla 11. Revisión bibliográfica de remociones de N-NH ₄ ⁺ en sistemas microalga bacteria en HRAP con digestato municipal.....	70
Tabla 12. Caracterización fisicoquímica del sistema al día 27 de operación fase 1.....	73
Tabla 13. Caracterización de digestato a tratar en el experimento 2.....	78
Tabla 14. Cargas orgánicas del experimento 2.....	78
Tabla 15. Porcentaje de diámetro de partícula en experimento 2.....	79
Tabla 16. Revisión bibliográfica de eficiencias de remoción de N-NH ₄ ⁺ P-PO ₄ ³⁻ y DQO _s en sistemas microalga bacteria en HRAP con digestato municipal.....	90
Tabla 17. Comparación de efluente con Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tratamiento de efluentes líquidos de digestatos empleando sistemas microalga-bacteria.....	15
Figura 2. Esquema de la relación de mutualismo realizado en un sistema microalga-bacteria.....	18
Figura 3. Valores de pH en cultivos masivos de <i>Tetraselmis suecica</i> con distintas fuentes de nitrógeno (Abalde Alonso et al., 1995).....	22
Figura 4. Reactores tipo Raceway.....	26
Figura 5. Fases de la estrategia experimental.....	36
Figura 6. Diagrama del proyecto.....	37
Figura 7. Diagrama de funcionamiento del sistema microalga-bacteria.....	38
Figura 8. Reactores algales de alta tasa utilizados.....	39
Figura 9. Ubicación de los reactores en el LIPATA.....	40
Figura 10. Inóculo de lodos activados. En círculos se observan microalgas y en rectángulos diatomeas.....	47
Figura 11. a). Sistema HRAP día 0 inoculado con lodo y agua residual sintética y b). Sistema HRAP día 27 con coloración verde por presencia de microalgas.....	48
Figura 12. Observación en estereoscopio de agregados al día 27 de operación. a). Reactor 1 y b). Reactor 2.....	52
Figura 13. Formación de consorcio microalga-bacteria en lote día 25. Se indican en círculos los diferentes géneros identificados: rojo – <i>Chlorella</i> , azul - <i>Scenedesmus</i>	52
Figura 14. Formación de consorcio microalga-bacteria en lote día 27. Se indican en círculos los diferentes géneros identificados: rojo – <i>Chlorella</i> , amarillo – <i>Haematococcus</i> , naranja – <i>Navicula</i>	53
Figura 15. En la izquierda un nematodo y a la derecha protozoos.....	53
Figura 16. Velocidad de sedimentación durante la fase 1.....	54
Figura 17. Seguimiento de pH en fase 1.....	56
Figura 18. Seguimiento de temperatura en fase 1.....	57
Figura 19. Seguimiento de temperatura en fase 1.....	57

Figura 20. Observación en microscopio el día 14 del ciclo 1. Izquierda - reactor 1 y derecha - reactor 2. <i>Scenedesmus</i> (círculo amarillo) y <i>Chlorella</i> (círculo rojo).....	60
Figura 21. Comportamiento de la velocidad de sedimentación en la fase 1 y 2.	62
Figura 22. Comportamiento de los sólidos en los reactores con TRH de 14 días.....	63
Figura 23. Sedimentación a 61 días de operación. Izquierda reactor 1 y derecha reactor 2.	63
Figura 24. Rotíferos el día 48 de operación. Izquierda - reactor 1 y derecha - reactor 2.	64
Figura 25. Agregado en el día 77 en el reactor 1. <i>Scenedesmus</i> (círculo azul), <i>Chlorella</i> (círculo amarillo), <i>Tetradesmus</i> (círculo rojo), <i>Navicula</i> (círculo naranja).	65
Figura 26. Microalgas filamentosas (círculo rojo) en el día 83 de operación.	65
Figura 27. Rotíferos en el día 84 del cuarto ciclo con TRH de 14 días.	66
Figura 28. Observación de nuevos agregados en microscopio en el día 95 de operación sin presencia de rotíferos.	66
Figura 29. Registro de pH en experimento de TRH de 14 días.....	67
Figura 30. Registro de la temperatura en experimento de TRH de 14 días.....	68
Figura 31. Registro de oxígeno disuelto en experimento de TRH de 14 días.....	68
Figura 32. Remoción de N-NH ₄ ⁺ en fase 2.....	69
Figura 33. Remoción de DQO _s en fase 2.....	70
Figura 34. Valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) por día durante los meses de operación del experimento 1.....	71
Figura 35. Seguimiento de consorcio microalga-bacteria en lote día 27. Izquierda reactor 1 y derecha reactor 2. Se indican en círculos los diferentes géneros identificados: rojo – <i>Scenedesmus</i> , azul – <i>Chlorella</i>	73
Figura 36. Observación en estereoscopio de agregados tipo flóculos al día 27 de operación. Izquierda - reactor 1 y derecha - reactor 2. Se indican en círculos naranja los agregados tipo flóculos.	74
Figura 37. Monitoreo de la velocidad de sedimentación en los 27 días de operación en la fase 1 de formación de agregados.....	74
Figura 38. Monitoreo de pH en fase 1 de experimento 2.....	76
Figura 39. Monitoreo de temperatura en fase 1 de experimento 2.....	76
Figura 40. Monitoreo de oxígeno disuelto en fase 1 de experimento 2.....	77
Figura 41. Monitoreo de velocidad de sedimentación durante el experimento 2.	79
Figura 42. Porcentaje de diámetro de partícula en experimento 2.....	80
Figura 43. Observación de agregados en microscopio. A. Reactor 1 en TRH de 14 días. B. Reactor 2 en TRH de 14 días. C. Reactor 1 en TRH de 10 días. D. Reactor 2 en TRH de 10 días. E. Reactor 1 en TRH de 6 días. F. Reactor 2 en TRH de 6 días.....	81
Figura 44. Observación de microalgas filamentosas en TRH de 10 días. Izquierda – reactor 1 y derecha – reactor 2.	82
Figura 45. Observación de agregados en estereoscopio. A. Reactor 1 en TRH de 14 días. B. Reactor 2 en TRH de 14 días. C. Reactor 1 en TRH de 10 días. D. Reactor 2 en TRH de 10 días. E. Reactor 1 en TRH de 6 días. F. Reactor 2 en TRH de 6 días.....	82
Figura 46. Comparación de la cantidad de EPS ligado obtenido por gramo de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en los TRH de 14, 10 y 6 días.....	84
Figura 47. Seguimiento de los SST y SSV en los reactores en los TRH de 14, 10 y 6 días.....	84
Figura 48. Seguimiento de los SST y SSV en el efluente en los TRH de 14, 10 y 6 días.....	85
Figura 49. Monitoreo de pH en fase 2 del experimento 2.....	87
Figura 50. Monitoreo de temperatura en fase 2 del experimento 2.....	87
Figura 51. Monitoreo de oxígeno disuelto en fase 2 del experimento 2.....	88
Figura 52. Monitoreo de oxígeno disuelto en tiempo real por 24 horas en fase 2 del experimento 2.....	88
Figura 53. Remoción de materia orgánica y nutrientes en fase 2 del experimento 2.....	89
Figura 54. Mecanismos de remoción de nitrógeno en fase 2 del experimento 2.....	91
Figura 55. Valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) durante los meses de operación del experimento 2.....	92

RESUMEN

Los sistemas microalga-bacteria en los últimos años han adquirido mayor aceptación y relevancia para el tratamiento de aguas residuales, debido a su alta capacidad de remoción de materia orgánica y nutrientes, a su vez, como respuesta a la crisis energética mundial, por su producción de biomasa útil para la generación de biocombustibles, gracias a su alta capacidad de acumulación de lípidos. Asimismo, estos sistemas microalga-bacteria, son una alternativa altamente viable al alto consumo energético en las plantas de tratamiento de aguas residuales que operan utilizando sistemas de lodos activados que requieren aireación, en vista de que esta se lleva a cabo de forma fotosintética.

Los objetivos de este trabajo fueron en primer lugar, obtener un consorcio microalga-bacteria a partir de un inóculo de lodos activados y agua residual sintética, utilizando dos reactores de alta tasa a la intemperie. El consorcio se empleó para el segundo objetivo que consistió en evaluar la influencia de tres cargas orgánicas, resultantes de variar tres tiempos de retención hidráulica de 14, 10 y 6 días, sobre la remoción de materia orgánica y nutrientes de un digestato municipal, centrifugado y con un factor de dilución 1:10, con el fin de comparar y elegir el tiempo de retención más adecuado para el tratamiento de este digestato. Finalmente, en un tercer objetivo se buscó relacionar el efecto de los parámetros fisicoquímicos como pH, temperatura y oxígeno disuelto sobre la capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica identificando los procesos del sistema microalga-bacteria durante el ciclo de luz y oscuridad.

De esta investigación se concluyó que se obtuvo un consorcio microalga-bacteria en forma de agregados tipo flóculos para el tratamiento de digestato municipal. Los agregados se mantuvieron estables y con una correcta sedimentabilidad durante los TRH de 14 y 10 días. Los agregados de mayor tamaño se encontraron bajo el TRH de 10 días, producto de la presencia de microalgas filamentosas y a la más alta producción de EPS. También se concluyó que el TRH de 14 días presentó las remociones más altas de nutrientes y materia orgánica (100% N-NH₄⁺, 67% P-PO₄³⁻ 86% y DQO_s), seguido por el TRH de 10 días (100% N-NH₄⁺, 51% P-PO₄³⁻ 83% y DQO_s). Sin embargo, el TRH de 10 días con carga orgánica de 95.6 mg DQO m⁻³ d⁻¹ resultó ser el más adecuado para tratar el digestato, por su alto crecimiento de biomasa, mayor agregación y tamaño de diámetro de partícula de los agregados, producción de EPS útiles para la agregación, mayores propiedades de sedimentabilidad y altas remociones de materia orgánica y nutrientes, esto logrado a partir de la más alta radiación fotosintéticamente activa.

Palabras clave: microalgas, digestato, carga orgánica, tiempo de retención hidráulica, sedimentabilidad.

ABSTRACT

Microalgae-bacteria systems in recent years have increased acceptance and relevance for wastewater treatment, for their high capacity to remove organic matter and nutrients, in turn, as a response to the global energy crisis, for the production of useful biomass for the generation of biofuels, for the benefit of the high lipid accumulation capacity. Likewise, these microalgae-bacteria systems are a highly viable alternative to the high energy consumption in wastewater treatment plants that operate using activated sludge systems that require aeration, because it is carried out photosynthetically.

The objectives of this research were, first, to obtain a microalgae-bacteria consortium from an inoculum of activated sludge and synthetic wastewater, using two outdoor raceways. The consortium was used for the second objective, which consisted of evaluating the influence of three organic loads, resulting from varying three hydraulic retention times of 14, 10 and 6 days, on the removal of organic matter and nutrients from a municipal digestate, centrifuged with a dilution factor of 1:10, in order to compare and choose the most suitable retention time for the treatment of this digestate. Finally, a third objective was relate the effect of physicochemical parameters such as pH, temperature and dissolved oxygen on the nutrient and organic matter removal capacity, identifying the processes of the microalgae-bacteria system during the light and dark cycle.

From this investigation it was concluded that a microalgae-bacteria consortium was obtained in the form of floc-type aggregates for the treatment of municipal digestate. The aggregates remained stable and with a correct sedimentability during the HRT of 14 and 10 days. The largest aggregates were found under the HRT of 10 days, due to the presence of filamentous microalgae and the highest production of EPS. It was also concluded that the HRT of 14 days presented the highest removal of nutrients and organic matter (100% N-NH₄⁺, 67% P-PO₄³⁻ and 86% COD_s), followed by the HRT of 10 days (100% N- NH₄⁺, 51% P-PO₄³⁻ and 83% COD_s). However, the HRT of 10 days with an organic load of 95.6 mg COD m⁻³ d⁻¹ turned out to be the most suitable for treating the digestate, due to its high biomass growth, greater aggregation and particle diameter size of the aggregates. production of EPS useful for aggregation, greater sedimentability properties and high removal of organic matter and nutrients, this is achieved from the highest photosynthetically active radiation.

Keywords: microalgae, digestate, organic load, hydraulic retention time, sedimentability.

1. INTRODUCCIÓN

El interés mundial en el tratamiento de diversos residuos orgánicos por medio de la digestión anaerobia, ha crecido en los últimos años. Convertir los residuos orgánicos en bioenergía puede proporcionar una forma efectiva para el manejo de residuos y a la vez tiene el potencial de reducir la dependencia de las fuentes de energía provenientes de combustibles fósiles (Abdul Aziz et al., 2019). Al tratar el agua residual municipal por medio del proceso de lodos activados se genera biomasa la cual se puede digerir anaeróbicamente para producir biogás. Además del biocombustible, la digestión anaerobia genera un efluente llamado digestato. El digestato está compuesto por dos fracciones, sólida y líquida con diversas aplicaciones y métodos de disposición final siempre y cuando su tratamiento sea el adecuado. La fracción sólida puede ser aplicada efectivamente como mejorador de suelos o fertilizante orgánico (Möller y Müller, 2012) o ser llevada directamente a un relleno sanitario. La fracción líquida se caracteriza por su alto contenido de materia orgánica recalcitrante y nutrientes (nitrógeno y fósforo). Usualmente la fracción líquida se regresa a la entrada del proceso biológico, lo que puede implicar un consumo adicional de oxígeno por el sistema. Es por ello que surge la necesidad de explorar sistemas que puedan capturar los nutrientes para ser utilizados posteriormente.

El uso de sistemas biológicos como los representados por asociaciones entre microalgas y bacterias surgen como una alternativa económica y altamente viable para el tratamiento de aguas residuales con elevado contenido de nutrientes sobre las técnicas convencionales debido a sus bajos costos de construcción, mantenimiento, consumo mínimo de energía y eficiencia en remoción de contaminantes (Xin et al., 2010). La fotosíntesis de las algas proporciona el oxígeno que es utilizado por las bacterias heterotróficas y oxidantes de amonio, estas a su vez producen dióxido de carbono el cual las microalgas utilizan para reproducirse, además las microalgas tienen la capacidad de remover los nutrientes como nitrógeno y fósforo, los cuales utilizan para su crecimiento. El cultivo de microalgas en aguas residuales además de descontaminar, llevan a la producción de altas cantidades de biomasa y productos metabólicos potencialmente valiosos para la producción de biocombustibles y/o biogás a través de digestión anaerobia (Chinnasamy et al., 2010; Delgadillo-Mirquez et al., 2016) ya que contienen aproximadamente un 40 a 50% de contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas in vivo (Singh y Gu, 2010).

La evaluación de la eficiencia de los sistemas microalga-bacteria usados para el tratamiento de aguas residuales de diversos orígenes han revelado buenos resultados en cuanto a la eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO) y nutrientes como nitrógeno y fósforo (Arcila y Buitrón, 2017; Kim et al., 2013)

utilizando PBR (fotobiorreactores) y HRAP (estanques de algas de alta tasa) como opciones viables para el cultivo de microalgas en aguas residuales (Cuellar et al., 2017).

Estos sistemas de tratamiento no convencionales también presentan un potencial notable en otros efluentes industriales por ejemplo la fracción líquida proveniente de los residuos de granjas porcinas, bovinas y los efluentes líquidos provenientes de digestores aerobios y anaerobios ricos en nutrientes y con bajos porcentajes de materia orgánica (de Godos et al., 2010; Koutra et al., 2021; Sayedin et al., 2020)

En los sistemas de tratamiento microalga-bacteria existen diversos parámetros ambientales y operativos importantes que afectan la eliminación de nutrientes y la productividad de la biomasa tales como el tiempo de retención hidráulica (TRH), los fotoperiodos y la carga de nutrientes (Mehrabadi et al., 2015). El tiempo de retención hidráulica (TRH) afecta el predominio de las microalgas en los agregados de microalgas-bacterias que crecen en las aguas residuales, la eliminación de materia orgánica y nutrientes y la digestibilidad de la biomasa para la producción de biogás (Arcila y Buitrón, 2017). Las estrategias operativas capaces de lograr altos niveles de eliminación de contaminantes, pero reducir el tiempo de retención hidráulica (TRH), son imprescindibles para hacer que los consorcios de microalgas y bacterias sean más competitivos que los sistemas convencionales de lodos activados. Por otro lado, para optimizar la producción de biomasa de algas, la eliminación de nutrientes y la capacidad fotosintética, deben controlarse y monitorearse parámetros de crecimiento tales como la temperatura, pH, intensidad de luz y el sombreado mutuo (Foladori et al., 2018).

Por lo anterior, se ha generado interés en utilizar los sistemas microalga-bacteria para el tratamiento de residuos por su alta capacidad de remoción de materia orgánica y nutrientes tales como nitrógeno y fósforo y como respuesta a la crisis energética mundial en cuanto a biocombustibles, principalmente para la generación de biometano, biodiesel y bioetanol por su alta capacidad de acumulación de lípidos (Brennan y Owende, 2010). Sin embargo, varios estudios señalan que la generación de biometano es comparativamente menos compleja y más rentable debido a la importante cantidad de componentes tales como carbohidratos, proteínas y lípidos útiles para la digestión anaerobia y producción de metano, además de ser viable económicamente cuando se recolecta de forma eficiente la biomasa producida (Harun et al., 2010; Ward et al., 2014).

Por tal motivo, las microalgas pueden ser utilizadas para el tratamiento de residuos líquidos provenientes de digestatos, así como alternativa a la crisis energética mundial utilizando la biomasa generada y sometiéndola al proceso de digestión para generar metano. De esta forma, este trabajo se centra en evaluar la capacidad de un sistema microalga-bacteria para remover la materia orgánica y nutrientes de la

fracción líquida de un digestato proveniente de un reactor anaerobio metanogénico, al igual que generar gránulos altamente sedimentables verificando el potencial de aprovechamiento de la biomasa variando el tiempo de retención hidráulica (TRH) y asimismo la concentración de la carga orgánica del digestato a tratar.

2. SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA

2.1. TRATAMIENTO DE EFLUENTES EMPLEANDO SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA

2.1.1. Uso de microalgas y bacterias

Con límites máximos permisibles cada vez más estrictos en cuanto a normatividad correspondiente al tratamiento de aguas, las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y demás generadores de aguas residuales sea de tipo industrial o no domésticas se encuentran en la búsqueda de tecnologías innovadoras de eliminación de nutrientes. El uso de microalgas para el tratamiento de las aguas residuales ha recibido atención por su capacidad de eliminar y recuperar nutrientes (Wang et al., 2019), además el uso de estas permiten reducir las emisiones de gases de efecto invernadero a través del secuestro de CO₂ y generar biomasa que presenta múltiples usos beneficiosos (Spolaore et al., 2006).

En la actualidad, existen diversos sistemas de tratamiento municipales e industriales que emplean la digestión anaerobia con el fin de convertir la materia orgánica y la biomasa generada, por ejemplo, en los tanques de aireación en biogás y digestato. La fracción líquida de digestato es rica en nutrientes que puede producir contaminación si no es tratado de forma adecuada. Las plantas de tratamiento de agua residual generalmente reintroducen esta fracción líquida al inicio del tren de tratamiento generando una elevada concentración de nutrientes que representan alta carga para el tratamiento terciario, además afecta potencialmente la eficiencia del tratamiento secundario y la digestión anaerobia (Chen et al., 2008).

Por lo anterior, algunas de las tendencias emergentes para el manejo de la fracción líquida de digestato incluyen: oxidación anaeróbica de amonio (ANAMMOX), extracción de amoníaco, ósmosis inversa, cristalización de estruvita, humedales artificiales, hidroponía y cultivo de algas. Estos procesos pueden llevar a reducir o eliminar completamente los nutrientes en el digestato, dejando el agua tratada casi en su totalidad, dicha agua obtenida podría usarse en riego de zonas de sequía, como agua potable para animales y como agua de proceso en diversas industrias (Chuka et al., 2020). Sin embargo, la tendencia actual, basada en la economía circular es recuperar los nutrientes más que transformarlos.

El tratamiento por medio de sistemas microalga trae como beneficio que el efluente de digestato anaeróbico puede sustituir las necesidades de fertilizantes de las algas, la biomasa de algas producida se puede valorizar aún más en la producción de piensos o biocombustibles y puede utilizarse como tratamiento independiente sin la necesidad de una integración compleja de otros sistemas de apoyo, la única desventaja que se encuentra es que puede consumir una cantidad significativa de

agua si se diluye, lo que genera un alto costo operativo, sin embargo para la realización de este proyecto no se llevarán a cabo técnicas de dilución sino que se trabajará con la manipulación del tiempo de retención hidráulica tal que se pueda variar la carga orgánica que sea apta para las microalgas, en la figura 1 se puede observar un esquema sobre el tratamiento de digestatos empleando los sistemas microalga-bacterias y sus beneficios.

Diversos estudios han demostrado que existe una variedad de especies de microalgas capaces de asimilar nutrientes inorgánicos, tal es el estudio realizado por Franchino et al; en el 2016 donde cultivaron el alga verde *Chlorella vulgaris* en digestato diluido procedente de la digestión anaeróbica de purines de cerdo y maíz y lograron reducir significativamente su toxicidad y su altísima concentración de nutrientes. Cabe resaltar también, que los digestatos son ricos en nutrientes como nitrógeno y fósforo, que las microalgas pueden aprovechar para su metabolismo pero también limitan el crecimiento de las algas si son proporcionados en exceso (Stanley et al., 1990). En los casos en que la concentración de estos nutrientes es tan alto que pueda inhibir el crecimiento de las microalgas se suelen utilizar tasas de dilución de 10 a 30 veces para solucionar dicho inconveniente (Bjornsson et al., 2013; Koutra et al., 2018; Sayedin et al., 2020). Sin embargo, como se mencionó anteriormente esta técnica no será aplicada y cabe resaltar que la dilución del digestato con agua dulce no es una estrategia viable en sitios donde hay escasez de agua por la cantidad de agua que esto requeriría para el proceso.

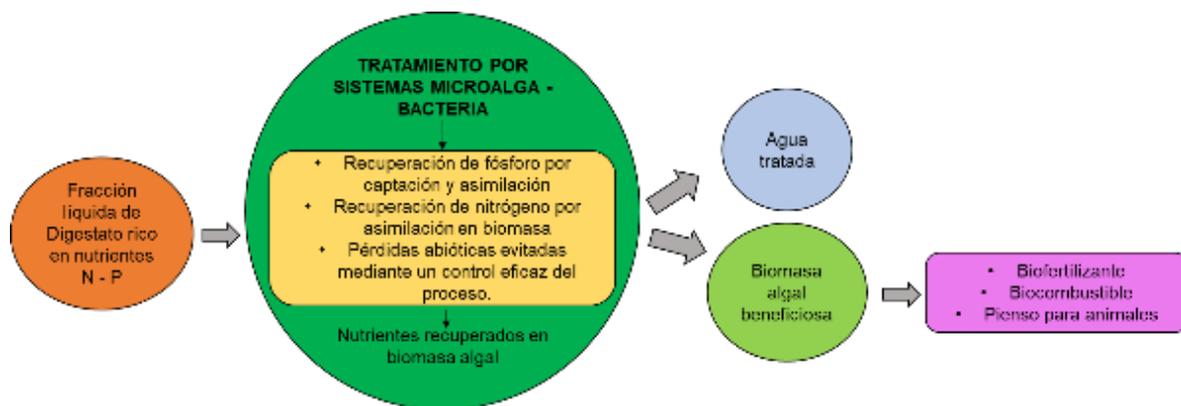


Figura 1. Tratamiento de efluentes líquidos de digestatos empleando sistemas microalga-bacteria

Fuente: adaptado de Nagarajan et al; (2020).

Las microalgas son microorganismos unicelulares eucariotas que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos, fotoautótrofos donde su fuente de energía es la luz y su fuente de carbono el CO₂ (Gomez, 2007). Su estudio comienza en 1890 cuando el microbiólogo holandés Beijerinck estableció cultivos puros de una microalga de agua dulce: *Chlorella vulgaris*, posteriormente Otto Warburg (1919)

consiguió en un laboratorio cultivos densos de *Chlorella*, e introdujo la idea de utilizar estos cultivos como una herramienta de trabajo en el estudio de la fotosíntesis (Abalde Alonso et al., 1995). Posteriormente entre los años 1942 y 1970 la investigación se enfocó en el uso de las microalgas con fines alimenticios y curativos; no fue hasta el año 1975 que Oswald y colaboradores de la Universidad de California, Berkeley, sugirieron la utilización de cultivos masivos de microalgas para tratamiento de aguas residuales y producción de proteína, simultáneamente, donde además desarrollaron sistemas de producción masiva de algas para la bioconversión de la energía solar en metano (Abalde Alonso et al., 1995).

Es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de las microalgas. En sistemas naturales, cuando una microalga tiene éxito en un ecosistema normalmente significa que es lo suficientemente flexible en sus requerimientos e interacciones (Abalde Alonso et al., 1995). En el cultivo masivo, el rendimiento alcanzado depende tanto de la concentración de células en el cultivo como del grado en que las células pueden desarrollar su potencial de crecimiento. Por tanto, para conseguir un cultivo de microalgas en crecimiento activo es necesario tener en cuenta la carga orgánica, el caudal, la temperatura, el pH y la disponibilidad de oxígeno y luz (Gomez, 2007).

En la tabla 1 se presenta una tabla con las condiciones óptimas para el crecimiento de las microalgas, sin embargo, cabe resaltar que el sistema a utilizar en este proyecto es a la intemperie así que deberán tenerse en cuenta las condiciones ambientales en el momento del experimento:

Tabla 1. Parámetros de crecimiento de microalgas

Parámetro		Valor	Fuente
Temperatura		16-27 °C	(Abalde Alonso et al., 1995)
pH		7-8	
Luz	Longitud de onda	400-700 nm	
	Fotoperiodo	Depende de cada especie Recomendable 12:12 luz:oscuridad	
	Fuente	Artificial o natural	
	Intensidad	2500 lx	
Fuente de carbono asimilable		360-150000 ppmv CO ₂	(Bofill-Rodriguez et al., 2012)
Fuente de energía		Mecanismo fotoautótrofo: energía solar Mecanismo heterótrofo: metabolismo de moléculas orgánicas	(Nagarajan et al., 2020)
Velocidad de crecimiento		0.13 mg L ⁻¹ d ⁻¹	(Tricolici et al., 2014)

En los últimos años, los sistemas de tratamiento de aguas residuales biológicos de tipo algal han atraído un mayor interés presentándose como una alternativa económica y siendo altamente eficientes en cuanto al tratamiento de las aguas

debido a sus bajos costos de construcción, mantenimiento, consumo mínimo de energía y alta eficiencia de remoción de contaminantes (Xin et al., 2010), las microalgas no solo eliminan el nitrógeno (N) y el fósforo (P) de las aguas residuales, sino que también reciclan estos nutrientes en una biomasa, llevando a la producción de altas cantidades de biomasa y productos metabólicos potencialmente valiosos que pueden llevar a la producción de biocombustibles (Chinnasamy et al., 2010) ya que contienen aproximadamente un 40 a 50% de contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas in vivo (Singh y Gu, 2010).

Estos beneficios estos sistemas llaman la atención en las situaciones en las que es necesario aumentar la eficiencia energética y cerrar el ciclo, reciclando elementos generados en el flujo de tratamiento de residuos. Siendo así, la combinación entre el tratamiento de aguas residuales con el uso de microalgas con la producción de biocombustibles a base de las mismas una necesidad de continuo estudio.

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales, el nitrógeno y fósforo usualmente son removidos por medio de dos procesos separados. El nitrógeno usualmente es convertido a gas N_2 mediante nitrificación-desnitrificación acoplada y el fósforo se precipita con sales metálicas. Por otra parte, las microalgas tienen la capacidad de eliminar nitrógeno y fósforo de las aguas residuales simultáneamente, absorbiéndolo de las aguas residuales y utilizándolos como nutrientes para producir biomasa. Ahora bien, dado que las microalgas requieren tanto de fósforo como de nitrógeno para producir nueva biomasa, la eliminación de cada nutriente depende de la disponibilidad del otro, es decir que las microalgas no pueden eliminar el nitrógeno sin la presencia de fósforo o viceversa porque ambos nutrientes son esenciales para su crecimiento (Beuckels et al., 2015). Las concentraciones de nitrógeno y fósforo varían dependiendo del tipo de agua residual a tratar; en aguas residuales domésticas, las concentraciones de nitrógeno varían entre 15 y 90 $mg L^{-1}$ y las de P entre 4 y 20 $mg L^{-1}$ (Christenson y Sims, 2011) y debido a que la eliminación de nitrógeno y fósforo están acoplados en las microalgas, el hecho de que las concentraciones de nitrógeno y fósforo varíen independientemente unas de otras, plantea un desafío al momento de diseñar un sistema para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales por medio de las microalgas (Beuckels et al., 2015).

Como ya se ha visto anteriormente, los sistemas microalga-bacteria son ampliamente utilizados en el tratamiento de aguas residuales, debido a la capacidad que tienen para remover nutrientes y materia orgánica así como de generar biomasa, sin embargo en los últimos años se ha venido estudiando otro tipo de sustrato en el cual las algas pueden obtener altas remociones de materia orgánica, nutrientes, crecer su biomasa y obtener subproductos valiosos, como lo son los efluentes líquidos como residuos provenientes de la digestión anaerobia (Koutra et al., 2021; Perazzoli et al., 2016; Seyedin et al., 2020).

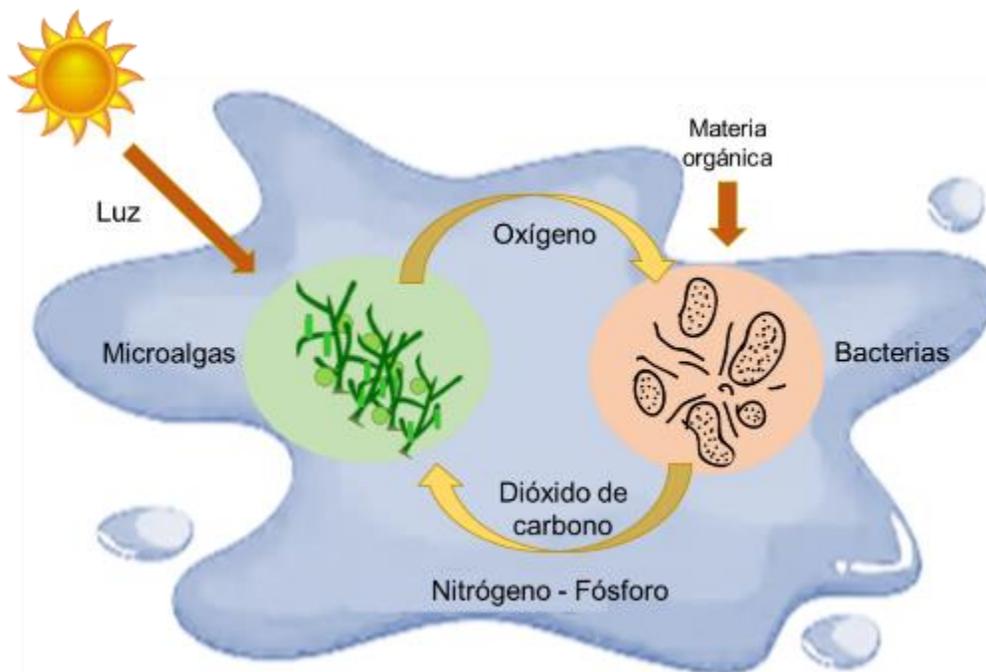


Figura 2. Esquema de la relación de mutualismo realizado en un sistema microalga-bacteria

2.1.2. Biomasa microalga-bacteria

La biomasa microalga-bacteria puede ser aprovechada ya sea como fertilizante o para la fabricación de biocombustibles, principalmente para la generación de biometano, biodiesel y bioetanol por su alta capacidad de acumulación de lípidos, sin embargo, la viabilidad para el aprovechamiento de la misma se ve limitada por la cosecha de la misma, debido a la baja capacidad de sedimentación que presentan las microalgas, lo cual limita el uso de estos sistemas para el tratamiento de diversos residuos como para su aprovechamiento como subproducto de valor agregado (Park y Craggs, 2011).

A lo largo de los diferentes estudios realizados acerca del tratamiento de residuos empleando sistemas microalga-bacteria, se han implementado distintas tecnologías para la cosecha de la biomasa tales como centrifugación, filtración, ultrafiltración, floculación química y floculación mediante aire disuelto (Gutiérrez et al., 2016) y aunque conseguirían una cosecha eficiente de la biomasa, son económicamente inviables, no obstante, Park et al (2011) indicó que la suave mezcla mecánica proporcionada por la rueda de paletas en un reactor tipo HRAP, promueve géneros de algas coloniales inmóviles, incluidos *Micractinium*, *Pediastrum* y *Scenedesmus*, que pueden crecer y formar grandes flóculos microbianos con un diámetro superior a 100 μm que se pueden cosechar pasivamente por gravedad sin uso de energía, por lo cual, no se necesitan nutrientes adicionales para el cultivo de microalgas, y la

biomasa de algas (flóculos de algas/bacterias) se cosecha fácilmente por simple sedimentación por gravedad (Craggs et al., 2013).

2.1.3. Agregación natural

Cuando se trabaja con sistemas microalga-bacteria para el tratamiento de efluentes, estas deben cumplir con tres condiciones: alta tasa de crecimiento, alta tolerancia a la variación de estaciones y buena capacidad para autoflocularse y generar agregación espontánea de tal forma que permita una cosecha simple por gravedad la cual resulta ser económica al emplearse la sedimentación siendo así una forma rápida y sencilla (Park & Craggs, 2011). Ésta puede ocurrir de forma natural o inducida por la limitación de carbono o de otros factores abióticos (Chen et al., 2011).

Con el fin de generar la agregación de los sistemas microalga-bacteria, se busca la adherencia entre algas coloniales con bacterias de aguas residuales para formar agregados que se pueden presentar en gránulos y flóculos con tamaño mayor a 500 μm (Park y Craggs, 2011). Los flóculos presentan como característica que no tienen una forma definida y son el inicio del proceso de agregación mientras que los gránulos son el resultado de condiciones óptimas de agregación y se caracterizan por tener una forma definida y sedimentan más rápido que los flóculos.

Diversos estudios de agregados de microalgas-bacterias, tanto para flóculos como para gránulos, han enfatizado la relevancia de la producción de EPS por microalgas y bacterias como factor clave para la formación de agregados. Sin embargo, la presencia de EPS se ve afectada no solo por factores ambientales como la temperatura y la intensidad de luz, sino también por factores operativos como el tiempo de retención celular (TRC) y el tiempo de retención hidráulica (TRH) (Arcila y Buitrón, 2017).

En el caso de la intensidad de luz, la fotosíntesis se correlaciona con un aumento de la irradiancia hasta que se alcanza el crecimiento máximo de algas en el punto de saturación de luz. Al utilizar la luz, se deben considerar dos casos que pueden presentarse en un sistema microalga-bacteria, ellos son la fotolimitación y la fotoinhibición, la primera ocurre cuando la luz disponible no es suficiente (irradiancia baja) para permitir el crecimiento máximo de algas, mientras que la fotoinhibición, que puede conducir a daños por luz, ocurre cuando la luz disponible está en exceso (irradiancia excesiva) del punto de saturación para crecimiento de algas. Por lo anterior, la distribución de la luz debe ser tal que se encuentre entre estos límites. En los sistemas de cultivo, el efecto de las zonas de fotolimitación (zonas oscuras) aumenta colinealmente con la concentración de biomasa celular y la productividad disminuye hasta cero en esas zonas (Ogbonna et al., 1995). Además, los niveles de irradiancia influyen en la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) los cuales son macromoléculas (carbohidratos y proteínas) que se acumulan extracelularmente en microalgas y bacterias propiciando la adherencia entre ellas

para formar agregados (flóculos y gránulos), debido a su alta hidrofobicidad y a su superficie de carga positiva se promueve la agregación natural (Arcila y Buitrón, 2017).

Por otro lado, el TRH también es uno de los parámetros operativos que afectan en gran medida la agregación natural de los sistemas microalga-bacteria, teniendo relevancia porque estos sistemas requieren de cierto tiempo para digerir la materia orgánica presente en el efluente, donde un TRH muy corto puede presentar bajas eficiencias de remoción de materia orgánica mientras que uno muy largo puede generar problemas en la sedimentación o generar flotación del flóculo, además la correcta configuración del mismo afecta significativamente la absorción de nitrógeno y fósforo junto con las acumulaciones de lípidos y almidón en microalgas (Cuellar et al., 2017). Arcila y Buitrón (2016) reportaron al pasar de un TRH de 10 a uno de 6 días favoreció el crecimiento de diatomeas y microalgas filamentosas verdes las cuales se asocian en estructuras del tipo aglomerado o granular, obteniendo una velocidad de sedimentación de 8 m h^{-1} , atribuyendo que el crecimiento de diatomeas en la estructura de agregados microalga-bacteria mejora 6 veces la velocidad de sedimentación, debido a que su pared celular se conforma de sílice lo cual la hace más pesada.

Implementar las configuraciones adecuadas que permitan generar la agregación natural en los sistemas microalga-bacteria trae consigo una mayor recuperación de la biomasa al incrementar el tamaño de las partículas que sean altamente sedimentables y asimismo lograr la remoción de nutrientes y materia orgánica presentes en el efluente.

2.2. REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y NUTRIENTES POR MEDIO DE LOS SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA

Un sistema convencional de tratamiento de aguas residuales por lo general suministra aire a los microorganismos aerobios mediante sistemas de aireación para eliminar la materia orgánica de las aguas residuales, donde se requiere aproximadamente 1 kW h^{-1} de electricidad para suministrar el aire necesario para eliminar 1 kg de DBO (Oswald, 2003). Este suministro de aire representa alrededor del 40% del costo total de electricidad en las plantas de tratamiento por lo cual es una desventaja al aumentarse los costos operativos, contrario a la tecnología de tratamiento de aguas residuales implementando sistemas microalga-bacteria donde la materia orgánica, el nitrógeno y el fósforo se pueden eliminar simultáneamente en un reactor; de hecho, se espera una alta eficiencia de remoción de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Aslan y Kapdan, 2006). Además, el oxígeno producido por el proceso de fotosíntesis por microalgas lo utilizan los microorganismos aerobios, lo cual reduce los costos de aireación. Las microalgas autofototróficas no solo pueden eliminar nitrógeno y fósforo, sino que pueden fijar el CO_2 utilizando este como fuente de carbono (Kim et al., 2013).

Sin embargo, aunque la mayoría de los estudios como los presentados por Aslan y Kapdan (2006), Chu et al (2014) o Jung et al (2019), reportan resultados muy buenos en cuanto a la remoción de materia orgánica y nutrientes empleando sistemas microalga-bacteria, estos están enfocados al tratamiento de agua residual de diferentes tipos y son pocos los estudios que se han realizado sobre el tratamiento de efluentes provenientes de digestatos (fracción líquida) debido a que en este medio se inhibe el crecimiento de las microalgas debido su coloración oscura, alta turbiedad que no permite la penetración de luz disponible para las mismas (Marcilhac et al., 2014), presentando también alta concentración de nutrientes como nitrógeno y fósforo importantes para el adecuado crecimiento de las microalgas, tema que se abordará en el numeral 2.4.2. y 2.5.

2.3. DESAFÍOS DEL TRATAMIENTO DE EFLUENTES PROVENIENTES DE DIGESTATOS POR MEDIO DE SISTEMAS MICROALGA-BACTERIA

2.3.1. Turbiedad

Uno de los retos más importantes que se encuentra al realizar el tratamiento de efluentes de digestato empleando sistemas microalga-bacteria es la turbiedad. En un cultivo de microalgas, la luz (calidad y cantidad), es el principal factor limitante para este, puesto que la fotosíntesis presenta relación directa con un aumento de irradiancia hasta que se alcanza el crecimiento máximo de algas en el punto de saturación de la luz (Barnett, 2015) donde los sólidos suspendidos presentes en el efluente de digestato interfieren con la claridad del líquido evitando que la luz penetre al ser dispersada y absorbida por los materiales suspendidos (Wang et al., 2010).

Diversas investigaciones han señalado que la turbidez se puede disminuir mediante el pretratamiento del efluente de digestato utilizando técnicas tales como filtración (Wang et al., 2019), precipitación (Tan et al., 2014), centrifugación (Scarponi et al., 2021a) y pretratamiento hidrotermal (Li et al., 2020) para eliminar los sólidos suspendidos. Sin embargo, la técnica mayormente utilizada es la dilución con agua la cual permite eliminar rápidamente la turbidez y además la literatura indica que por medio de esta se consigue un mejor rendimiento de las microalgas lo cual permite aumentar la biomasa y eliminar los nutrientes del efluente de digestato (de Godos et al., 2010; Fernandes et al., 2020a; Prajapati et al., 2014; Sayedin et al., 2020). No obstante, los métodos mencionados pierden la atención cuando se realiza un análisis de costo-beneficio, donde el uso de esto da lugar a un aumento significativo en los costos del proceso de tratamiento (Cheng et al., 2015).

2.3.2. Toxicidad por amoniaco/amonio

La alta concentración de nutrientes tales como el nitrógeno en forma de amoniaco es otro de los problemas detectados al realizar tratamiento de efluentes de digestato (Uggetti et al., 2014).

La asimilación de nitrato y amonio está estrechamente relacionada con el pH del medio, dado que la absorción de nitrógeno cambia el pH (Brewer y Goldman, 1976). Como se observa en la figura 3 la asimilación de nitrato tiende a aumentar el pH del medio, mientras que cuando se utiliza amonio como única fuente de nitrógeno, el pH del medio puede disminuir hasta niveles de 3, generando así efectos nocivos, donde algunas microalgas son sensibles a elevadas concentraciones de amonio y su crecimiento puede inhibirse por concentraciones de amonio 1 mM. Este descenso del pH podría ser la razón por la cual se produce la inhibición del crecimiento observada en algunas microalgas cuando la concentración de amonio en el medio es muy elevada, por ejemplo un aumento del pH intracelular a causa de la entrada de moléculas de hidróxido amónico no disociadas (Richmond, 2014).

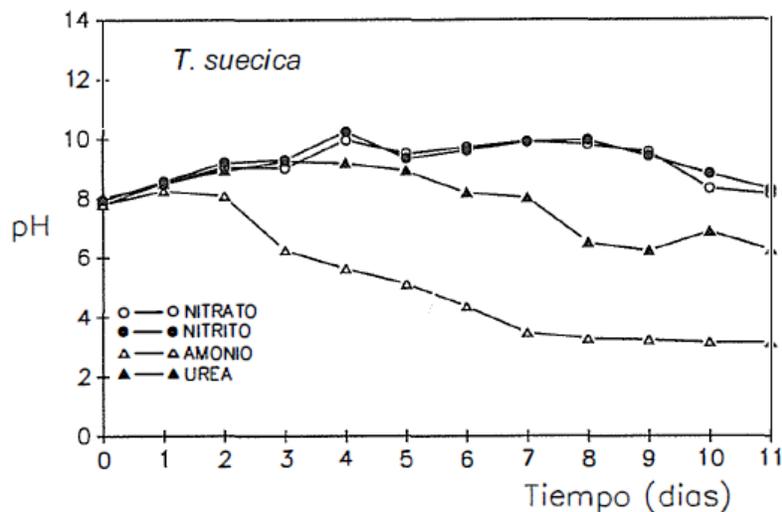


Figura 3. Valores de pH en cultivos masivos de *Tetraselmis suecica* con distintas fuentes de nitrógeno (Abalde Alonso et al., 1995).

El amonio es la fuente de nitrógeno predilecto por las microalgas, sin embargo como se mencionó anteriormente en altas concentraciones puede ser tóxico para estas (Akizuki et al., 2021; Gutierrez et al., 2016; Uggetti et al., 2018). En los efluentes de digestato, el nitrógeno se encuentra en forma de nitrógeno amoniacal. En soluciones acuosas, el amoníaco-N está presente en dos formas: el catión protonado NH_4^+ (amonio) y la forma gaseosa NH_3 (amoníaco). El equilibrio de las dos formas viene dictado por el pH. A pH mayor a 9 domina el amoníaco y a pH menor a 8 domina el amonio. A pH mayor a 9, la toxicidad probablemente se deba al amoníaco y a pH menor a 8 la toxicidad probablemente se deba al amonio (Boussiba y Gibson,

1991). No obstante, se debe considerar que entre las formas de nitrógeno las microalgas prefieren utilizar NH_4^+ como fuente de nitrógeno debido a que su asimilación tiene un menor costo energético al no requerir una reacción redox (Fernández et al., 1998). Con valores de pH mayores a 7 el NH_3 libre se hace disponible y la difusión de este aumentará el pH interno, a diferencia del NH_4^+ . Cuando se utiliza amonio como única fuente de nitrógeno, la incorporación de éste por las células microalgales se acompaña de una producción de hidrogeniones (H^+), provocando así el descenso del pH del medio y la muerte celular. Por lo tanto, debido a los cambios de pH durante el consumo de nitrógeno en sus diferentes formas en el cultivo de microalgas, se deberá evaluar el requerimiento del ajuste de pH (Kumar et al., 2010).

Además de los cambios de pH que puede generar el exceso de nitrógeno en el efluente de digestato, se encuentra otro inconveniente en las microalgas y es que el amonio no se difunde mediante la membrana celular por lo cual debe regularse su asimilación mientras que el amoniaco se difunde de forma pasiva a través de la membrana y por ende no se puede regular lo cual genera altas concentraciones de amoniaco en la célula (Boussiba y Gibson, 1991). Este exceso de amoniaco trae consigo la alteración o inhibición de la fotosíntesis al dañar el grupo de manganeso (Mn) del complejo de evolución de oxígeno del fotosistema II (PSII) y también aumentar la sensibilidad del PSII al fotodaño (Drath et al., 2008).

El efluente líquido de digestato generalmente tiene una concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ que oscila en el rango de 1000 a 3000 mg L^{-1} (Zhang et al., 2018) y diversas investigaciones han demostrado que concentraciones mayores a 100 mg L^{-1} tienen efecto inhibitor sobre el crecimiento de las microalgas en los efluentes de digestato (Dębowski et al., 2017; Kwon et al., 2019; Park et al., 2010) y para aliviar dichos efectos, se suele recurrir a la dilución con el fin de llevar el nivel de amoniaco a 50-100 mg L^{-1} pero como se ha explicado anteriormente esta técnica no se aplicará en esta investigación, una posible solución a dicho inconveniente es la variación de nutrientes como el amoniaco por medio de la manipulación del tiempo de retención hidráulica, lo cual se explicará de forma detallada en los próximos capítulos.

2.4. TIPOS DE REACTORES UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES

Los sistemas para el tratamiento de efluentes se pueden clasificar en sistemas cerrados, abiertos, híbridos y de biopelícula. Los sistemas de cultivo cerrados ofrecen un control sobre las condiciones de crecimiento y, en consecuencia, permiten una mayor productividad en comparación con los estanques abiertos. Sin embargo, los sistemas de cultivo cerrados son significativamente más caros que los sistemas abiertos para instalar y operar. Los sistemas de cultivo cerrados incluyen fotobiorreactores tubulares, fotobiorreactores de panel plano, fotobiorreactores

tubulares helicoidales y fotobiorreactores de placas (verticales y horizontales). En estanques abiertos, la biomasa de algas se expone al medio ambiente. Aunque los estanques abiertos son menos costosos de construir y operar, están limitados por la incapacidad de controlar adecuadamente las condiciones de crecimiento, como los niveles de irradiación, la temperatura y la contaminación. Los estanques abiertos incluyen estanques con canales impulsados por ruedas de paletas, estanques inclinados de capa delgada, estanques circulares y estanques de tipo lagunar. Otros sistemas de cultivo que no encajan inmediatamente en la categorización indicada anteriormente son los sistemas de cultivo de biopelículas (sólidos) y de cultivo híbrido (Chuka et al., 2020).

A continuación, se presentan las características de los sistemas cerrados y abiertos haciendo hincapié en los más utilizados para el tratamiento de efluentes y a la vez cultivo de microalgas:

2.4.1. Sistemas cerrados

Los sistemas cerrados se componen generalmente de plástico transparente o vidrio y se dividen principalmente en tres tipos de diseños: fotobiorreactores de placa plana, tubulares y de bolsa (Borowitzka, 1990). La ventaja de usar los fotobiorreactores cerrados radica en la capacidad de controlar las condiciones de cultivo por ejemplo el pH, la temperatura y la irradiancia, permite un tratamiento más eficaz y reduce la pérdida de agua por evaporación que suele pasar en sistemas abiertos (Farooq y Ali, 2014). El mezclado en estos sistemas se realiza mediante recirculación con bombas externas (Borowitzka, 1990). Presenta como desventaja altos costos operativos y de capital para su construcción, se ha trabajado en la aplicación de estos fotobiorreactores cerrados para el tratamiento de digestato anaerobio de purines con diferentes eficiencias de remoción de nutrientes y productividades de biomasa pero aun así los costos asociados superan cualquier ventaja aparente (Chuka et al., 2020). Además de la inhibición de la biomasa por las altas concentraciones de oxígeno disuelto donde se genera una reducción de la productividad de la biomasa debido al proceso fotosintéticamente derrochador de fotorrespiración (Sousa et al., 2012).

Cabe resaltar que las altas concentraciones de oxígeno disuelto también son un problema en los sistemas abiertos, pero en menor proporción y puede mejorarse con facilidad por medio de sistemas de desoxigenación utilizando la recirculación (Weissman et al., 1987).

2.4.2. Sistemas abiertos

Los sistemas abiertos son comúnmente más utilizados para el tratamiento de efluentes y cultivo de microalgas debido a los menores costos de construcción y operación que presentan (Borowitzka y Moheimani, 2013). Estos incluyen

estanques con canales impulsados por ruedas de paleta o tipo raceway, estanques de capa fina, estanques circulares y lagunas (Chuka et al., 2020)

2.4.2.1. Reactores tipo raceway

Los reactores tipo raceway o HRAP consisten en un circuito circular cerrado con una profundidad aproximada de 0.25-0.30 m. Generalmente la longitud del estrecho del bucle debe ser mayor que el ancho del reactor debido a que si esta relación es muy baja, las perturbaciones de flujo al final de las curvas afectan el flujo del canal recto lo cual conlleva a consumir más energía, generar zonas muertas y por ende la mezcla se realizaría de forma inadecuada. Una alta relación superficie-volumen del reactor está destinada a proporcionar un área grande para la absorción de la luz solar requerida por las microalgas para crecer (Borowitzka y Moheimani, 2013). La operación del reactor debe ser en flujo turbulento para evitar que las células algales se sitúen en el fondo del reactor, pero no deben superarse los umbrales de turbulencia debido a que se presentaría estrés por turbulencia y muerte de las células (Sompech et al., 2012). Como desventaja en el uso de este tipo de reactores se tiene que al ser abierto presenta alto riesgo de contaminación por otras algas, bacterias y protozoos que puede disminuir la productividad de la biomasa (Borowitzka y Moheimani, 2013).

Los reactores tipo raceway se emplean con frecuencia para el tratamiento de efluentes de aguas residuales y de digestato diluidos y sin diluir con diversas eficiencias de remoción de nutrientes (Arcila y Buitrón, 2017; Arias et al., 2017; de Godos et al., 2010; Su et al., 2011).

Las reactores tipo raceway o HRAP propiamente son estanques de canalización abiertos de poca profundidad (30-40 cm), mezclados con paletas, diseñados para optimizar el tratamiento biológico de aguas residuales (Oswald, 1991). En la práctica su funcionalidad se basa en la relación simbiótica entre las bacterias y las microalgas proporcionando un tratamiento de las aguas residuales y efluentes de digestatos como lo ha demostrado Arcila y Buitrón (2017a), Delgadillo-Mirquez et al (2016) y Serejo et al (2015), empleando poca energía mientras se logra la recuperación de nutrientes disueltos en la biomasa microalgal que al recolectarse puede utilizarse como materia prima para fines energéticos. En comparación con las tecnologías mecánicas convencionales para el tratamiento de aguas residuales y efluentes de digestatos que se utilizan normalmente, los HRAP tiene menores costos en su fabricación y operación (Muga y Mihelcic, 2008). Los HRAP abiertos por lo general se instalan a cielo abierto para lograr el aprovechamiento de la luz solar y así la obtención de una mayor cantidad de biomasa; pueden presentarse en diferentes volúmenes de operación que abarcan desde los 50 L hasta los 5200 m² para grandes industrias.



Figura 4. Reactores tipo Raceway.

En la figura 3 se pueden observar dos tipos de reactores raceway, a la izquierda sistemas HRAP instalados en la UNAM. A la derecha el sistema a gran escala instalado en Queensland, Australia.

2.4.2.2. Reactores inclinados de capa fina

Son reactores abiertos inclinados en ángulo donde el cultivo de algas fluye por la superficie inclinada en una capa delgada, este se recoge en el extremo inferior del reactor y se recircula a la parte superior mediante una bomba (Borowitzka y Moheimani, 2013). Los primeros reactores inclinados de capa fina se equiparon con deflectores lo cual proporcionó una mezcla intensiva, evitando la sedimentación de las algas y aumentando la exposición de las células a periodos de luz y oscuridad (Schädler et al., 2020), pero como consecuencia se generaron costos de inversión dos veces más altos en comparación con los reactores inclinados regulares, alto consumo de energía por el uso de las bombas, mayor tiempo en el proceso de limpieza de la superficie, posteriormente diseñaron modelos donde se redujo la inclinación y se eliminaron los deflectores (Doucha y Lívanský, 1995), seguido de esto el sistema se implementó con una capa de 6 mm de espesor y alcanzó una densidad de algas muy alta en su cosecha (Doucha y Lívanský, 2006).

Los reactores inclinados de capa delgada presentan como ventaja que al ser más corta la trayectoria de la luz, se genera una atenuación de luz más baja debido a la capa delgada y la turbulencia alta da como resultado una mejor mezcla y una mejor utilización de los periodos de luz y oscuridad (Doucha y Lívanský, 1995, 2006). Por lo anterior se ha recomendado el uso de este tipo de reactor para el tratamiento de efluentes de digestato anaerobio ya que al tener alta turbidez se beneficia al presentarse mayor atenuación de la luz. Sin embargo, aunque las velocidades de flujo turbulentas en este tipo de reactor proporcionan mejores capacidades de mezcla, podría ser necesario un mezclado aún más sistemático para una mejor utilización de la luz para el tratamiento de digestatos lo cual como se vio al inicio de este apartado, acarrearía mayores costos. Asimismo, la productividad volumétrica para este tipo de reactores deberá ser mucho mayor para competir con los reactores

tipo raceway, es decir que para tratar mayor cantidad de efluente proveniente de digestato y generar mayor rendimiento de la biomasa debería utilizarse un área muy grande con la cual a veces no cuentan las industrias o las comunidades (Chuka et al., 2020).

2.4.2.3. Lagunas, estanques poco profundos y estanques mixtos

Son los métodos más antiguos para el tratamiento de aguas residuales y se han utilizado por miles de años donde la mezcla se realiza mediante el viento y la convección y se realiza un manejo cuidadoso del flujo del agua a través de los estanques. La productividad en lagunas y estanques poco profundos generalmente es baja y al igual que en los estanques mixtos donde presentan profundidades entre 50 y 80 cm y se airean desde el fondo del estanque pero esto genera que la mezcla sea desigual y la producción de biomasa sea baja y por ende el tratamiento del efluente (Borowitzka y Moheimani, 2013).

Revisando entonces los diversos reactores que existen para el tratamiento de efluentes de digestatos anaerobios, los HRAP resultan ser los más adecuados para el desarrollo de esta investigación teniendo en cuenta el costo-beneficio al ser de bajo costo debido a un menor costo de operación, menor tiempo de retención hidráulica y costos de construcción más baratos en comparación con otros sistemas de tratamiento, como los sistemas de lodos activados, reactores de capa inclinados de capa fina y los reactores cerrados. Conservan las ventajas de los estanques convencionales (anaeróbicos, facultativos) debido a la sencillez y la economía, pero superan muchas de sus desventajas (calidad de efluente deficiente e inconsistente, eliminación limitada de nutrientes y patógenos) y tienen el beneficio adicional de recuperar nutrientes en biomasa de algas cosechables para uso beneficioso como fertilizante, alimento o biocombustible (Young et al., 2017).

2.5. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN EL DESEMPEÑO DE LOS REACTORES

2.5.1. Influencia de la luz

Cuando se desea generar un cultivo de microalgas fototróficas, la luz es uno de los parámetros de crecimiento fundamentales al ser el componente principal en el proceso de fotosíntesis de las microalgas, esta puede provenir ya sea de fuentes naturales como el sol o artificiales como lámparas (Wang et al., 2007) representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperíodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Abalde Alonso et al., 1995). En el crecimiento de las microalgas la disponibilidad de luz para todas las células microalgales puede verse reducida debido a un efecto

denominado autosombreado generado al aumentarse la concentración de la biomasa durante el crecimiento (Richmond, 2014). Además, debe tenerse en cuenta que se necesita cierta intensidad de luz para que pueda realizarse la fotosíntesis de forma adecuada donde se alcanza un nivel de saturación a intensidades variables en función de la especie, por ejemplo, las intensidades de la luz solar que van desde $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se consideraron condiciones óptimas en términos de producción y tratamiento de biomasa eficiencias durante el cultivo exterior de *Chlorella spp.* en aguas residuales (González-Camejo et al., 2019), altas intensidades de luz pueden generar que la cantidad de fotones que absorbe el aparato fotosintético sea mayor (50 a 80%) que el consumo de fotones por la reacción de fotosíntesis y el exceso de electrones se acumula provocando una sobreproducción de oxígeno reactivo que inhibe la fotosíntesis obteniendo como resultado la reducción de la productividad de la biomasa y la eficiencia de eliminación de nutrientes (Hu et al., 2008).

2.5.2. Influencia de la temperatura

La temperatura es otro parámetro fundamental para el crecimiento de las microalgas. La biomasa microalgal responde continuamente a la temperatura ambiental. La temperatura celular se iguala a la temperatura del medio de cultivo, en contraste con otros parámetros del medio como el pH. Además de afectar a las reacciones celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa. En las microalgas existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica, aumentando la tasa de crecimiento cuando aumenta la temperatura, dentro de un rango óptimo, por encima del cual el crecimiento disminuye, a veces bruscamente, hasta llegar a cero si continúa el aumento de la temperatura (Abalde Alonso et al., 1995). El rango óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25°C. La tolerancia varía según la especie las formas delicadas, como *Isochrysis*, no soportan temperaturas superiores a los 25°C, mientras las formas más resistentes, como *Chlorella*, crecen bien hasta los 36°C (Laing y Ayala, 1990). A la intemperie, la temperatura dependerá de la ubicación del experimento y la estación del año en la que se encuentre.

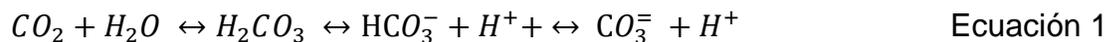
2.5.3. Influencia del pH

El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal. Las membranas plasmáticas de las células microalgales no son libremente permeables a los iones hidrógeno e hidroxilo, por lo tanto las concentraciones de hidrogeniones intracelular y extracelular no están necesariamente equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana (Abalde Alonso et al., 1995).

Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo. Cada

microalga presenta un pH óptimo para su cultivo (entre 7 y 8). Un descenso de pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH, hasta un cierto límite (Richmond, 2014). El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃²⁻), e influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas.

El CO₂, al disolverse en agua, forma moléculas de ácido carbónico (H₂CO₃). Este ácido se encuentra en una proporción menor que el CO₂ disuelto (acuoso) debido a que en el agua se disocia con gran facilidad en protones H⁺ e iones bicarbonato HCO₃⁻, lo anterior se puede observar en la ecuación 1.



A su vez, el pH se ve afectado por la capacidad tampón y composición del medio de cultivo, cantidad de dióxido de carbono disuelto, temperatura, que a su vez controla la solubilidad del CO₂ y actividad metabólica de las células microalgales; la fuente de nitrógeno suministrada para el crecimiento juega un papel interactivo muy importante (Abalde Alonso et al., 1995). Es por esto que el pH de un cultivo varía con el desarrollo del mismo. El crecimiento fotosintético de las microalgas provoca cambios en el pH del medio, y si éste aumenta hasta pH 9 el carbonato puede precipitar, lo que conlleva una retirada de nutrientes del medio.

2.5.4. Influencia de los nutrientes

El cultivo de microalgas requiere nutrientes como nitrógeno y fósforo. La disponibilidad de estos nutrientes tiene un impacto significativo en el crecimiento y propagación de microalgas y amplios efectos sobre sus lípidos y composición de ácidos grasos (Chu et al., 2014), además de ser importantes para el crecimiento y metabolismo de las células algales. El nitrógeno es un elemento fundamental para la formación de proteínas y ácidos nucleicos, mientras que el fosfato es una parte integral de las moléculas esenciales como el ATP, siendo el portador de energía en las células y parte de la columna vertebral del ADN y el ARN, que son macromoléculas esenciales para todas las células vivas (El-Kassas, 2013). El consumo de estos macronutrientes da como resultado un aumento en la densidad de biomasa y la posterior remoción de nutrientes del medio circundante que es llevado a cabo por procesos biológicos (nitrificación/desnitrificación) y fenómenos de extracción como la volatilización de amoníaco y la precipitación de fósforo, esto se debe potencialmente a los altos niveles de pH inducidos por el crecimiento de microalgas fotosintéticas (Li et al., 2011). Con el fin de conseguir un alto rendimiento de biomasa, remoción de nutrientes y una composición bioquímica deseada en las microalgas se podría modificar los ingredientes del medio o las condiciones de cultivo para obtener un mayor rendimiento de biomoléculas deseables (Procházková et al., 2014).

Para el caso del tratamiento de digestato, debe tenerse en cuenta la concentración adecuada de nutrientes disponibles para las microalgas, esto con el fin de evitar la inhibición o muerte celular por exceso o falta de los mismos, evaluando la capacidad de asimilación de las algas. Para el caso del nitrógeno debe considerarse el pH, puesto que este regula la especie de nitrógeno presente y su toxicidad como se mencionó en el apartado 2.3.2. verificando si es necesario ajustarlo, además se debe evaluar el requerimiento de una o varias diluciones del digestato que permitan la disminución de la carga de nitrógeno debido a que este se encuentra en concentraciones elevadas en el mismo, efectuando dichas diluciones con la manipulación del tiempo de retención hidráulica y no con agua potable o agua proveniente de la planta de tratamiento de agua residual de tal forma que se evita que esta sea tratada nuevamente de forma innecesaria.

2.6. CARACTERÍSTICAS DEL DIGESTATO

La digestión anaerobia es una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno que da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono), conocida como "biogás" y a una suspensión acuosa o "lodo" que contiene los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica. La materia prima preferentemente utilizada para ser sometida a este tratamiento es cualquier biomasa residual que posea un alto contenido en humedad, como restos de comida, restos de hojas y hierbas al limpiar un jardín o un huerto, residuos ganaderos, lodos de plantas depuradoras de aguas residuales urbanas y aguas residuales domésticas e industriales (Lorenzo y Obaya, 2005).

El producto principal de la digestión anaerobia es el biogás, el cual es una mezcla gaseosa de metano (50 a 70 %) y dióxido de carbono (30 a 50 %), con pequeñas proporciones de otros componentes (nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, sulfuro de hidrógeno), cuya composición depende tanto de la materia prima como del proceso en sí. La cantidad de gas producido es muy variable, aunque generalmente oscila alrededor de los 350 l/kg de sólidos degradables, con un contenido en metano del 70 % (Lorenzo y Obaya, 2005). Sin embargo, aunque la digestión anaerobia se considera el método más sostenible para producir energía (biogás) (Scarponi et al., 2021b) tratando los residuos orgánicos o los residuos obtenidos del tratamiento de aguas residuales, genera otro residuo compuesto por una fracción sólida y líquida cuyas características dependen del tipo de sistema utilizado y su composición es una mezcla entre el influente "estabilizado" y biomasa microbiana producida en la gran mayoría de casos, arqueas metanógenas, este nuevo residuo podría considerarse como un producto más mineralizado que el influente con lo cual presenta mayor contenido de nitrógeno amoniacal y fósforo y que requiere ser tratado y/o aprovechado. Por lo general, el digestato se somete a una separación sólido/líquido y la fracción líquida se envía de regreso a la planta de tratamiento donde estos contaminantes se eliminan biológicamente (Fdez et al., 2011).

Una opción prometedora de bajo costo consiste en utilizar digestato como medio de cultivo (y fuente de nitrógeno y fósforo) para microalgas, cuya biomasa puede convertirse en productos valiosos (Bjornsson et al., 2013), incluidos los biocombustibles, como indica Kwon et al (2019), quienes obtuvieron como resultado que *C. vulgaris* creció sin ningún signo de inhibición en digestato porcino diluido 10 veces con una productividad de biomasa mejorada de $0.57 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y obtuvieron una eliminación de nutrientes de 98.7-99.8% para $\text{NH}_3\text{-N}$ y 41-62,5% para fósforo total o Prajapati et al (2014b) quienes encontraron que la fracción líquida de digestato diluida (concentración del 30%) fue óptimo para el crecimiento de algas ($0,79 \pm 0,064 \text{ g L}^{-1}$), registrando además, una eliminación del 69,99-89,31% de nutrientes y DOQ_s con el crecimiento de algas. No obstante, la configuración adecuada de reactor, concentraciones y tiempo de retención hidráulica apropiada aún se encuentran en estudio de forma que estas logren una remoción adecuada de la carga orgánica, nutrientes y generen gránulos sedimentables que permita la recolección y aprovechamiento de la nueva biomasa microalgal.

2.7. TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICA

El Tiempo de Retención Hidráulica (TRH) es el tiempo que una unidad de fluido permanece en un reactor, para este caso será el tiempo que permanecerá el efluente de digestato anaerobio en el reactor.

En este proyecto de investigación se estudiarán tres tiempos de retención hidráulica que permitirán la variación de la carga orgánica del efluente de digestato para lo cual se escogieron tiempos de 14, 10 y 6 días los cuales tendrían cargas orgánicas de 68.4, 95.7 y 159.5 $\text{mg DQO}_s \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ respectivamente, escogidas teniendo en cuenta la capacidad de asimilación de las microalgas basados en la revisión bibliográfica de la tabla 2.

Tabla 2. Revisión de TRH y eficiencias de remoción de nutrientes para efluentes de digestato provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales

Método de pretratamiento	TRH (d)	Concentración inicial N-NH ₄ ⁺ posterior al pretratamiento	Concentración asimilada de N-NH ₄ ⁺	Concentración removida de N-NH ₄ ⁺	Fuente
Filtrado a través de un filtro de 8 µm (papel de filtro Whatman No. 2. Dilución 4 veces con agua desionizada para maximizar el crecimiento de las algas.	5	245 ± 21 mg L ⁻¹	15 mg L ⁻¹ d ⁻¹	75 mg L ⁻¹	(Bankston et al., 2020)
Centrifugación 4696 x g por 30 minutos y filtración por papel de filtro Whatman No 4 (20-25 µm), No 1 (11 µm), No 2 (8 µm), No 0,5 (2,5 µm), fibra de vidrio Advantec GA-55 (1,6 µm), fibra de vidrio GC-50 (1,2 µm), membrana de éster de celulosa mixto Advantec (0,8 µm) y fibra de vidrio Whatman GF-F (0,7 µm). Dilución 16x	5	2000 mg L ⁻¹ controlando el pH a 7.5	10 mg L ⁻¹ d ⁻¹	50 mg L ⁻¹	(Wang et al., 2019)
Pretratamiento de digestato con lodos activados al 2%	5	1100 mg L ⁻¹	40 mg L ⁻¹ d ⁻¹	200 mg L ⁻¹	(Wang et al., 2019)
Centrifugación a 4696 x g 15 min, filtración por papel de filtro Whatman No. 4, No. 1, No. 2 No. 5, Advantec GA-55, GC-50, GF-75), posteriormente pretratamiento de digestato con lodos activados al 2%, ajuste de pH a 7,5, aireación a 1 vvm de aire durante 1 o 4 días seguido de centrifugación y filtración inmediatas por filtro	5	Concentraciones entre 205 y 1372 mg L ⁻¹	17-30 mg L ⁻¹ d ⁻¹	85-150 mg L ⁻¹	(Wang et al., 2021)

Whatman No. 5, Advantec GC-50 y luego GF-75					
Filtración con carbón vegetal y un sistema de filtración de arena de alimentación lenta para eliminar los sólidos suspendidos y reducir turbidez. No dilución ni esterilización	5	a. 800 mg L ⁻¹ b. 1600 mg L ⁻¹	a. 40.9± 9.5 mg L ⁻¹ d ⁻¹ b. 63.7± 12.1 mg L ⁻¹ d ⁻¹	a. 205 mg L ⁻¹ b. 320 mg L ⁻¹	(Ayre et al., 2017)
Dilución por triplicado al 2,5%, 5%, 10% y 20% con agua desionizada. Se trabajó con 2.5%. Digestato bruto (DB) Filtración por membrana: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF)	28	DB: 4016 mg L ⁻¹ MF: 3146 mg L ⁻¹ UF: 1433 mg L ⁻¹ NF: 1940 mg L ⁻¹	No mencionan	Recuperación del 95% de nitrógeno y fósforo por filtración por membrana	(Fernandes et al., 2020b)
Dilución 1:10. Digestato probado en tres condiciones diferentes: a. digestato sin pretratamiento, b. digestato después de centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos y c. digestato después de filtración (0,45 µm) con filtros de acetato de celulosa.	8	50 mg L ⁻¹	6 mg L ⁻¹ d ⁻¹	48 mg L ⁻¹	(Scarponi et al., 2021a)
Diluciones: a. 1:10, b. 1:15, c. 1:2 y d. 1:25	14	1634 mg L ⁻¹ inicial Después de diluciones 1:10 = 163 mg L ⁻¹ 1:15 = 100-120 mg L ⁻¹ 1:20 = 80-100 mg L ⁻¹ 1:25 = 60 mg L ⁻¹	1:10 = 6.9-7.8 mg L ⁻¹ d ⁻¹ 1:15 = 4.7-6.1 mg L ⁻¹ d ⁻¹ 1:20 = 3.6-5.2 mg L ⁻¹ d ⁻¹ 1:25 = 3-3.5 mg L ⁻¹ d ⁻¹	1:10 = 97-109 mg L ⁻¹ 1:15 = 66-85 mg L ⁻¹ 1:20 = 50-73 mg L ⁻¹ 1:25 = 42-49 mg L ⁻¹	(Franchino et al., 2013)
Centrifugación y Dilución con agua de grifo 1:10	10	112 mg L ⁻¹	8.37 mg L ⁻¹ d ⁻¹	84 mg L ⁻¹	(Gu et al., 2021)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1. POSTULADOS

1. La digestión anaerobia se considera el método más sostenible para producir energía por medio del tratamiento de residuos orgánicos; sin embargo, genera otro residuo llamado digestato, caracterizado generalmente por un alto contenido de nitrógeno y fósforo (Scarponi et al., 2021a).
2. Las microalgas necesitan grandes cantidades de fósforo y nitrógeno para crecer y almacenar subproductos y es posible utilizar los nutrientes del digestato (fracción líquida) como sustrato para el crecimiento de las mismas (Phang et al., 2000).
3. El cultivo biomasa microalgal lleva a la generación de productos metabólicos potencialmente valiosos que pueden llevar a la producción de biocombustibles (Chinnasamy, Bhatnagar y Hunt, 2010) ya que contienen aproximadamente entre 40 a 50% de contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas in vivo (Singh y Gu, 2010).
4. La aplicación del tratamiento de digestatos empleando sistemas microalga bacteria es una estrategia para disminuir el costo operativo y presentar una visión de economía circular al remediar el digestato y generar productos de alto valor (Toledo-Cervantes et al., 2016) (biomasa) como acondicionadores de suelos y biofertilizantes Toledo-Cervantes et al., 2016).
5. Una dificultad identificada en el tratamiento de digestato es su color oscuro, el cual reduce la penetración de luz y por ende la cantidad de luz disponible para el crecimiento de las microalgas (Marcilhac et al., 2014), esto se puede solucionar por medio de la operación adecuada del reactor manipulando el tiempo de retención hidráulica y la concentración de carga orgánica (Medina y Neis, 2007).

3.2. HIPÓTESIS

Los sistemas microalga-bacteria que utilizan gránulos y agregados removerán eficientemente la materia orgánica y nutrientes presentes en la fracción líquida de digestato. Se espera que se cumpla lo anterior cuando el tiempo de retención hidráulica (TRH) sea adecuado para obtener una carga orgánica de digestato tal que se no se obstruya el paso de luz al sistema, haya una adecuada remoción de nutrientes, materia orgánica y se mantenga la estructura de los agregados de tal forma que permanezca una adecuada sedimentación.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tiempo de retención hidráulica sobre la remoción de nutrientes y materia orgánica en un reactor algal de alta tasa con agregados de microalgas-bacterias alimentado con la fracción líquida de digestato municipal proveniente de un reactor anaerobio termofílico.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener un consorcio microalga-bacteria empleando como inóculo lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales y agua residual sintética utilizando dos reactores de alta tasa a la intemperie para producir agregados microalga-bacteria con especies nativas del inóculo.
2. Evaluar la influencia de tres cargas orgánicas resultantes de variar tres tiempos de retención hidráulica (14, 10 y 6 días), sobre la remoción de materia orgánica y nutrientes del digestato, la sedimentabilidad del proceso y el tamaño de agregados para comparar y elegir el tiempo de retención más adecuado para el tratamiento del mismo.
3. Relacionar el efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica en el sistema microalga-bacteria como pH, temperatura y oxígeno disuelto para identificar los procesos del sistema microalga-bacteria durante el ciclo de luz y oscuridad.

5. METODOLOGÍA A EMPLEAR

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas del Instituto de Ingeniería Unidad Académica Juriquilla, localizado en el estado de Querétaro.

5.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental constó de dos fases observables en la figura 5:

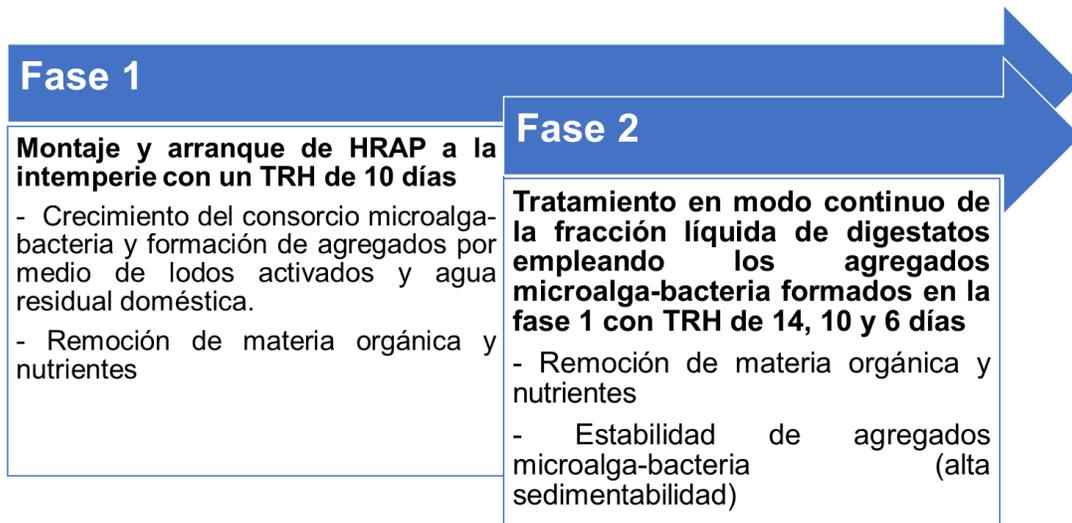


Figura 5. Fases de la estrategia experimental

A continuación, se presenta un diagrama con las dos fases que se desarrollaron en el proyecto, donde en la fase 1 se realizó el montaje y arranque de los reactores utilizando un tiempo de retención hidráulica de 10 días, por medio de este se formaron los agregados microalga-bacteria y obtenidos estos, procedió a utilizarse en la fase 2 con el fin de realizar el tratamiento en modo continuo de la fracción líquida de digestatos evaluando la influencia de tres cargas orgánicas resultantes de variar tres tiempos de retención hidráulica (14, 10 y 6 días), sobre la remoción de materia orgánica y nutrientes, la sedimentabilidad del proceso y el tamaño de agregados.

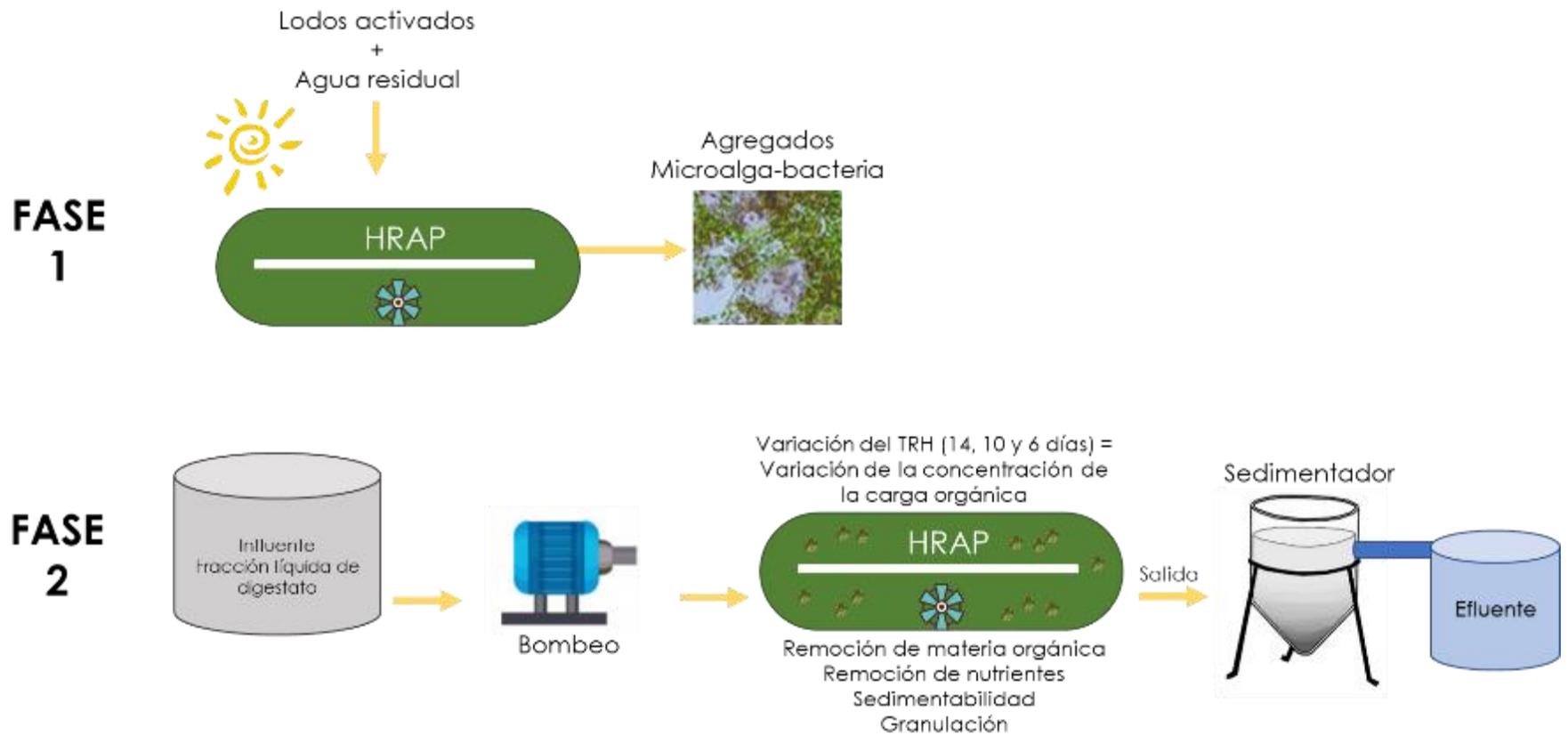


Figura 6. Diagrama del proyecto

5.2. DESCRIPCIÓN DEL HRAP A LA INTEMPERIE

Se emplearon dos reactores algales de alta tasa tipo raceway (HRAP), ambos operados bajo las mismas condiciones (replicas). Los reactores se construyeron en fibra de vidrio con un volumen total de 100 L, un volumen de trabajo de 70 L y una altura del líquido de 15 cm. Ambos reactores estuvieron equipados con un impulsor de 4 cuchillas de acero inoxidable, cada impulsor conectado a un motor asincrono (Transtecno 0.5 HP) y un variador de velocidad (Altivar 12 Schneider electric) configurado a 10 revoluciones por minuto (RPM). Los reactores tuvieron instalada una línea de drenaje con tubería PVC en cada reactor para el lavado y vaciado. Para su funcionamiento, se emplearon dos bombas peristálticas de doble cabezal para ingresar el influente y para llevar el efluente al sedimentador, se tuvo instalada una salida con tubería PVC que funcionaba por gravedad ajustada a 15 cm de altura (nivel del líquido dentro del reactor). Los reactores estuvieron cubiertos con una capa de malla-sombra de polietileno de alta densidad en color negro para limitar el nivel de irradiancia incidente en ambos reactores y el ingreso de insectos a los mismos. En la figura 7 se presenta un diagrama de los reactores y en la figura 8 una fotografía de los mismos.

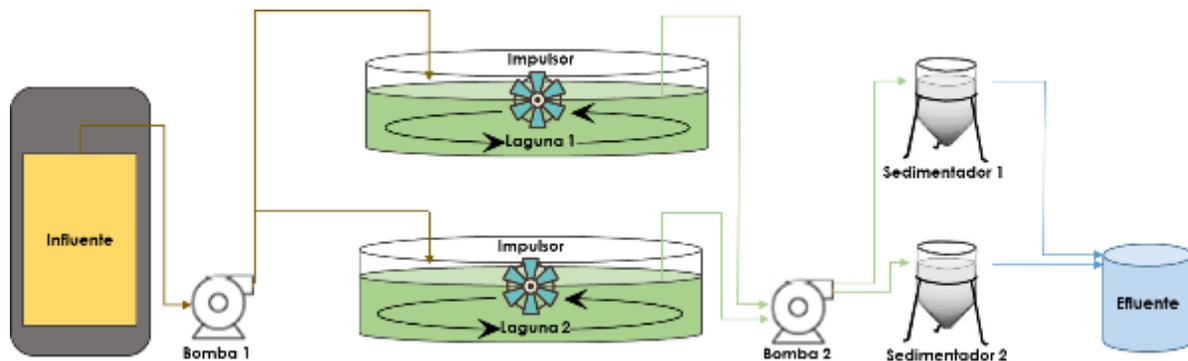


Figura 7. Diagrama de funcionamiento del sistema microalga-bacteria.



Figura 8. Reactores algales de alta tasa utilizados

5.3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El sistema se instaló perpendicularmente al norte geográfico para aprovechar al máximo la trayectoria del sol durante el día en Juriquilla, Querétaro a una altura de 1900 msnm y coordenadas N 20° 42' 12.119"; 100° 26' 45.02 O".



Figura 9. Ubicación de los reactores en el LIPATA

5.4. IRRADIANCIA SOLAR

Los valores de radiación solar se obtuvieron de la Estación Meteorológica del Centro de Geociencias de la UNAM Campus Juriquilla <https://www.ruoa.unam.mx/index.php?page=estaciones&id=3>

5.5. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Se utilizó el medidor multiparamétrico marca HANNA modelo HI5522 para la medición de pH y la sonda con membrana tipo Clark marca YSI modelo 50B para la medición de oxígeno disuelto y temperatura.

5.6. INÓCULO

Se empleó como inóculo lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales ubicada en San Pedro Mártir en Querétaro. Se realizó el muestreo dentro del tanque de aireación, se colectó efluente secundario del proceso de tratamiento de agua, el cual se empleó como medio de cultivo. Los reactores HRAP se inocularon el mismo día del muestreo.

5.7. AGUA RESIDUAL PARA EL CRECIMIENTO DEL CONSORCIO MICROALGA-BACTERIA

El agua residual sintética es un medio compuesto por 538 mg DQO L⁻¹ (50% contribuido por sacarosa y 50% por ácido acético); 4 mg KH₂PO₄ L⁻¹, 30 mg NH₄Cl L⁻¹, 10 mg CaCl₂ L⁻¹, 5 mg MgSO₄.H₂O L⁻¹, 5 mg FeSO₄.7H₂O L⁻¹ y 1 ml de una solución de elementos traza conformada por 50 mg H₃BO₃ L⁻¹, 50 mg ZnCl₂ L⁻¹, 50 mg CuCl₂ L⁻¹, 50 mg MnSO₄.H₂O L⁻¹, 50 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O L⁻¹, 50 mg AlCl₃ L⁻¹, 50 mg CoCl₂.6H₂O L⁻¹ y 50 mg NiCl₂ L⁻¹ (Huang et al., 2015).

5.8. DIGESTATO ANAEROBIO

En la experimentación se empleó la fracción líquida de un digestato proveniente de un proceso de digestión anaerobia. La fracción líquida del digestato se colectó de un reactor anaerobio productor de biogás a partir de lodos de purga de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales de San Pedro Mártir en Querétaro. El proceso de digestión anaerobia funciona en termofilia (55°C). La planta de tratamiento realiza la separación de las dos fracciones del digestato empleando una centrifuga que opera a 3600 RPM con una eficiencia de separación del 90%. El muestreo se realizó a la salida del proceso de separación, el efluente se colectó en bidones de 20 L y se transportó al laboratorio, se caracterizó y almacenó a 4°C.

5.9. MUESTREO

Semanalmente se colectaron muestras simples de 50 mL del efluente y 50 mL del cultivo dentro del reactor para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO_s), nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺), nitrato (N-NO₃⁻), nitrito (N-NO₂⁻), fosfato (P-PO₄³⁻), sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Diariamente se colectaron muestras de 1L del cultivo para la realización de prueba de velocidad de sedimentación y porcentaje de sedimentabilidad.

La observación del cultivo de ambos reactores se realizó empleando 10 mL de muestra, se capturaron imágenes empleando microscopio y estereoscopio.

5.10. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

5.10.1. Sólidos suspendidos totales y volátiles

La medición de sólidos suspendidos totales y volátiles se realizó con el método gravimétrico aprobado por el LIPATA, se emplearon filtros de fibra de vidrio Whatman Grade 410 de 5.5 cm de diámetro, los cuales se sometieron a pretratamiento para obtener peso constante, se filtró un volumen de 60 mL de agua destilada empleando un Kitasato conectado a una línea de vacío, una vez lavados los filtros se ingresaron a secado a 105 °C por 20 min, después 15 minutos a 550 °C, se reingresaron al secado de 105 °C por 12 horas y finalmente se dejaron reposar en el desecador por 30 minutos. Se registró el peso del filtro y nuevamente ingresaron al secado de 105 °C por 1 hora, dejándolos reposar en el desecador 30 minutos, se registró el peso, considerándolo constante hasta obtener una variación menor al 10% entre cada peso registrado. Una vez tratado el filtro se filtró un volumen de 10 a 100 mL de muestra homogénea, se ingresó a secado a 105 °C por 12 horas, luego reposo en el desecador por 30 minutos y se registró el peso obtenido en la balanza analítica, finalmente se calcinaron los filtros a 550 °C por 15 minutos y se dejaron reposar 30 minutos en el desecador para posteriormente registrar el peso de cenizas en el filtro. Finalmente se aplicaron las ecuaciones 2 y 3.

$$SST (g L^{-1}) = \frac{Peso_{filtro+biomasa\ seca} (g) - Peso_{filtro\ a\ peso\ constante} (g)}{Volumen\ muestra\ filtrada (mL)} * 1000 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$SSV (g L^{-1}) = \frac{Peso_{filtro+biomasa\ seca} (g) - Peso_{filtro+cenizas} (g)}{Volumen\ muestra\ filtrada (mL)} * 1000 \quad \text{Ecuación 3}$$

5.10.2. Demanda química de oxígeno

Se realizó con el método 8000 – DQO digestión con ácido sulfúrico y dicromato de potasio con rango de 20 a 1500 mg O₂ L⁻¹ del manual de análisis de agua de Hach. Para la fracción soluble de las muestras se filtró un volumen de 50 mL empleando membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm. Se agregó un volumen de 2 mL de la muestra filtrada a un tubo preparado y se sometió a un proceso de digestión 150 °C por 2 horas, se cuantificó la concentración a través de una lectura en el espectrofotómetro DR2800 utilizando el programa número 435.

5.10.3. Nitrógeno amoniacal

Se realizó con el método de fenol-hipoclorito. Para la fracción soluble de las muestras se filtró un volumen de 50 mL empleando membranas de nitrocelulosa de

0.45 μm . Se agregó un volumen de 5 mL a un tubo de ensayo, posterior a esto se agregaron 0.2 mL de la solución de fenol, 0.2 mL de solución de nitroprusiato y 0.5 mL de solución oxidante. Una vez preparada la muestra a analizar, se dejó reposar en a temperatura ambiente (22-27 °C) y en oscuridad por al menos 1 hora desarrollándose un color azul estable por 24 hrs. Se leyeron las muestras a una absorbancia de 640 nm, leyendo primero el blanco.

5.10.4. Fosfato

Se realizó con el método 10127 – Digestión de molibdovanadato con ácido persulfato con rango de 1.0 a 100.0 mg $\text{PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$ del manual de análisis de agua Hach. Para la fracción soluble de las muestras se filtró un volumen de 50 mL en membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm . Se agregó un volumen de 5 mL de la muestra filtrada a un tubo preparado y se adicionó una almohadilla de persulfato de potasio, se sometió a un proceso de digestión a 150 °C por 30 minutos posteriormente se agregaron 2 mL de hidróxido de sodio 1.54 N y 0.5 mL de molibdovanadato, finalmente se dejó reaccionar por 7 minutos y se cuantificó la concentración a través de una lectura en el espectrofotómetro DR2800 utilizando el programa número 542.

5.10.5. Nitrato

Se realizó por medio de cromatografía iónica a través del equipo Dionex marca ThermoFisher Scientific. Para la fracción soluble de las muestras se filtró un volumen de 50 mL en membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm . Se agregaron 2 mL de muestra a una jeringa y se leyó en el equipo Dionex. Leída la muestra se obtuvo el área de la curva del nitrato y se obtuvo la concentración del mismo por medio de una curva de calibración previamente realizada.

5.10.6. Nitrito

Se realizó por medio de cromatografía iónica a través del equipo Dionex marca ThermoFisher Scientific. Para la fracción soluble de las muestras se filtró un volumen de 50 mL en membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm . Se agregaron 2 mL de muestra a una jeringa y se leyó en el equipo Dionex. Leída la muestra se obtuvo el área de la curva del nitrito y se obtuvo la concentración del mismo por medio de una curva de calibración previamente realizada.

5.10.7. Nitrógeno total Kjeldhal

Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la muestra a analizar y se llevó a un tubo kejdhal, posterior a esto se agregaron dos pastillas catalizadoras, 15 mL de H_2SO_4 concentrado y 5 mL de peróxido de hidrógeno, luego se llevó el tubo a digestión por

ciclos de 30 minutos – 30 minutos – 60 minutos. Finalizada la digestión se dejó enfriar el tubo y se llevó a destilación con solución de ácido bórico al 4% en equipo de destilación, al finalizar se obtuvieron 250 mL de destilado y a este se le realizó prueba de nitrógeno amoniacal por medio del kit “AmVer™ amoníaco de alto Gama Test ‘N Tube™ Reactivo Conjunto Rango 0-50 mg/L N” Cat. 2606945-LM marca HACH.

Para la realización de la prueba con el kit, se filtró la muestra con membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, se tomó un tubo del kit y se le agregó 0.1 mL del filtrado, posteriormente se agregó una almohadilla de salicilato de amonio del kit al tubo, se tapó y se agitó vigorosamente, luego se agregó una almohadilla de cianurato de amonio del kit, se tapó y se agitó vigorosamente, se dejó reaccionar por 20 minutos y se cuantificó la concentración a través de una lectura en el espectrofotómetro DR2800 utilizando el programa número 343.

5.10.8. Observaciones al microscopio

Se realizó la observación del cultivo microalga-bacteria empleando el microscopio Nikon Eclipse 90i con el software Nis Elements – Br Basic Research y el estereoscopio Carl Zeiss Stemi DV4 con el software Zen.

5.10.9. Índice volumétrico de lodos (IVL) y porcentaje de sedimentabilidad

Se realizó con los métodos 2710C y 2710D del manual de APHA (2005). Se emplearon probetas de vidrio para determinar el volumen de lodos sedimentables. Agregando un volumen de 1 L de muestra homogénea en una probeta de vidrio y dejando reposar 30 min, al término de la prueba se registró el volumen de sedimento al fondo de la probeta, finalmente se calculó el índice de volumen de lodos (IVL) aplicando la Ecuación 4.

$$IVL (mL g SST^{-1}) = \frac{\text{Volumen de lodos sedimentables } (mL L^{-1}) * 1000}{\text{Sólidos suspendidos totales } (mL L^{-1})} \quad \text{Ecuación 4}$$

Para el porcentaje de sedimentabilidad se tomó un volumen de 100 mL del efluente clarificado de la prueba del IVL, a esta muestra se le determinaron los sólidos suspendidos totales, finalmente se empleó la Ecuación 5 para calcular la eficiencia de separación de la biomasa en el efluente del sistema.

$$\text{Porcentaje de sedimentabilidad } (\%) = 100 * \left(1 - \frac{X_e}{X}\right) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde

X_e = SST del efluente clarificado – 30 minutos de reposo

X = SST en el reactor

5.10.10. Velocidad de sedimentación (VS)

Se realizó de acuerdo con Zhaowei y Belovich (2010) y Yu, Mu, y Ren (2008), empleando una probeta de vidrio donde se vertió un volumen de 1 L de muestra homogénea, se tomó el tiempo de sedimentación por cada 100 mL (3.5 cm). Los datos se graficaron para obtener la velocidad de sedimentación en $m\ h^{-1}$.

5.10.11. Extracción y cuantificación de EPS (carbohidratos y proteínas)

Se realizó la extracción de EPS ligados (sustancias poliméricas extracelulares) en forma de carbohidratos y proteínas, empleando un volumen de muestra homogénea de 50 mL, concentrando la biomasa por centrifugación a 3500 RPM por 20 minutos, se retiró el sobrenadante y a la biomasa obtenida se le adicionaron 50 mL de solución salina isotónica de NaCl al 0.9%, se sometió a tratamiento térmico en un baño de agua durante 1 hora a 80 °C, se centrifugó a 3500 RPM por 20 minutos y se filtró en un filtro de fibra de vidrio GF/A – 1.6 μm , a la muestra filtrada se le determinaron carbohidratos y proteínas (Arellano, 2013).

Los carbohidratos se determinaron de acuerdo con el método fenol-ácido sulfúrico, empleando D-glucosa como estándar (Dubois et al., 1956) y las proteínas se determinaron de acuerdo con el método de Lowry, empleando albumina de suero bovino como estándar (Lowry et al., 1951).

Para la determinación de carbohidratos, se preparó una solución de fenol al 80% diluyendo 4 g en 20 ml de agua destilada en un frasco ámbar para su preservación. Preparado el reactivo, se continuó con el siguiente procedimiento: Se tomó un tubo de ensayo y se le agregó 1 ml de la muestra a analizar, se agregaron 25 μl de solución de fenol al 80 % y 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, se mezcló en agitador vortex por 30 segundos y se colocó en un baño de agua a temperatura ambiente y dejando reposar la muestra por 10 minutos, transcurridos los 10 minutos, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm leyendo primero el blanco y por medio de una curva de calibración realizada con glucosa, se obtuvo la concentración.

Para la determinación de proteínas, se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ diluir 18 g en 200 mL de agua destilada.

Solución B: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ diluir 1g en 50 mL de agua destilada.

Solución C: Tartrato de Sodio y Potasio en agua destilada diluir 0.6725 g en 50 mL de agua destilada.

Solución D: NaOH diluir 2 g en 50 mL de agua destilada.

Solución E: SDS diluir 0.536 g en 50 mL de agua destilada.

Reactivo de Folín: úsese en concentración 2N diluir 1:10.

Reactivo de cobre: Preparado inmediatamente antes de usarse, mezclando las soluciones A, B y C en proporción 13:1:1 según cantidad de pruebas a analizar.

Reactivo de formación de complejo: Preparado inmediatamente antes de usarse, mezclando las soluciones reactivo de cobre, D y E en proporción 3:1:1 según cantidad de pruebas a realizar.

Preparados los reactivos, se continua con el siguiente procedimiento: Se tomó un tubo de ensayo y se le agregó 1 ml de la muestra pretatada a analizar, posteriormente se agregó 1 ml de solución complejo y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, transcurridos los 10 minutos, se agregó 0.5 ml de reactivo de folín y se agitó por 30 segundos en vortex, se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad y finalmente transcurridos los 30 minutos se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en espectrofotómetro DR2800, recordando medir primero el blanco y por medio de una curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino se obtuvo la concentración.

Se calculó el contenido de carbohidratos y proteínas con respecto a la cantidad de SSV presente en la muestra, para obtener g CH g SSV⁻¹ (Carbohidratos) y g PT g SSV⁻¹ (Proteínas).

5.10.12. Granulometría

Se implementó un método para la medición del tamaño de partícula de los gránulos microalga-bacteria de acuerdo con el trabajo realizado por Alves et al, (2018), empleando el software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versión 1.52). Se colocaron gránulos seleccionados en cajas de Petri de vidrio con agua y se realizó la captura de imágenes de los gránulos a través de un escáner HP G3110. Se realizó el análisis de imagen en ImageJ utilizando las herramientas y funciones que este provee.

La imagen se ajustó a una escala de 0.5 cm con las funciones “Analyze y set scale”, con la función “Image” se desplegaron los 3 colores principales (red-blue-green), se seleccionó el color “blue” y se procesó con un “Threshold” de 4.88% el cual eliminó las sombras producidas por la caja Petri. Una vez filtrada la imagen se procedió a realizar el conteo de partículas y la estimación de área (cm²) con la herramienta “Analyze particles”. ImageJ desplegó los resultados en una tabla que se exportó en formato XML para graficar los datos en un histograma de frecuencia.

5.11. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.11.1. Fase 1: Montaje y arranque de reactores de alta tasa a la intemperie

Para la formación de agregados microalga-bacteria a la intemperie se utilizó como único inóculo lodos activados en 2 reactores de alta tasa. En cada reactor se agregaron 5 litros de inóculo y 65 litros de efluente secundario que es agua residual sintética para un volumen total de trabajo de 70 L, se operaron en lote por 27 días con el fin de promover el crecimiento del consorcio microalga-bacteria, al día 15 ya se había consumido el 100% del $N-NH_4^+$ por lo cual procedió a alimentarse con el medio sintético mencionado en el numeral 5.7. No se empleó recirculación de biomasa en esta fase por lo tanto el TRS fue igual al TRH.

En la figura 10 se observa el inóculo con presencia de microalgas y diatomeas para el día 27.

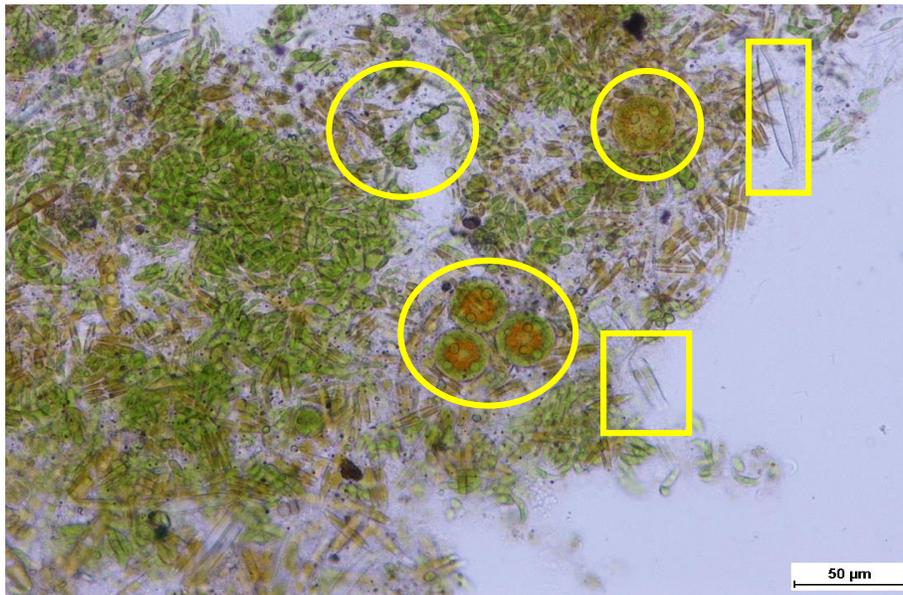


Figura 10. Inóculo de lodos activados. En círculos se observan microalgas y en rectángulos diatomeas.

Se caracterizó el agua residual y el efluente, se dio seguimiento al crecimiento del consorcio y se procuró mantener las mismas condiciones en ambos reactores para evitar cambios en las poblaciones de microalgas, cuando se detectó alguna variación en alguno de los reactores, se procedió a homogeneizarlos. A continuación, en la figura 11 se observan los reactores HRAP durante el crecimiento del consorcio microalga-bacteria.

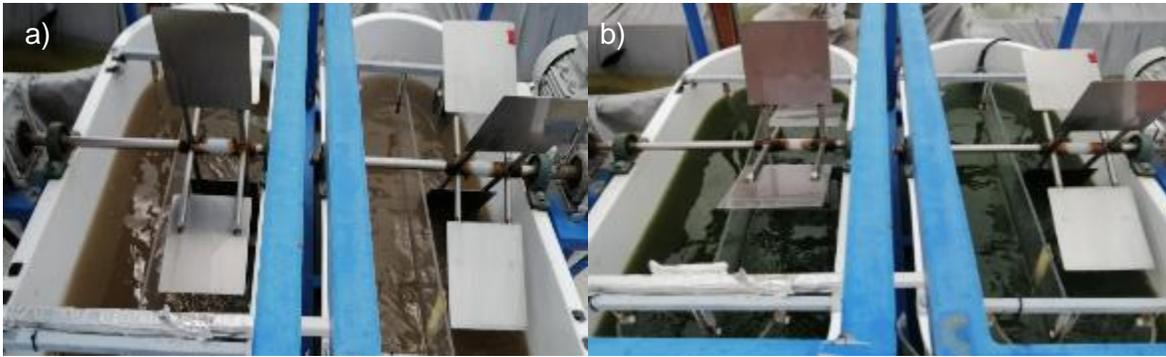


Figura 11. a). Sistema HRAP día 0 inoculado con lodo y agua residual sintética y b). Sistema HRAP día 27 con coloración verde por presencia de microalgas

Se calculó la capacidad de remoción de materia orgánica y nutrientes en la fracción soluble del efluente en el sistema, empleando la Ecuación 6.

$$\text{Remoción (\%)} = \frac{\text{Concentración}_{\text{influyente}} - \text{Concentración}_{\text{efluente}}}{\text{Concentración}_{\text{influyente}}} * 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

influyente = mg L⁻¹ DQO_s en el agua residual

efluente = mg L⁻¹ DQO_s en el agua a la salida del reactor

influyente = mg L⁻¹ N-NH₄⁺ en el agua residual

efluente = mg L⁻¹ N-NH₄⁺ en el agua a la salida del reactor

5.11.2. Fase 2: Tratamiento en modo continuo de la fracción líquida de digestato empleando agregados microalga-bacteria en reactores de alta tasa a la intemperie

Para llevarse a cabo la fase 2, se llevaron a cabo dos experimentos, el primero comprendido entre 09 de septiembre del 2021 y el 13 de diciembre del 2021, con este experimento no se observaron los resultados esperados y el sistema dejó de funcionar de forma adecuada por lo cual se procedió a recuperar la biomasa e iniciar un nuevo experimento en el año 2022 estudiando de igual forma los TRH de 14, 10 y 6 días utilizando el mismo digestato del experimento 1 centrifugado y con un factor de dilución 1:10, este experimento se llevó a cabo desde el 18 de enero del 2022 hasta el 18 de mayo del 2022.

5.11.2.1. Experimento 1:

En esta fase se empleó un digestato doméstico proveniente de un reactor anaerobio productor de biogás a partir de lodos de purga de una planta de tratamiento de aguas residuales, se realizó caracterización del mismo en cuanto a SST, SSV, DQO_s, N-NH₄⁺, NT y P-PO₄³⁻. Se ocupó un factor de dilución 1:10 con agua residual

sintética en un bidón de 50 L, esto con el fin de disminuir la alta concentración de $N-NH_4^+$ y DQO_s presente en el digestato.

El objetivo fue operar el sistema con 3 tiempos de retención hidráulica de 14, 10 y 6 días, cada uno con 3 ciclos con el fin de variar la concentración de la carga de del $N-NH_4^+$ y de la DQO_s , además del color y la turbiedad de tal forma que no interfiera con el crecimiento de las microalgas.

El día 28 se cambiaron las condiciones de operación de los reactores operándose con el digestato diluido 1:10 mencionado anteriormente y TRH de 14 días, sin embargo, al finalizar el primer ciclo se observó que se estaba generando oscurecimiento del sistema y taponamiento de las mangueras debido a la alta concentración de sólidos presentes en el digestato por lo cual el día 41 de operación procedió a centrifugarse a 3500 RPM por 20 minutos y trabajar los siguientes días con el sobrenadante diluido 1:10 esto con el fin de disminuir la concentración de sólidos presente. Al día 67 de operación el sistema colapso, los agregados se disgregaron, el sistema no estaba sedimentando y la biomasa estaba pasando a los sedimentadores, por lo cual se procedió a realizar una dilución de 1:30 del digestato de tal forma que se disminuyera la carga orgánica presente y se lograra recuperar el sistema.

Este experimento finalizó el 13 de diciembre con biomasa recuperada.

A continuación, se presenta una tabla con los tiempos de operación de los reactores y las correspondientes fases llevadas a cabo.

Tabla 3. Etapas del experimento 1

Etapa	Tiempo de operación (d)	Influente	Operación
Fase 1: Formación de agregados	0 – 27	Lodos activados y medio sintético	Lote
Fase 2: TRH de 14 días	28 – 40	Digestato 1:10	Continuo
	41 – 67	Digestato centrifugado 1:10	Continuo
Recuperación del sistema	68 – 95	Digestato centrifugado 1:30 con ajuste de $N-NH_4^+$	Continuo

5.11.2.2. Experimento 2:

Del primer experimento logró recuperarse parte de la biomasa que procedió a utilizarse en este segundo experimento, inicialmente se operaron los reactores por lotes por 27 días alimentándose con medio sintético (Huang et al., 2015) con el fin de aumentar la concentración de biomasa, el tamaño de agregados y la velocidad

de sedimentación de tal forma que permitiera el adecuado funcionamiento del sistema para tratar el digestato con los TRH propuestos a estudiar.

El día 28 se cambiaron las condiciones de operación de los reactores operándose ahora con el digestato centrifugado y diluido 1:10 con el TRH de 14 días. El día 73 se cambió el TRH a 10 días y el día 103 de operación se cambió el TRH a 6 días con el mismo influente.

A continuación, se presenta una tabla con los tiempos de operación de los reactores y las correspondientes fases llevadas a cabo.

Tabla 4. Etapas del experimento 2

Etapas	Tiempo de operación (d)	Influente	Operación
Fase 1: Formación de agregados	0 – 27	Medio sintético	Lote
Fase 2: TRH de 14 días	28 – 72	Digestato centrifugado 1:10	Continuo
Fase 2: TRH de 10 días	73 – 102	Digestato centrifugado 1:10	Continuo
Fase 3: TRH de 6 días	103 – 120	Digestato centrifugado 1:10	Continuo

Se calculó el porcentaje de remoción de DQO_s y N-NH₄⁺, se determinaron los parámetros de sedimentabilidad y la cantidad de SST y SSV. Se registraron los parámetros de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Se observaron los agregados de ambos reactores.

Al finalizar los experimentos se recopilaron los datos de irradiancia correspondientes al periodo respectivo de realización de los mismos, para conocer los niveles de radiación fotosintéticamente activa (RFA) que se presentaron durante la realización de los experimentos a la intemperie.

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para un solo factor para analizar el efecto del TRH sobre la eficiencia de remoción (%DQO, %N-NH₄⁺ y %P-PO₄³⁻) al finalizar los experimentos y si existen diferencias significativas al variar las cargas orgánicas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. EXPERIMENTO 1

6.1.1. Fase 1

6.1.1.1. Crecimiento del consorcio microalga-bacteria y formación de agregados

Para la formación de agregados microalga-bacteria a la intemperie se inoculó cada reactor con 5 L de lodos activados y 65 L de efluente secundario sintético y se operó por lote por 27 días. En la tabla 5 se presenta la caracterización del agua residual junto al inóculo de lodo para el crecimiento del consorcio microalga-bacteria en ambos reactores.

Tabla 5. Caracterización fisicoquímica del agua residual primaria con el inóculo de lodo

Parámetro	Concentración promedio (mg L ⁻¹)
SST	372.3 ± 3
SSV	305 ± 5
DQO _s	55.8 ± 0.6
N-NH ₄ ⁺	14.9 ± 0.2
N-NO ₃ ⁻	0
N-NO ₂ ⁻	0
P-PO ₄ ³⁻	43.8 ± 0.3

Transcurridos los 27 días de operación, se realizó observación en microscopio y estereoscopio, se observó la presencia de agregados y tres géneros de microalgas y un género de diatomeas. En la Figura 12 se presentan los agregados observados en estereoscopio al día 27 de operación y en la figura 13 y 14 se pueden observar los géneros identificados y la etapa de detección.

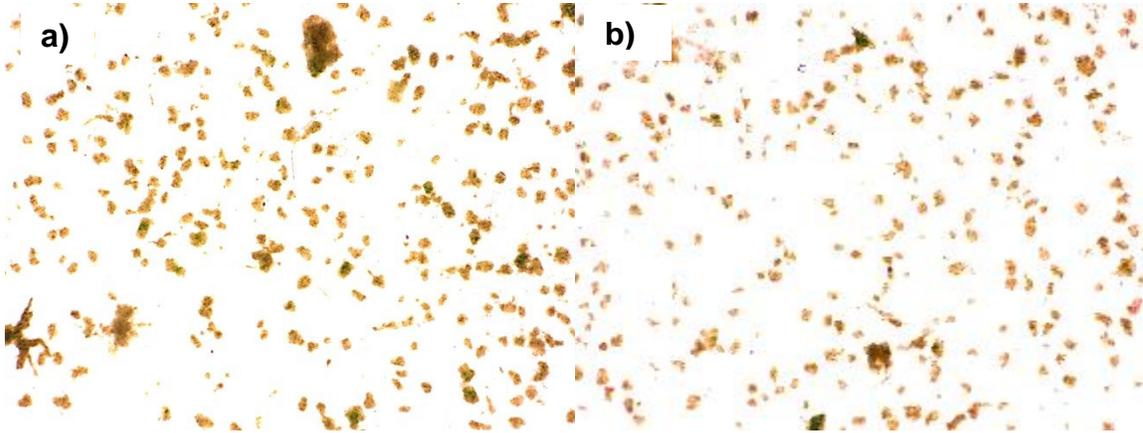


Figura 12. Observación en estereoscopio de agregados al día 27 de operación. a). Reactor 1 y b). Reactor 2.

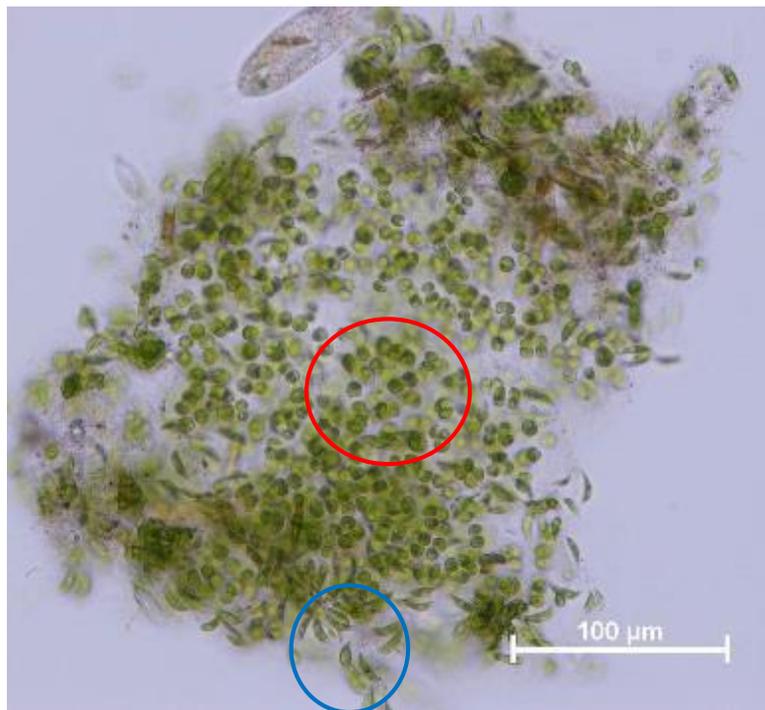


Figura 13. Formación de consorcio microalga-bacteria en lote día 25. Se indican en círculos los diferentes géneros identificados: rojo – *Chlorella*, azul - *Scenedesmus*

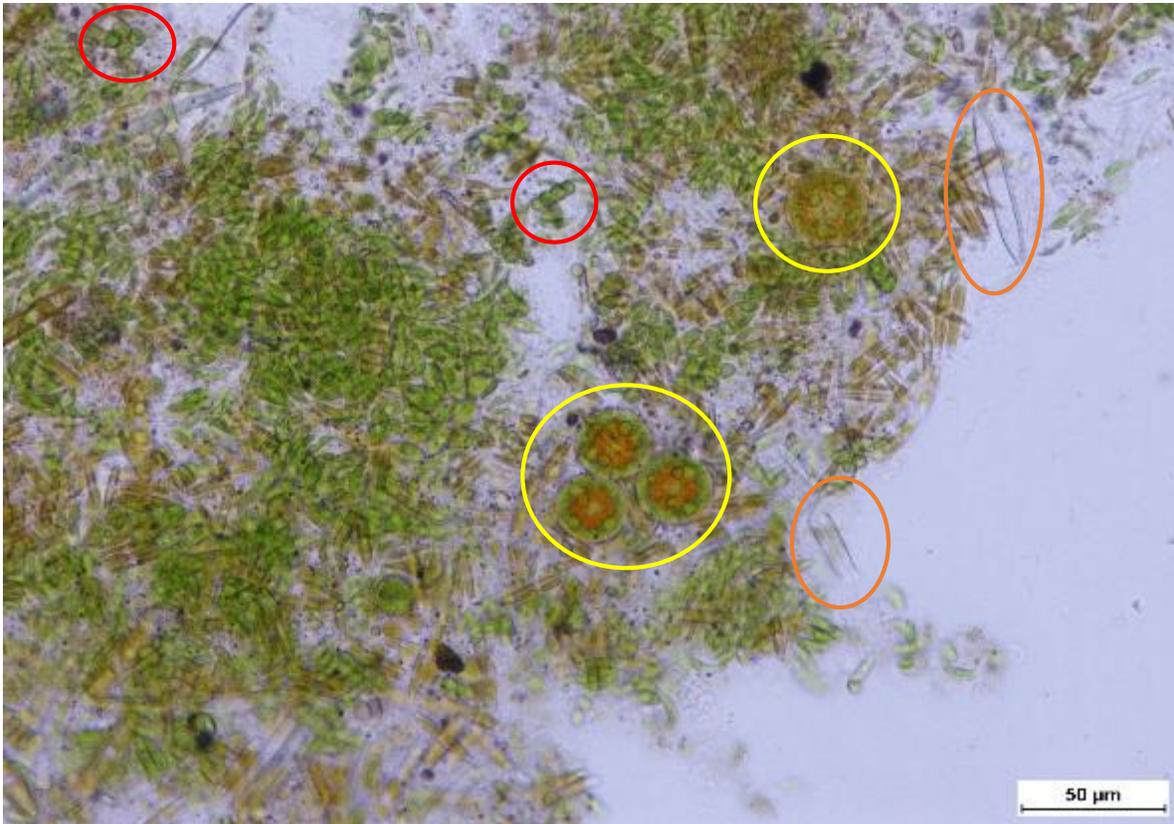


Figura 14. Formación de consorcio microalga-bacteria en lote día 27. Se indican en círculos los diferentes géneros identificados: rojo – *Chlorella*, amarillo – *Haematococcus*, naranja – *Navicula*

Se observó el crecimiento de otros microorganismos como rotíferos, protozoos y nematodos (figura 15), para eliminarse debía acidificarse el medio, modificando el pH a 2 tal como reportó Díaz-Zamorano (2020) en su trabajo de tesis, sin embargo, indicó también que al realizar esto se generaba disgregación de la biomasa por lo cual se optó en este trabajo por no modificarse el pH y no modificar la microfauna.

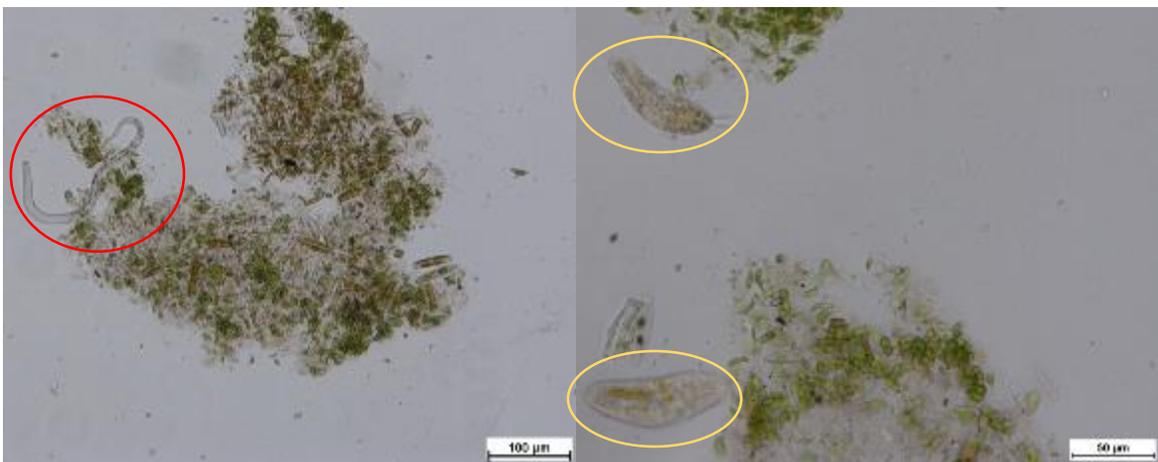


Figura 15. En la izquierda un nematodo y a la derecha protozoos

Finalizando esta fase se estableció un 77% de sedimentabilidad, valor menor al reportado por Díaz-Zamorano (2020) cuyo resultado fue de 94% y al reportado por Arcila y Buitrón (2016 y 2017) cuyo valor estuvo entre 88 y 92%. Este valor fue más bajo debido a que para el día 27 no se encontraron especies de microalgas filamentosas, no habían agregados tipo granulo, los cuales son los que mejoran de forma significativa la sedimentabilidad en este tipo de sistemas microalga-bacteria.

Se monitoreó la velocidad de sedimentación durante esta fase como puede observarse en la figura 16, encontrando que no hubo caída de la misma y al día 27 de operación se obtuvo una velocidad de 1.36 m h^{-1} , por tal motivo se consideró adecuado continuar con la fase 2 del experimento.

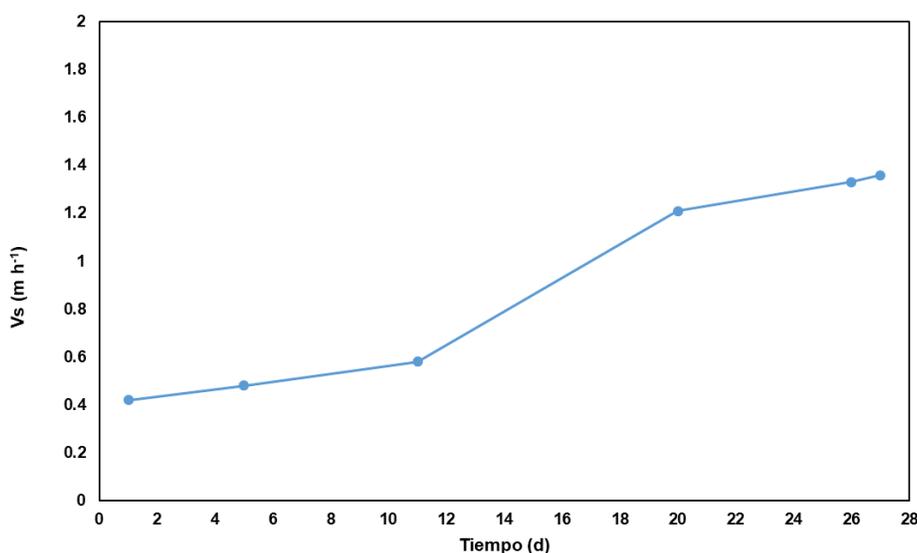


Figura 16. Velocidad de sedimentación durante la fase 1

6.1.1.2. Remoción de materia orgánica y nutrientes

Durante la fase de formación de agregados en lote se evaluó también la capacidad de remoción de nutrientes y materia orgánica del sistema, obteniendo los siguientes porcentajes de remoción: 98% N-NH₄⁺, 17% P-PO₄³⁻ y 57% DQO_s.

En cuanto a los SST y SSV se observó que no hubo remoción de estos, pero si acumulación de SST y producción de biomasa en forma de SSV, donde los SST aumentaron en un 32% y los SSV en un 26%.

En la tabla 6 se observa la comparación del influente y efluente durante la etapa de formación de agregados microalga-bacteria.

Tabla 6. Características del influente y efluente

Parámetro	Influente (mg L ⁻¹)	Efluente (mg L ⁻¹)
SST	372.3 ± 3	503 ± 42.4
SSV	305 ± 5	400 ± 56
DQO _s	55.7 ± 0.6	24 ± 4.2
N-NH ₄ ⁺	14.9 ± 0.2	0.03 ± 0.01
P-PO ₄ ³⁻	43.8 ± 0.3	36.9 ± 3.9

6.1.1.3. pH, temperatura y oxígeno disuelto

A continuación, los datos obtenidos del sistema de los parámetros de pH, temperatura y oxígeno disuelto durante la fase 1 de este experimento. Las mediciones se hicieron únicamente dos veces en el día, la primera a las 9:00 a.m. y la segunda a las 2:00 p.m. y posteriormente estas se promediaron, no se realizó medición en línea por lo cual se desconoce los valores que pudieron alcanzar estos parámetros durante la noche.

En esta fase como se observa en la figura 17, para ambos, el pH se mantuvo en un rango de 7 a 10, no se modificó puesto que se podría generar desagregación de la biomasa como reportó Díaz-Zamorano (2020) y aunque el pH óptimo para el crecimiento de las microalgas oscila entre 7 y 8 (Abalde Alonso et al., 1995), se ha demostrado que bajo un valor mayor a 8 las microalgas tienen la suficiente capacidad de desarrollarse y generar agregados (Arcila et al., 2021).

Los niveles altos de pH (pH mayor 9) sugieren una fijación total del CO₂ a través de la actividad fotosintética. Se ha demostrado que las condiciones de alcalinidad promueven la actividad fotosintética de *Chlorella* (Ihnken et al., 2014), se atribuye este comportamiento a la capacidad de *Chlorella* para regular los mecanismos de concentración de CO₂, esto lleva a adquirir CO₂ y HCO₃⁻. Por otra parte, la variación del pH se ha asociado con las fuentes de carbono utilizadas para la síntesis de células de microalgas.

Kim et al. (2013) reportó que el aumento de pH se debe al predominio de mecanismos autótrofos, mientras que un pH neutro se asocia a mecanismos mixotróficos. Se sugiere que, en esta primera fase, se promovió el consumo de carbono autótrofo y por ende se generó el aumento de pH. El aumento de pH tuvo consigo efectos en el comportamiento del nitrógeno. A valores de pH superiores a 8, se genera pérdidas por volatilización de nitrógeno en forma de amoníaco (Åkerström et al., 2014) y como se observa en la gráfica 16, el pH en esta primera fase desde el día 8 al 26 se mantuvo por encima de 8.

La temperatura en este tipo de sistemas influye en cuanto a la solubilidad de los gases tales como O₂ y CO₂. Se observó que el promedio de temperatura fue de 16.5 ± 0.9 °C para ambos reactores en esta fase de formación de agregados.

Teniendo en cuenta que los cambios de la temperatura afectan la solubilidad del O₂, en la figura 18 se observa que después del día 16 de operación, la temperatura disminuyó y el oxígeno disuelto presente en el sistema aumentó como se observa en la figura 19. De igual forma, en esta fase de formación de agregados, el sistema se encontraba en una fase exponencial con crecimiento de bacterias y microalgas y a medida que estaban creciendo las microalgas, aumentaba la concentración de oxígeno disuelto en el medio.

La temperatura se mantuvo por debajo de 22°C, lo cual significó que estuvo dentro del rango óptimo de crecimiento de las microalgas 17-26 °C. Se destaca que, al ser un sistema a la intemperie, la temperatura del sistema dependía de la temperatura ambiente. El oxígeno disuelto se mantuvo en un rango de 2.9 a 5.9 mg O₂ L⁻¹, cumpliendo con el requisito mínimo de oxígeno para los microorganismos heterótrofos aeróbicos (O₂ mayor a 1.5 mg O₂ L⁻¹).

Se resalta que el oxígeno disuelto solo se midió en el día por lo cual no es posible saber si se sufrió de condiciones anóxicas en la noche.

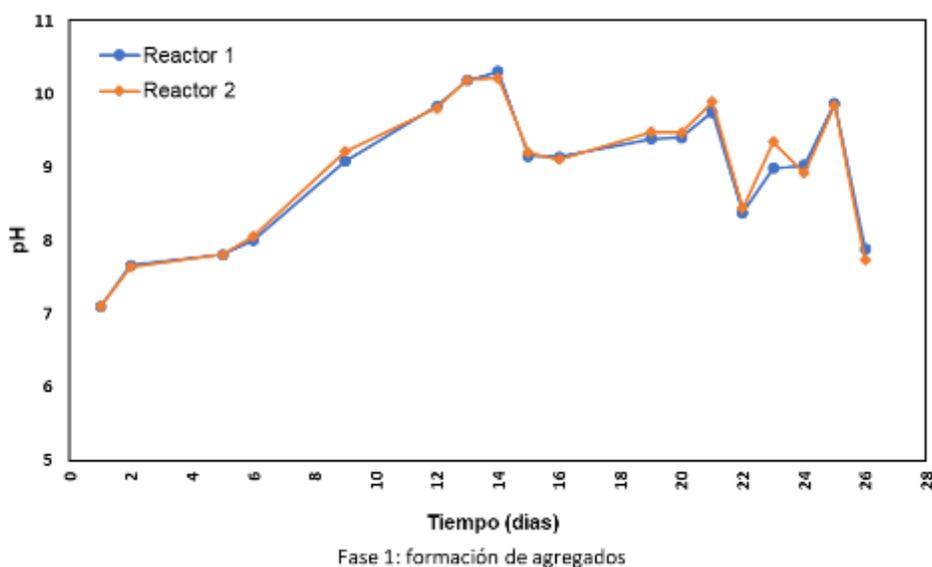


Figura 17. Seguimiento de pH en fase 1

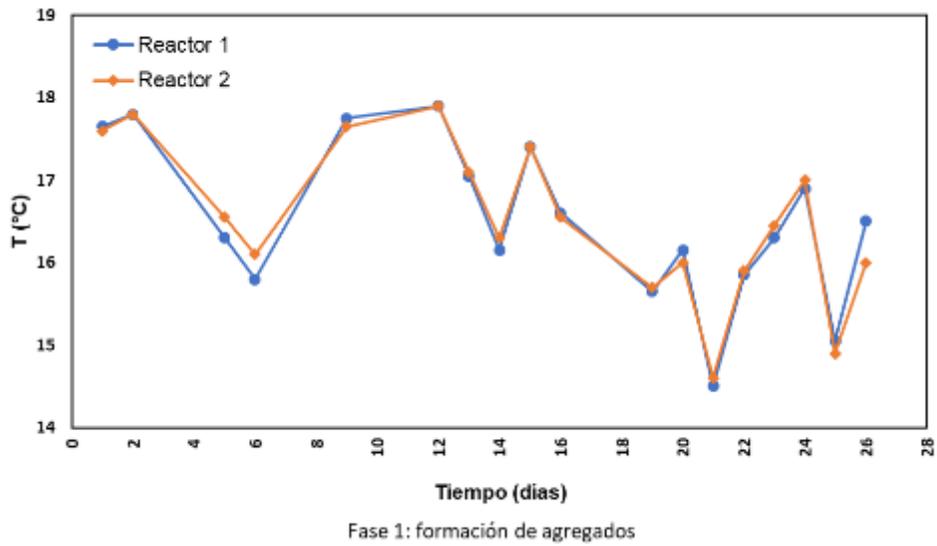


Figura 18. Seguimiento de temperatura en fase 1

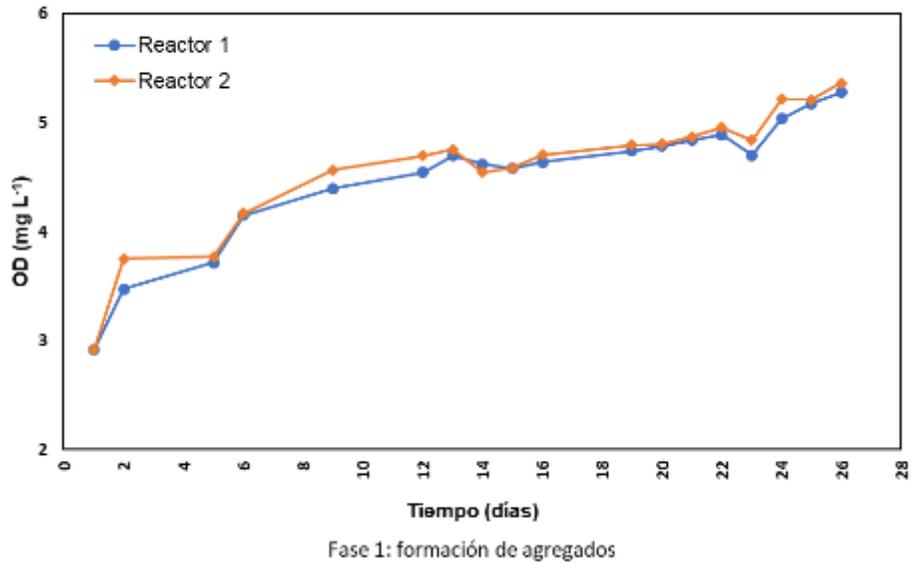


Figura 19. Seguimiento de temperatura en fase 1

6.1.2. Fase 2

6.1.2.1. Tratamiento en modo continuo de la fracción líquida de digestatos empleando los agregados microalga-bacteria formados en la fase 1 con TRH de 14 días

Para este experimento y su operación se obtuvieron las siguientes cargas orgánicas resultantes de variar el tiempo de retención hidráulica y, de la dilución realizada presentadas en la tabla 7 junto al tipo de influente para este experimento.

Tabla 7. Cargas orgánicas del experimento 1

TRH (d)	Influente	Carga orgánica (mg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
14	Digestato 1:10	572.1
	Digestato centrifugado 1:10	81.2

En esta fase se empleó un digestato doméstico, proveniente de un reactor anaerobio productor de biogás, a partir de lodos de purga de una planta de tratamiento de aguas residuales.

Este experimento constaba de tratar el digestato municipal diluido 1:10 con agua residual sintética bajo un TRH de 14 días, realizándose por 3 ciclos, obteniendo un total de 42 días de operación. La caracterización fisicoquímica del digestato se realizó el 13 de septiembre del 2021 y del digestato diluido 1:10 el 06 de octubre del 2021. Se realizó esta dilución debido a la alta concentración de DQO_s, N-NH₄⁺ y sólidos presentes que podían oscurecer el sistema, impidiendo el paso de la luz solar necesaria para el crecimiento de las microalgas.

En la tabla 8 se presenta la caracterización del mismo en cuanto a SST, SSV, DQO_s, N-NH₄⁺, NT y P-PO₄³⁻ y en la tabla 9 la caracterización en cuanto a la concentración de metales pesados.

Tabla 8. Características fisicoquímicas de la fracción líquida del digestato.

Parámetro (mg L ⁻¹)	Digestato sin diluir	Digestato diluido 1:10	Digestato centrifugado	Digestato centrifugado 1:10	Digestato centrifugado 1:30 con ajuste de nitrógeno
SST	-	603.3 ± 5.8	-	358.7 ± 3.2	100.3 ± 0.6
SSV	-	492 ± 2.6	-	325 ± 5	90 ± 1
ST (g ST L ⁻¹)	3731 ± 3.6	-	786.7 ± 11.1	-	-
SV (g ST L ⁻¹)	2031.3 ± 4.2	-	655 ± 5	-	-
DQO _s	31793.5 ± 1.3	8010.7 ± 10	25933.3 ± 115	1136.7 ± 5.8	306 ± 1
N-NH ₄ ⁺	1108.8 ± 3.2	117.1 ± 1.3	932.3 ± 0.4	95 ± 2.6	50.1 ± 0.1
NT	2200 ± 0.2	-	-	-	-
P-PO ₄ ³⁻	985 ± 1	51.2 ± 0.8	258.3 ± 2.9	25.67 ± 0.6	20 ± 1

Tabla 9. Concentración de metales de la fracción líquida del digestato.

Elemento	mg _{elemento} g ⁻¹ _{muestra}
B	0.910
Ca	0.046
Cd	156.250
Co	18.018
Cr	24.876
Cu	7.657
K	0.204
Mg	0.157
Mn	6.211
Mo	28.490
Na	0.347
Ni	4.764
Pb	11.148
Zn	0.237

El digestato sin diluir tenía una concentración de 31793.6 ± 1.3 mg DQO_s L⁻¹ y 1108.8 ± 3.2 mg N-NH₄⁺ L⁻¹. El TRH de 14 días inició el 06 de octubre de 2021. Al realizar la dilución del digestato se obtuvo una concentración de 8010.7 ± 10 mg DQO_s L⁻¹ y 117.1 ± 1.3 mg N-NH₄⁺ L⁻¹.

En el día 40 se observó taponamiento de mangueras y una coloración oscura del sistema, lo cual se debió a la alta concentración de sólidos (603.3 ± 5.8 mg SST L⁻¹ y 492 ± 2.6 mg SSV L⁻¹) presentes en el digestato. Para el día 41 iniciado el 20 de octubre de 2021, el influente fue sobrenadante de digestato centrifugado a 3500 RPM, esto se realizó por 20 minutos con un factor de dilución 1:10 obteniendo así, una concentración de 1036.7 ± 5.8 mg DQO_s L⁻¹ y 95 ± 2.6 mg N-NH₄⁺ L⁻¹, favoreciendo la penetración de la luz solar al sistema y por ende la fotosíntesis.

Al día 68 de operación se observó que el sistema no estaba funcionando de forma adecuada. La biomasa disminuyó, se desagregó y la velocidad de sedimentación bajó, por lo cual se procedió a recuperar el sistema. Se utilizó como influente el sobrenadante del digestato centrifugado con un factor de dilución 1:30, disminuyendo la concentración de DQO_s a 300 mg L⁻¹, se ajustó el N-NH₄⁺ a 50 mg L⁻¹ de tal forma que se lograra recuperar la biomasa. Se operó de esta forma hasta el día 95.

Hacia el día 82 de operación se observó amplia presencia de rotíferos los cuales se alimentan de microalgas y se procedió a disminuir el pH a 2 durante 2 horas. Luego, se aumentó el pH a 7 promoviendo así la eliminación de dichos rotíferos, se dejó sedimentar la biomasa por 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y se comprobó por medio de observación microscópica la eliminación de los mismos.

De acuerdo a lo anterior, se encontró que es necesario realizar un mayor control del experimento desde el inicio de este. En primer lugar, se debe controlar la concentración de sólidos presentes en el sistema que, ocasionan oscurecimiento del mismo, esto disminuye la cantidad de luz disponible para las microalgas y por ende la realización de la fotosíntesis necesaria para su desarrollo. Lo anterior se corrige realizando una centrifugación del digestato, donde además de disminuir la concentración de sólidos presente y color, se disminuye la concentración de materia orgánica y nitrógeno.

Es necesario tener un mayor control de la microfauna presente, puesto que al no controlar a tiempo los depredadores, el sistema puede verse invadido de los mismos y acabar con las microalgas, objeto de estudio en este sistema.

6.1.2.1.1. Estabilidad de agregados microalga-bacteria

Hacia el día 40 de operación de los reactores se observó crecimiento en la biomasa, mayor agregación de la misma y aumentó la sedimentabilidad del sistema.

Se realizó observación del cultivo en ambos reactores (Figura 20), encontrándose la presencia de *Chlorella* y *Scenedesmus*. Estas microalgas son predominantes en diferentes tipos de fuentes de aguas residuales y en la formación de agregados microalga-bacteria (Arcila y Buitrón, 2017). Se han reportado como especies con una excelente tasa de crecimiento y productividad en el tratamiento de digestato anaerobio, encontrándose porcentajes de remoción de DQO_s entre el 51 al 86% (Chuka et al., 2020).

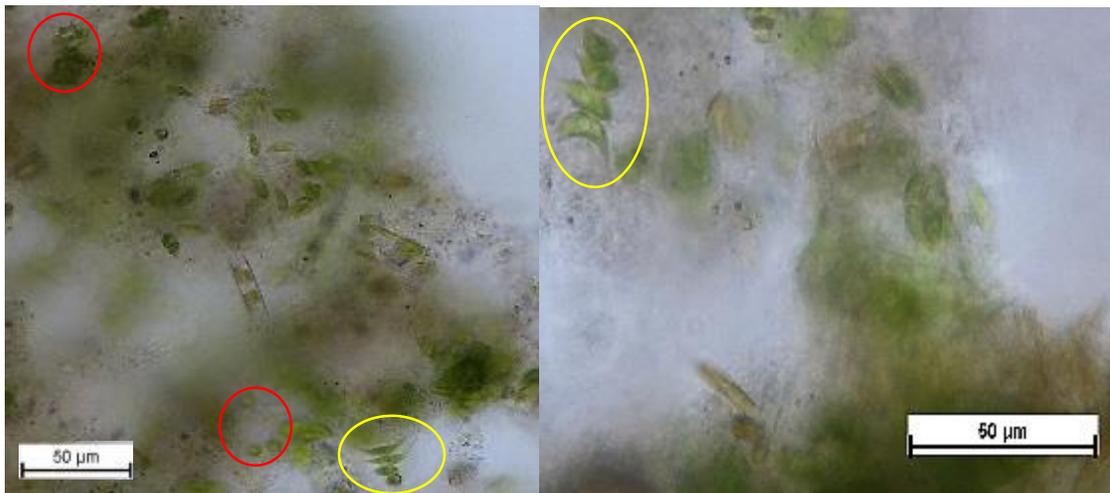


Figura 20. Observación en microscopio el día 14 del ciclo 1. Izquierda - reactor 1 y derecha - reactor 2. *Scenedesmus* (círculo amarillo) y *Chlorella* (círculo rojo).

No se observó la presencia de agregados en forma de gránulos. Sin embargo, la velocidad de sedimentación presentó variaciones. El día 41 de operación se alcanzó

una velocidad de sedimentación de 2 m h⁻¹. Durante 7 días no se monitoreó la velocidad de sedimentación del sistema por lo cual no se logró saber el momento en el cual el sistema dejó de funcionar. Se detectó en el día 48 una disminución del 82% de la velocidad de sedimentación obteniendo un valor de 0.37 m h⁻¹. En este periodo se empezó a utilizar como influente el digestato centrifugado 1:10. La caída de la velocidad pudo haberse debido a la variación en la relación de C:N, ya que, con el influente sin centrifugar la relación era de 68:1. Esto pudo haber favorecido la producción de las sustancias poliméricas extracelulares o EPS, las cuales aumentan la viscosidad del medio y permiten que las células se unan a otras superficies o entre sí, formando agregados con mejores propiedades de sedimentación. Con el digestato centrifugado la relación disminuyó a 11:1 lo que disminuyó la producción EPS, desagregando el sistema.

Se continuó monitoreando la sedimentabilidad del sistema durante la operación de los reactores. Bajo estas condiciones no se logró la mejoría de la misma. Para el día 68 se cambiaron las condiciones de operación del sistema y se utilizó como influente digestato centrifugado diluido 1:30 ajustando el N-NH₄⁺ a 50 mg L⁻¹, Así, se consiguió el aumento de la velocidad de sedimentación hasta 0.94 m h⁻¹ como se observa en la figura 21. La velocidad de sedimentación de este experimento se monitoreó hasta el día 95 de operación.

Se resalta que, el monitoreo constante de la velocidad de sedimentación es fundamental en este tipo de sistemas debido a que, si la biomasa no sedimenta, el sistema no funciona y los sólidos del efluente corresponderían a los mismos del influente, es decir, no habría remoción. Lo anterior se observó en el día 48 de operación donde la remoción de SST pasó del 84 al 64% y continuó disminuyendo hasta el día 62, logrando solamente una remoción del 10%, fue entonces cuando se procedió a recuperar el sistema. Esto se puede observar en la tabla 10.

Tabla 10. Comportamiento de SST en el influente y efluente

TRH (d)	Tiempo (d)	SST (mg L ⁻¹) Influente	SST (mg L ⁻¹) Efluente	Remoción (%)
14	41	358.7 ± 3.2	57.5 ± 10.6	84
	48		130 ± 14.1	64
	55		185 ± 7	49
	62		325 ± 56.6	10

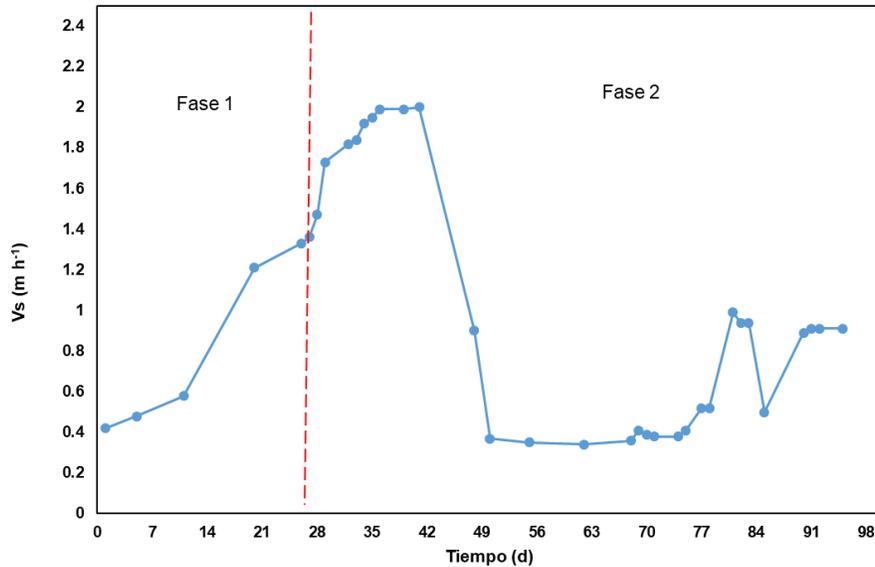


Figura 21. Comportamiento de la velocidad de sedimentación en la fase 1 y 2.

Se observó que la biomasa en forma de SSV aumentó cuando se pasó de la fase 1 a la 2 (figura 22). Esto se debió al ingreso de digestato al sistema ya que, le proporcionaba una mayor concentración de nitrógeno y fósforo que en la etapa de formación de agregados. El consumo de estos macronutrientes da como resultado un aumento en la densidad de biomasa.

Se encontró que, desde el día 41 de operación cuando se empezó a usar como influente el digestato centrifugado, un aumento de la biomasa en un 38%, alcanzándose una concentración de 595 mg SSV L⁻¹, debido a una menor concentración de sólidos suspendidos que ingresaban al sistema, lo cual favoreció la penetración de la luz y por ende una mayor realización de fotosíntesis por parte de las microalgas

Cabe mencionar que, aunque la biomasa aumentó como se mencionó anteriormente esta se desagregó para el día 42 y se mantuvo suspendida, comprobado al realizar la prueba de velocidad de sedimentación. En la figura 23 se observa la biomasa suspendida al cabo de 30 minutos, debido al cambio de influente utilizando digestato centrifugado 1:10, con una menor relación de C:N que desfavoreció la producción de EPS, las cuales promueven la agregación del sistema.

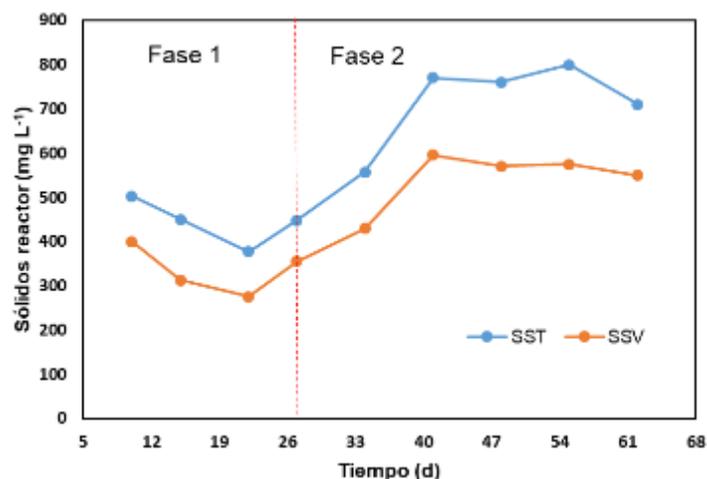


Figura 22. Comportamiento de los sólidos en los reactores con TRH de 14 días



Figura 23. Sedimentación a 61 días de operación. Izquierda reactor 1 y derecha reactor 2.

En los días 41 y 58 de operación se cribaron los dos reactores y así se eliminaron los zancudos y larvas presentes, puesto que las algas representan una fuente importante de alimento para las larvas del mosquito y proporcionan refugios contra los depredadores acuáticos (Bond et al., 2005). Se observó proliferación de protozoos y rotíferos (figura 24) esto debido a que, como no fueron eliminados en la primera fase, su proliferación generó una mayor depredación de microalgas y contribuyó a la desagregación del sistema, aumentando los sólidos suspendidos totales y volátiles en los sedimentadores.

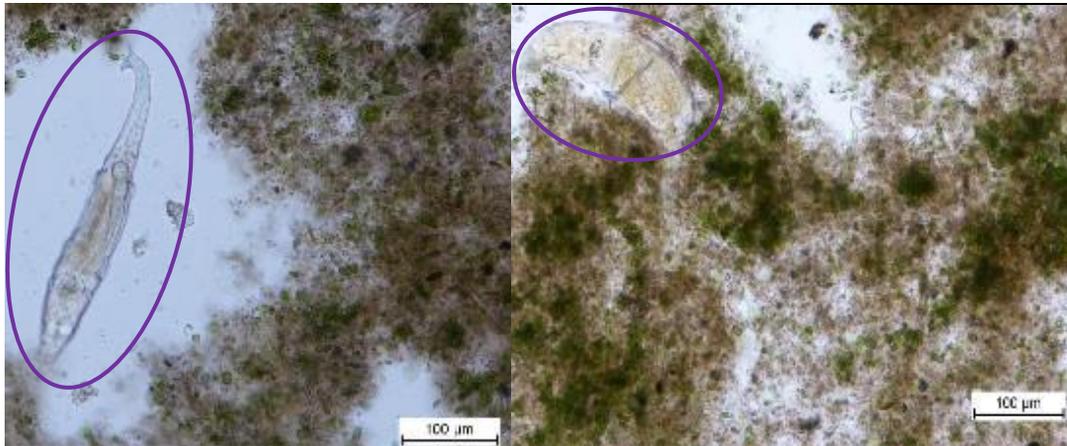


Figura 24. Rotíferos el día 48 de operación. Izquierda - reactor 1 y derecha - reactor 2.

Para el día 69 de operación se intentó recuperar la biomasa utilizando como influente digestato diluido 1:30, esta vez con menor concentración de materia orgánica en forma de DQO_s con 306 mg L⁻¹ y ajustando el N-NH₄⁺ a 50 mg L⁻¹.

Se observó nuevamente agregación de la biomasa como se muestra en la figura 25. Se observó la presencia de 3 géneros de microalgas tales como *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Tetrademus*, un género de diatomeas *Navicula* y microalgas filamentosas como se puede ver en la figura 26. No se observó la formación de gránulos, posiblemente por la alta concentración de rotíferos presentes como se observa en la figura 27. Se eliminaron los rotíferos realizando un choque de pH, bajándolo hasta 2 y manteniéndolo así durante 2 horas, luego de esto, se subió el pH a 7 y se realizó observación microscópica con el fin de comprobar la eliminación de los rotíferos como se muestra en la figura 28.

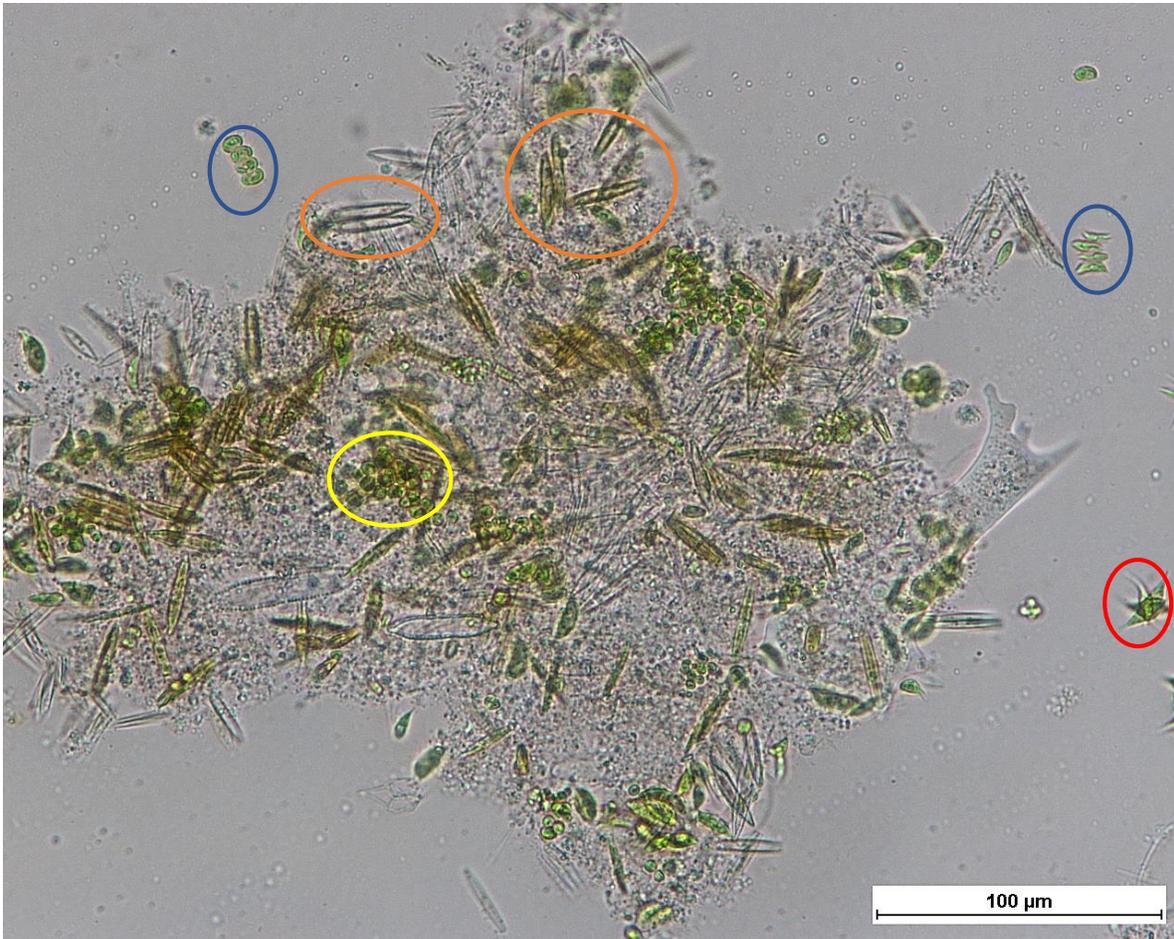


Figura 25. Agregado en el día 77 en el reactor 1. *Scenedesmus* (círculo azul), *Chlorella* (círculo amarillo), *Tetradasmus* (círculo rojo), *Navicula* (círculo naranja).

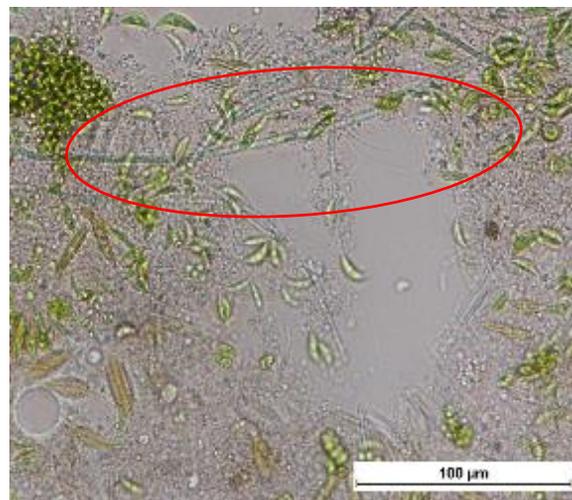


Figura 26. Microalgas filamentosas (círculo rojo) en el día 83 de operación.

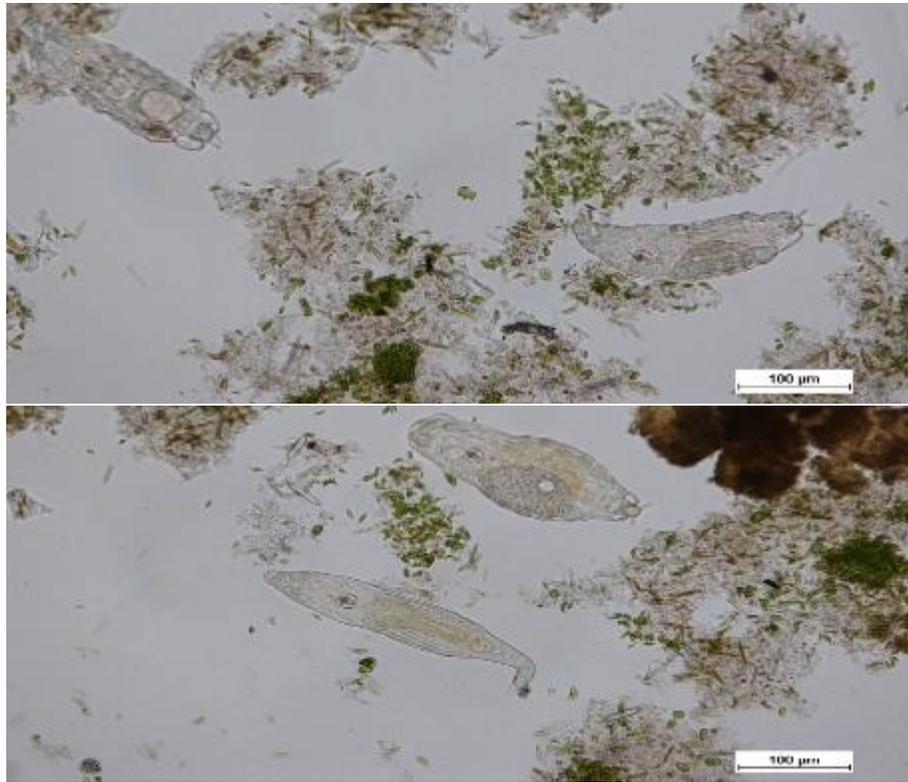


Figura 27. Rotíferos en el día 84 del cuarto ciclo con TRH de 14 días.

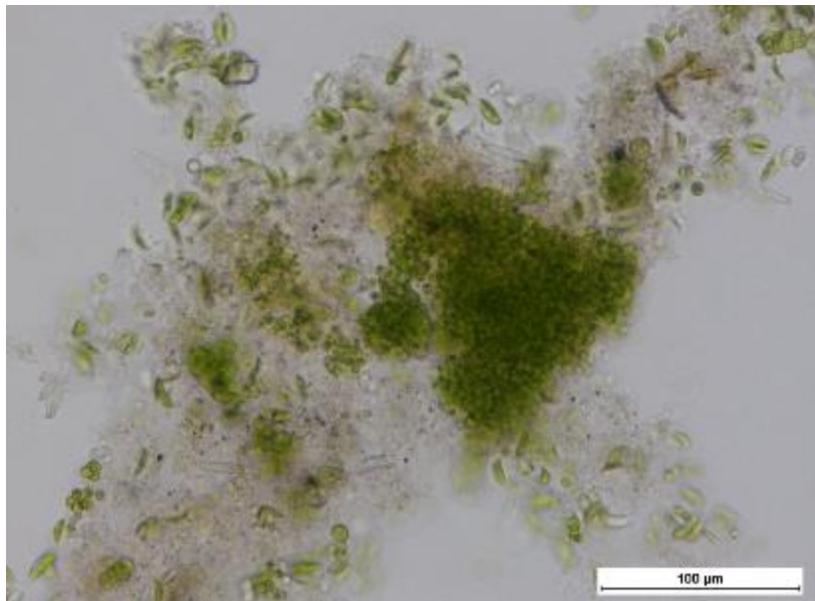


Figura 28. Observación de nuevos agregados en microscopio en el día 95 de operación sin presencia de rotíferos.

6.1.2.1.2. Comportamiento de pH, temperatura y oxígeno

Durante la fase 2, es decir del día 28 al día 95 de operación registraron los parámetros de pH, temperatura y oxígeno disuelto de forma puntual entre las 9:00-10 a.m. y entre las 2:00-3:00 p.m.

En la figura 29 se observan los niveles de pH. Los valores de pH variaron durante toda la operación en esta fase. Desde el día 28 al día 46 de operación cuando se tenía como influente el digestato diluido 1:10, el valor del pH en promedio fue de 7.1 ± 0.74 para ambos reactores, sin embargo, en algunos días se alcanzaron valores mayores a 8; estos valores se obtuvieron debido a la alta concentración de $N-NH_4^+$ la cual era de $117.1 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1}$. Las microalgas al asimilarlo, producen iones H^+ y su alta absorción disminuye el pH del medio.

Del día 68 al 95 de operación, el valor obtenido de pH en promedio obtenido fue de 8.6 ± 0.59 para el reactor 1 y 8.4 ± 0.53 para el reactor 2. Estos valores presentaron un aumento en comparación a los días anteriores debida al cambio de influente, ya que pasó de utilizarse un digestato con factor de dilución 1:10 y concentración de $N-NH_4^+$ de $117.1 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1}$ a un digestato con un factor de dilución 1:30 y ajuste de $N-NH_4^+$ a 50 mg L^{-1} . Asimismo, también se puede atribuir el aumento del pH a la disminución de la temperatura, puesto que como se observa en la figura 29 y en la figura 30, hacia el día 63 de operación la temperatura tuvo tendencia a disminuir y el pH a aumentar.

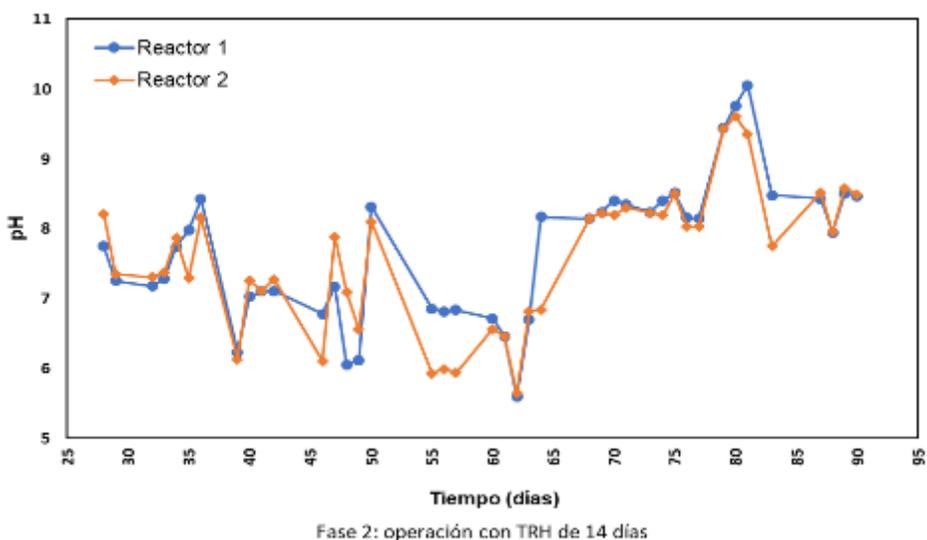


Figura 29. Registro de pH en experimento de TRH de 14 días

En la Figura 30 se presentan los valores de temperatura en ambos reactores. Se observó una temperatura máxima de $26 \text{ }^\circ\text{C}$ y una mínima de $13 \text{ }^\circ\text{C}$. Se obtuvo una temperatura promedio de 18.8°C para el reactor 1 y de 18.7°C para el reactor 2 durante los 95 días de operación, temperaturas dentro del rango de crecimiento óptimo para las microalgas.

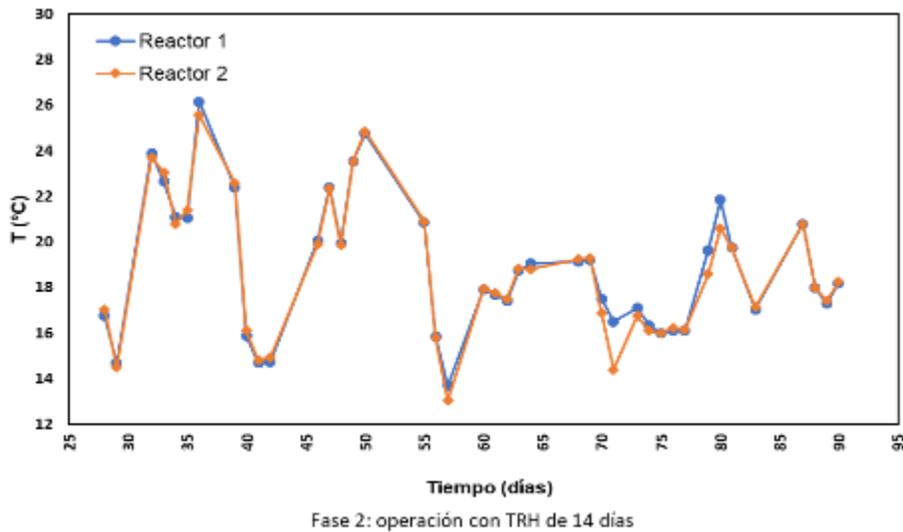


Figura 30. Registro de la temperatura en experimento de TRH de 14 días

En la Figura 31 se observa la concentración de oxígeno disuelto. El reactor 1 alcanzó a obtener la concentración de $10.3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y el reactor 2 la concentración de $9.8 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. La concentración de oxígeno disuelto más baja registrada para ambos reactores fue de $5.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, lo cual significó que ambos reactores cumplieron con el requisito mínimo de oxígeno para los microorganismos heterótrofos aeróbicos (O_2 mayor a $1.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Se atribuye el aumento del oxígeno disuelto a partir del día 60 de operación a la disminución de la temperatura también a partir del día 60 de operación, porque la solubilidad del oxígeno disuelto aumenta a medida que disminuye la temperatura. Se desconoce si hubo condición anóxica en el sistema en vista de que los reactores se monitorearon únicamente en el día.

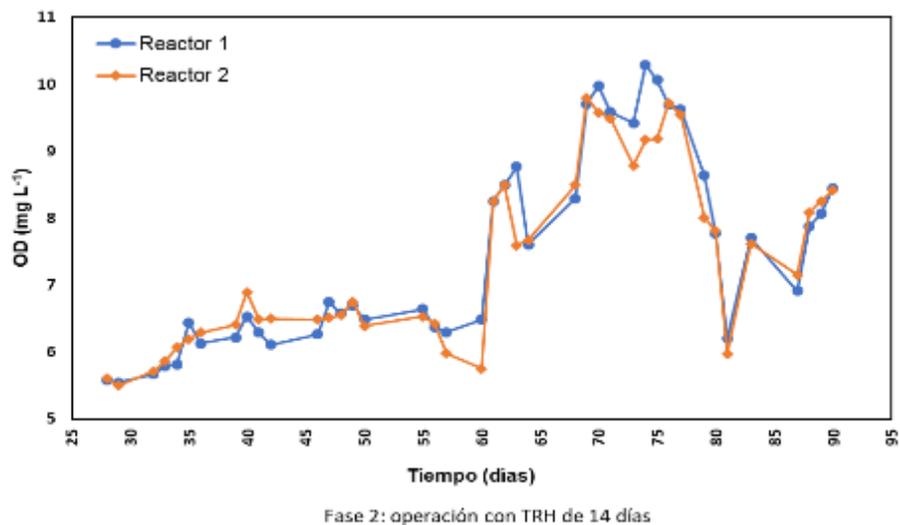


Figura 31. Registro de oxígeno disuelto en experimento de TRH de 14 días

6.1.2.1.3. Remoción de N-NH₄⁺ y DQO_s

Se calculó el porcentaje de remoción de N-NH₄⁺ y DQO_s en el efluente para el TRH de 14 días operado con los dos tipos de efluentes utilizados, digestato con un factor de dilución 1:10 y digestato centrifugado con un factor de dilución 1:10. En la figura 33 se puede observar las concentraciones del N-NH₄⁺ en el influente durante la operación de TRH de 14 días y las tasas de remoción que se obtuvieron.

Como se puede observar en la figura 32, para ambos influentes se obtuvieron remociones superiores al 80%. Al trabajar con digestato 1:10 se obtuvo una remoción del 85% y con el digestato centrifugado 1:10 una remoción del 91%. Lo anterior indica que, al disminuir la concentración de N-NH₄⁺ aumenta la remoción, debido a la menor disponibilidad de este nutriente en el medio y una mayor competitividad por parte de los microorganismos para obtenerlo. Se demostró, que no se presentó inhibición sobre el crecimiento de las microalgas al trabajar con estas concentraciones de nitrógeno.

En cuanto a la DQO_s, la mayor tasa de remoción se obtuvo con el influente digestato 1:10, con una remoción de DQO_s del 99% teniendo 8010 mg DQO_s L⁻¹ en el influente. Posteriormente, al disminuir la concentración de DQO_s a 1037 mg DQO_s L⁻¹ en el influente digestato centrifugado 1:10, el porcentaje de remoción bajó al 73% como se puede observar en la figura 33, aun así, fueron tasas de remoción mejores que las reportadas por Díaz-Zamorano; (2020) quien logró obtener remociones del 24 y 72% en digestato municipal con 500 y 138 mg DQO_s L⁻¹ respectivamente en el influente.

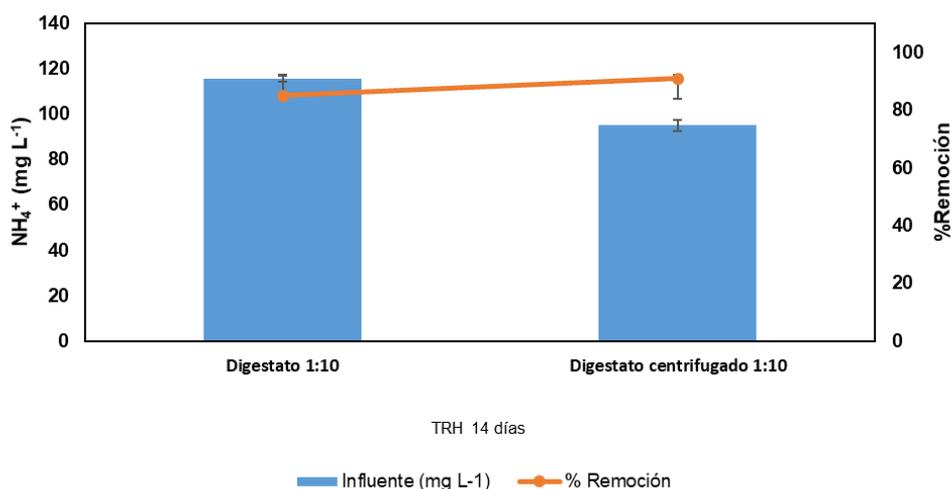


Figura 32. Remoción de N-NH₄⁺ en fase 2

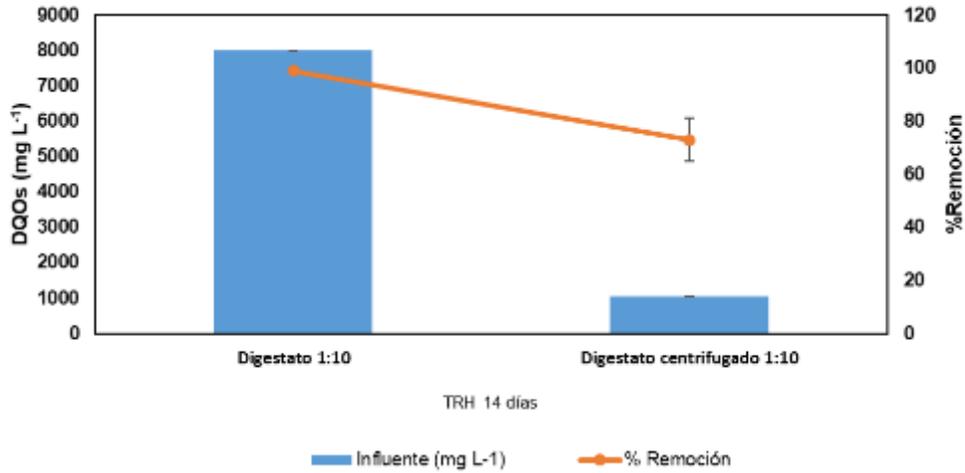


Figura 33. Remoción de DQOs en fase 2

A continuación, en la tabla 11 se presenta una revisión bibliográfica sobre la remoción de N-NH_4^+ en sistemas microalga-bacteria operados en reactores tipo raceway. En sistemas con concentraciones menores de $60 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ se obtienen las remociones más altas, mientras que a concentraciones mayores a $100 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ la tasa de remoción es más amplia pero aun así menor con valores entre 25 a 69%. En este trabajo, con concentraciones de 117.1 ± 1.3 y 95 mg L^{-1} se lograron remociones del 85 y 91% respectivamente, demostrando así que la alta concentración de N-NH_4^+ no inhibió el proceso ni las remociones del mismo.

Tabla 11. Revisión bibliográfica de remociones de N-NH_4^+ en sistemas microalga bacteria en HRAP con digestato municipal

TRH (d)	N-NH_4^+ influente (mg L^{-1})	N-NH_4^+ efluente (mg L^{-1})	%Remoción N-NH_4^+	Fuente
5	245	170	31	(Bankston et al., 2020)
5	2000	1950	2.5	(Wang et al., 2019a)
5	800 1600	595 1280	26 20	(Ayre et al., 2017)
6	50	3	94	(Díaz-Zamorano., 2020)
8	50	2	96	(Scarponi et al., 2021)
10	112	28	75	(Gu et al., 2021)
14	117.1 ± 1.3	17.5	85	Este trabajo
14	95	8.55	91	

De los resultados anteriores se tiene que es factible trabajar con efluente de digestato municipal con concentración de hasta $117 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, esto se infiere puesto que, al trabajar con dicha concentración, el sistema no presentó inhibición ni inconveniente en cuanto a la remoción de este nutriente. Lo anterior fue contrario a

lo reportado por Díaz-Zamorano (2020) en su trabajo, donde se realizó una dilución hasta obtener una concentración de N-NH_4^+ de 50 mg L^{-1} debido a que a concentraciones mayores de este valor su sistema se inhibió y se desagregó su biomasa, disminuyendo así los porcentajes de remoción de nutrientes. En razón de lo antes expuesto, para dar continuidad a este trabajo y realización del experimento 2, se continuó trabajando con digestato centrifugado con factor de dilución 1:10.

6.1.3. Perfil de radiación fotosintéticamente activa

La radiación fotosintéticamente activa (RFA) es la cantidad de radiación integrada del rango de longitudes de onda que, puede producir actividad fotosintética en las microalgas (Sun et al., 1998). Este rango comprende entre los 400 y 700 nm. La unidad de medida para la RAF es $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La proporción de RAF del total de energía solar medida es del 40% para Norteamérica. El factor de conversión utilizado para la luz natural es de 1 W m^{-2} equivale a $4.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Masojídek et al., 2013).

Los datos de radiación obtenidos durante la operación del experimento se ajustaron de acuerdo a las consideraciones mencionadas y se hizo un reajuste reduciendo el resultado un 52% que, representa la radiación que realmente llega al sistema bajo las mallas de sombreo del experimento. Se tomaron los datos de radiación de los meses de operación de este experimento, se realizó el cálculo del promedio de radiación fotosintéticamente activa de cada mes y se graficó.

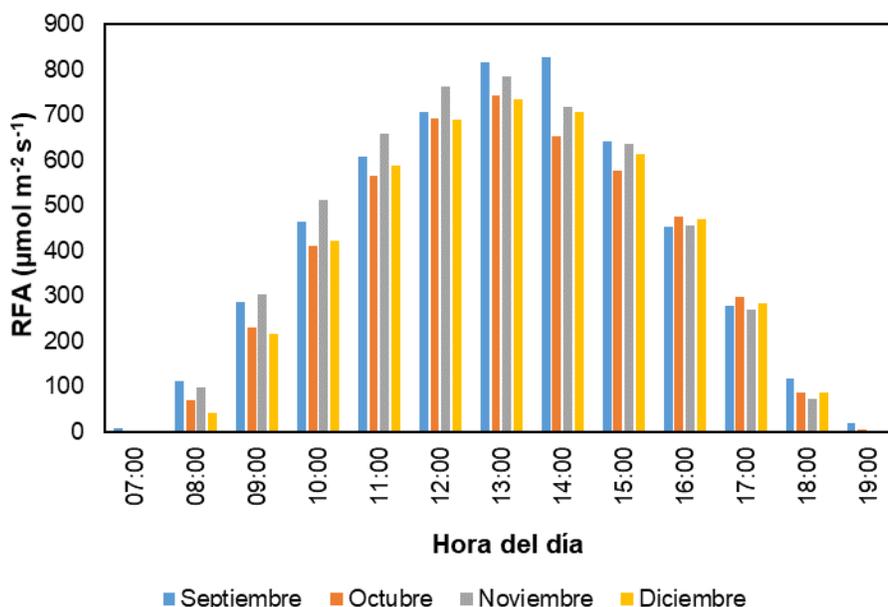


Figura 34. Valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) por día durante los meses de operación del experimento 1

En la figura 34 se presentan los valores de radiación fotosintéticamente activa por día durante el periodo de realización del experimento. En el mes de septiembre se realizó la fase 1 de formación de agregados y se obtuvo una radiación máxima de $829 \pm 156.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el mes de octubre se operó el sistema con el digestato diluido 1:10 y se obtuvo una radiación máxima de $744 \pm 174.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el mes de noviembre se operó con digestato centrifugado y diluido 1:10 y se obtuvo una radiación máxima de $785 \pm 136.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y finalmente en el mes de diciembre donde el experimento entró en etapa de recuperación de biomasa se obtuvo una radiación máxima de $736 \pm 111 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Se ha reportado que la tolerancia de radiación por parte de las microalgas típicamente ocurre en rangos de 200 a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Gordon & Polle, 2007), sin embargo, no es un límite fundamental para su desarrollo. En algunos estudios como el de Hu et al., (1998) reportaron que se puede alcanzar una tolerancia de radiación de hasta aproximadamente $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comprobándose en este experimento donde en todos los meses de operación de los reactores, las radiaciones reportadas alcanzaron valores mayores a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el sistema no presentó inhibición.

6.2. EXPERIMENTO 2

6.2.1. Fase 1

6.2.1.1. Crecimiento del consorcio microalga-bacteria y formación de agregados

Para la formación de agregados microalga-bacteria a la intemperie en este segundo experimento, no se realizó inoculación de los reactores con lodos activados y efluente secundario, se utilizó la biomasa recuperada al finalizar el experimento 1 y se operó por 27 días utilizando medio sintético (Huang et al., 2015).

El día 27 de operación, se realizó caracterización fisicoquímica del sistema dentro de los reactores para proceder a la fase 2 de operación con el digestato centrifugado diluido 1:10, como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Caracterización fisicoquímica del sistema al día 27 de operación fase 1

Parámetro	Concentración promedio (mg L ⁻¹)
SST	1095 ± 49.5
SSV	720 ± 42.4
DQO _s	84.5 ± 12
N-NH ₄ ⁺	0.03 ± 0.01
N-NO ₃ ⁻	0
N-NO ₂ ⁻	0
P-PO ₄ ³⁻	2.65 ± 0.21

Transcurridos los 27 días de operación, se realizó observación en microscopio y estereoscopio. Se observó la presencia de agregados y dos géneros de microalgas.

En la figura 35 se encuentra la observación microscópica de ambos reactores. Se muestra la presencia de géneros como *Chlorella* y *Scenedesmus*. En la figura 36 se presenta la observación en estereoscopio, observándose la presencia de agregados tipo flócs en ambos reactores.

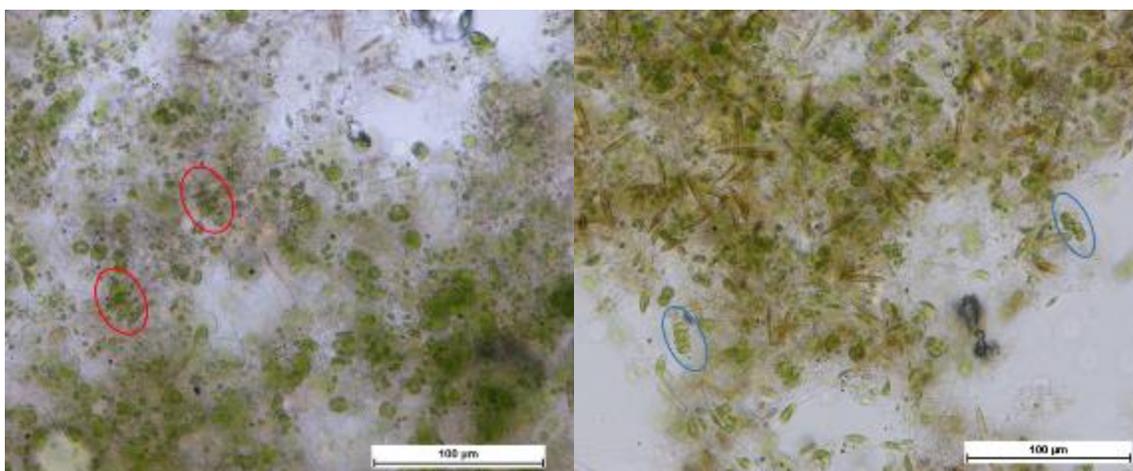


Figura 35. Seguimiento de consorcio microalga-bacteria en lote día 27. Izquierda reactor 1 y derecha reactor 2. Se indican en círculos los diferentes géneros identificados: rojo – *Scenedesmus*, azul – *Chlorella*

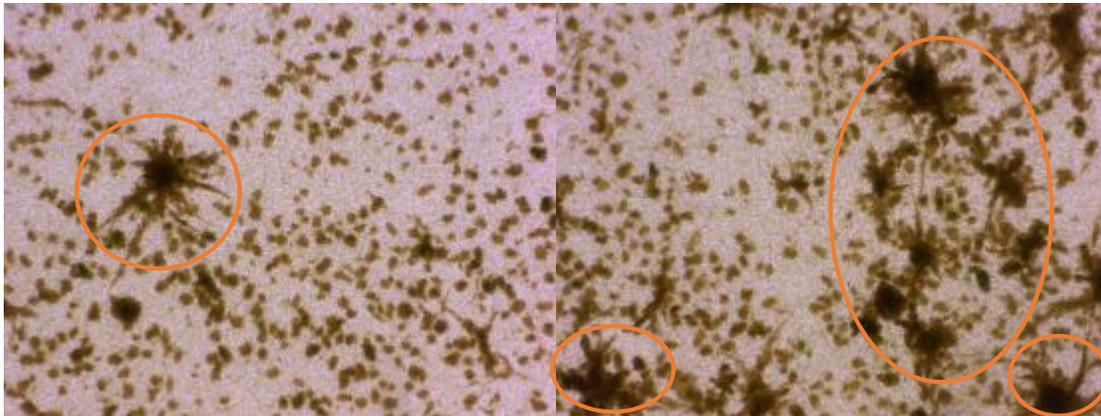


Figura 36. Observación en estereoscopio de agregados tipo flóculos al día 27 de operación. Izquierda - reactor 1 y derecha - reactor 2. Se indican en círculos naranja los agregados tipo flóculos.

Se monitoreó la velocidad de sedimentación durante esta fase como puede observarse en la figura 37. Hacia el día 10 de operación, la velocidad de sedimentación iba en ascenso con 1.5 m h^{-1} . Del día 11 al 21 de operación no fue posible asistir al laboratorio y monitorear los reactores por lo cual hubo una caída de la velocidad hasta 1.1 m h^{-1} . El día 22 de operación se continuó con el monitoreo y correcta operación de los reactores y se observó aumento de la velocidad hasta 1.76 m h^{-1} en el día 27 de operación. Por la velocidad alcanzada y por los tiempos planteados en el experimento se consideró adecuado continuar con la fase 2 del experimento.

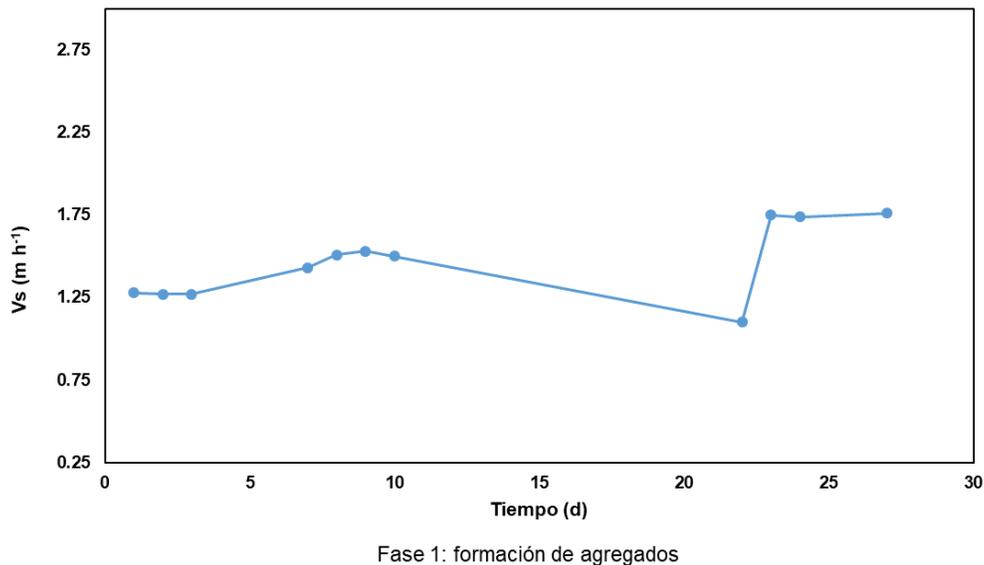


Figura 37. Monitoreo de la velocidad de sedimentación en los 27 días de operación en la fase 1 de formación de agregados.

6.2.1.2. pH, temperatura y oxígeno disuelto

A continuación, los datos obtenidos del sistema de los parámetros de pH, temperatura y oxígeno disuelto durante la fase 1 de este experimento. Las mediciones se hicieron únicamente dos veces en el día, la primera a las 9:00 a.m. y la segunda a las 2:00 p.m. y se promediaron. No se realizó medición en línea, se desconoce los valores que pudieron alcanzar estos parámetros durante la noche.

En esta fase como se observa en la figura 38, para el reactor 1 el pH se mantuvo en un rango entre 8.8 y 9.3 y para el reactor 2 en un rango entre 8.7 y 9.7. El pH no se modificó debido a que se podía presentar desagregación de la biomasa y como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que bajo un valor de pH mayor a 8 las microalgas tienen la suficiente capacidad de desarrollarse y generar agregados (Arcila et al., 2021).

Se ha encontrado que un nivel de pH mayor a 9 sugiere fijación total del CO₂ a través de la actividad fotosintética y se ha demostrado que las condiciones de alcalinidad promueven la actividad fotosintética de *Chlorella* (Ihnken et al., 2014). Este comportamiento se atribuye a la capacidad de *Chlorella* para regular los mecanismos de concentración de CO₂⁻, lo que lleva a adquirir CO₂ y HCO₃⁻. En esta fase se promovió el consumo de carbono autótrofo y por ende se generó el aumento de pH. Este aumento de pH tuvo consigo efectos en el comportamiento del nitrógeno, a valores de pH superiores a 8, se genera pérdidas por volatilización de nitrógeno en forma de amoníaco (Åkerström et al., 2014) y como se observa en la gráfica 37, el pH durante todo el tiempo de operación de esta fase se mantuvo por encima de 8.

La temperatura en este tipo de sistemas influye en cuanto a la solubilidad de los gases tales como O₂ y CO₂. Se observó que el promedio de temperatura fue de 16.1 ± 1 °C para el reactor 1 y 16 ± 1 para el reactor 2 °C en esta fase de formación de agregados.

La temperatura se mantuvo por debajo de 22°C, lo cual significó que estuvo dentro del rango óptimo de crecimiento de las microalgas 17-26 °C, cabe aclarar que, al ser un sistema a la intemperie, la temperatura del sistema dependía de la temperatura ambiente y el oxígeno disuelto se mantuvo en un rango de 8 a 10 mg O₂ L⁻¹ para el reactor 1 y de 7.8 a 9.3 en el reactor 2, cumpliendo así con el requisito mínimo de oxígeno para los microorganismos heterótrofos aeróbicos (O₂ mayor a 1.5 mg O₂ L⁻¹).

Teniendo en cuenta que los cambios de la temperatura afectan la solubilidad del O₂, en la figura 39 se puede observar que, después del día 21 de operación la temperatura disminuyó y por ende el oxígeno disuelto presente en el sistema aumentó como se observa en la figura 40. Cabe resaltar que en esta fase el oxígeno

disuelto solo se midió en el día, por lo cual se desconoce si se sufrió de condiciones anóxicas durante la noche.

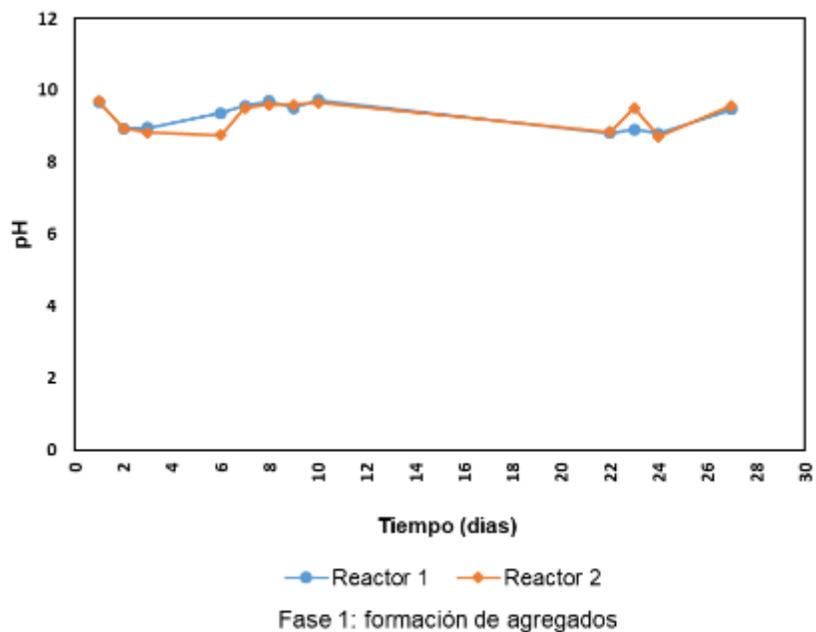


Figura 38. Monitoreo de pH en fase 1 de experimento 2.

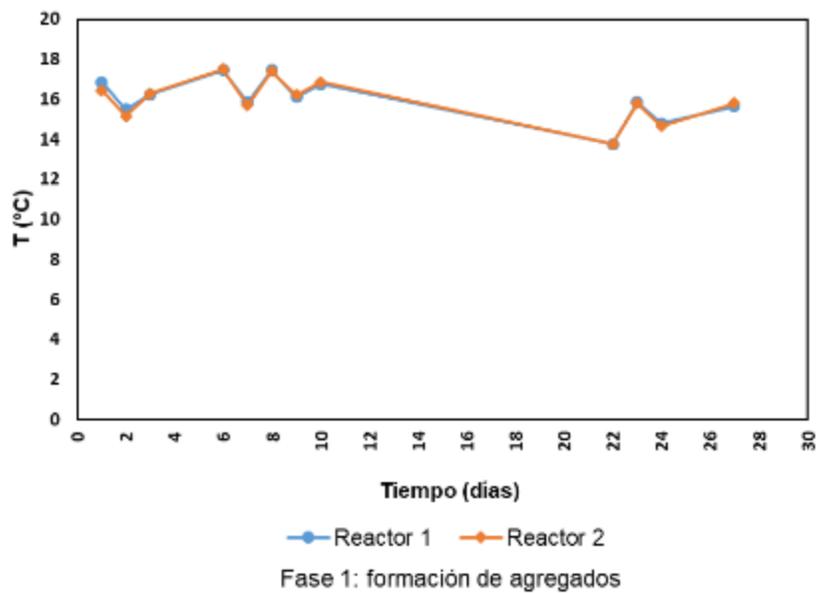


Figura 39. Monitoreo de temperatura en fase 1 de experimento 2.

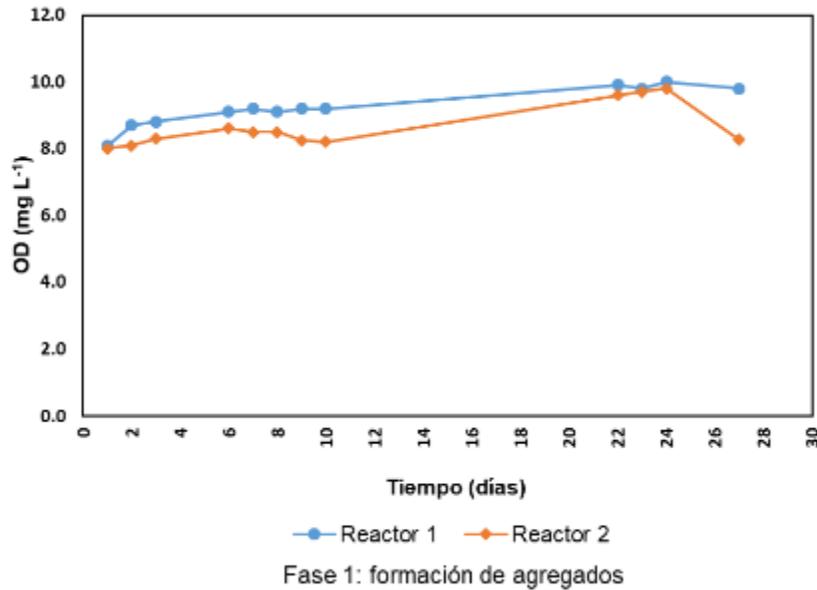


Figura 40. Monitoreo de oxígeno disuelto en fase 1 de experimento 2.

6.2.2. Fase 2

6.2.2.1. Tratamiento en modo continuo de la fracción líquida de digestatos empleando los agregados microalga-bacteria formados en la fase 1 con TRH de 14, 10 y 6 días

La segunda fase de este experimento constó en tratar digestato municipal centrifugado con un factor de dilución 1:10, diluyendo con agua residual sintética (Huang et al., 2015), bajo tres TRH de 14, 10 y 6 días, con 3 ciclos cada uno, para un total de 93 días de operación comprendidos del día 28 al día 120 del experimento. Se utilizaron los agregados microalga-bacteria formados en la fase 1 de este experimento. El digestato fue el mismo del experimento 1 y su caracterización al centrifugarse y diluirse 1:10 se presenta en la tabla 13. Se obtuvieron las cargas orgánicas presentadas en la tabla 14, resultantes de la variación del tiempo de retención hidráulica con su respectivo influente para cada tiempo.

Tabla 13. Caracterización de digestato a tratar en el experimento 2

Parámetro (mg L ⁻¹)	Digestato centrifugado 1:10
SST	473 ± 7.1
SSV	381 ± 3.5
DQO _s	959.3 ± 0.8
N-NH ₄ ⁺	117.6 ± 1.3
N-NO ₃ ⁻	8.9 ± 0.1
N-NO ₂ ⁻	71.4 ± 1.1
P-PO ₄ ³⁻	51.2 ± 0.8

Tabla 14. Cargas orgánicas del experimento 2

TRH (d)	Influente	Carga orgánica (mg DQO m ⁻³ d ⁻¹)
14	Digestato centrifugado 1:10	68.4
10	Digestato centrifugado 1:10	95.7
6	Digestato centrifugado 1:10	159.5

6.2.2.1.1. Estabilidad de agregados microalga-bacteria

Durante los tres tiempos de retención hidráulica estudiados se realizó el monitoreo de la velocidad de sedimentación, con el fin de verificar el correcto funcionamiento del sistema, asimismo, se monitorearon los agregados mediante observación en microscopio y estereoscopio y se midió el diámetro de partícula para cada tiempo.

A continuación, en la figura 41, se presenta el monitoreo de la velocidad de sedimentación del experimento 2. En la fase 1 de formación de agregados se obtuvo una velocidad de sedimentación promedio de 1.46 ± 0.22 m h⁻¹. El día 28 empezó el tratamiento en modo continuo del digestato y del día 28 al 72 se estudió el TRH de 14 días, como se observa en la gráfica la velocidad aumentó, obteniéndose un valor de 1.78 ± 0.07 m h⁻¹, seguido a esto, del día 73 al 101 se operó con el TRH de 10 días y se observa aumento en la velocidad, hasta un valor de 2.37 ± 0.03 m h⁻¹ y finalmente, se observa una caída de la velocidad hasta obtener un valor de 2.21 ± 0.2 m h⁻¹ correspondiente al TRH de 6 días, operado del día 102 al 120.

El comportamiento de la velocidad de sedimentación se debió a la agregación de las partículas. Al generarse una mayor fuerza de agregación, mayor será el tamaño de los agregados y, por ende, su peso será mayor y a lo que tenderán a sedimentarse, esto se puede comprobar a través de la medición del diámetro de partícula.

En la tabla 15 se presenta el porcentaje de diámetro de partícula para cada fase del experimento. Se puede observar para la fase de formación de agregados, que el mayor porcentaje de diámetro de partícula fue para el diámetro menor o igual a 0.1 cm y en esta fase se registró la menor velocidad de sedimentación. Para la fase 2 con el TRH de 14 días, el porcentaje de diámetro de tamaño menor o igual a 1 disminuye y aumenta los diámetros mayores a 1, asimismo se registró aumento en la velocidad de sedimentación. Para el TRH de 10 días, se registra nuevamente disminución en el porcentaje de diámetro de partícula menor a 0.1 cm y se observa un mayor aumento de las partículas con diámetro entre 0.2 y 0.3 cm, lo cual, se reflejó en la velocidad de sedimentación, registrándose un aumento de la misma. Finalmente, para el TRH de 6 días el diámetro de partícula disminuyó, siendo en su mayoría partículas de tamaño entre 0.1 y 0.2 cm, reflejándose así en la velocidad de sedimentación, puesto que esta pasó de 2.37 a 2.21 m h⁻¹.

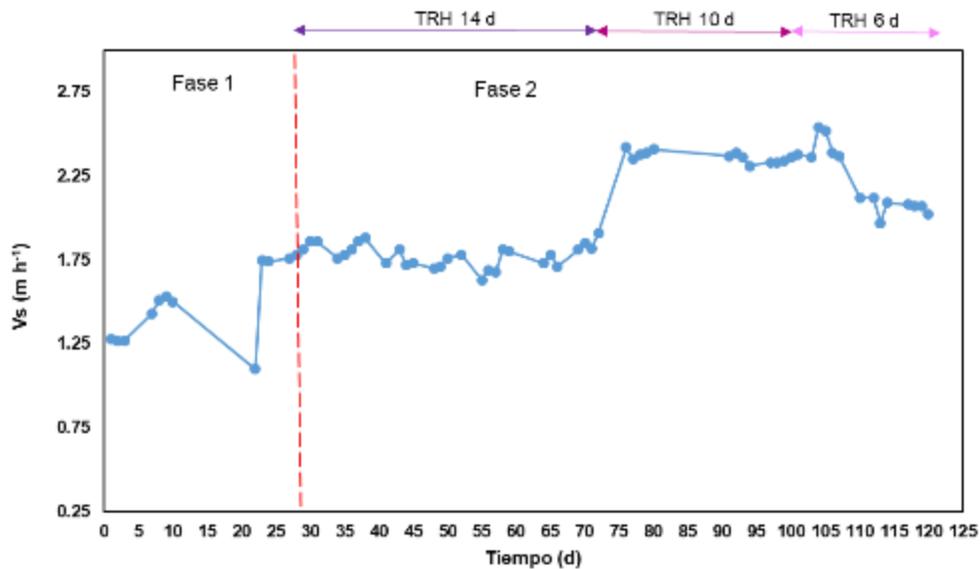


Figura 41. Monitoreo de velocidad de sedimentación durante el experimento 2.

Tabla 15. Porcentaje de diámetro de partícula en experimento 2

Fase	% Diámetro de partícula			
	≤ 0.1 cm	0.1 - 0.2 cm	0.2 - 0.3 cm	> 0.3 cm
Formación agregados	67	24	6	3
TRH 14 d	61	27	7	4
TRH 10 d	24	32	38	6
TRH 6 d	20	40	36	5

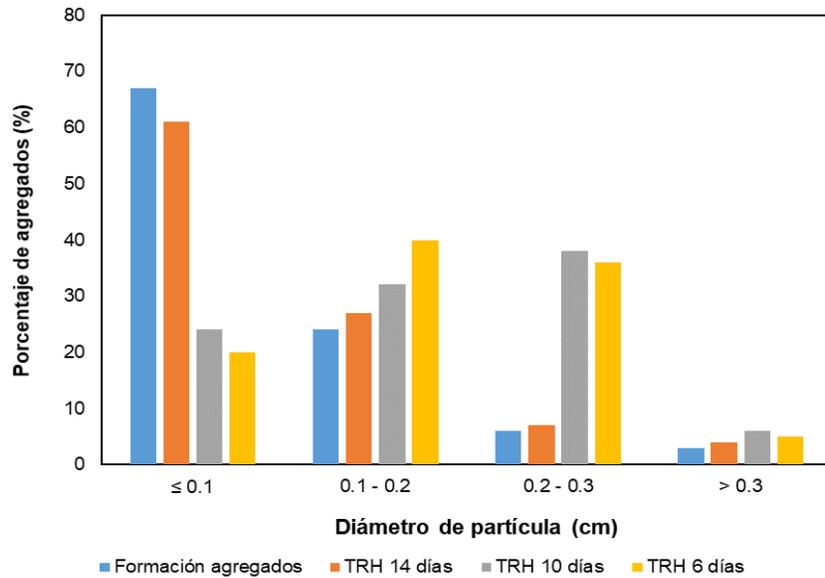


Figura 42. Porcentaje de diámetro de partícula en experimento 2

Durante toda la fase 2 se estuvo monitoreando la estabilidad de los agregados por medio de observación en microscopio y estereoscopio. En la figura 42 se presentan las diferentes observaciones realizadas para cada TRH en los dos reactores operados.

Como se observa en la figura 43, la mayor agregación se presentó en el TRH de 10 días, con mayor presencia de diatomeas. Este crecimiento de diatomeas en la estructura de agregados microalga-bacteria aumenta la densidad de los agregados, mejorando hasta 6 veces la velocidad de sedimentación (Arcila & Buitrón, 2016). Además, se observó también la presencia de microalgas filamentosas (figura 44) las cuales sirvieron de soporte para otras especies de microalgas y diatomeas. Se observó que las estructuras con filamentos no se mantuvieron en el TRH de 6 días.

En la figura 45 se observa que en los tres TRH se presentaron agregados microalga-bacteria de tipo flóculos. Los agregados de mayor tamaño se presentaron cuando se operó con el TRH de 10 días, seguido por el TRH de 14 días y finalmente el TRH de 6 días. Reducir el tiempo de retención hidráulica y a su vez aumentar la carga orgánica del sistema afectó la estabilidad de los agregados, desagregando la biomasa y reduciendo el diámetro de los agregados formados. No se observó presencia de agregados de tipo granular.

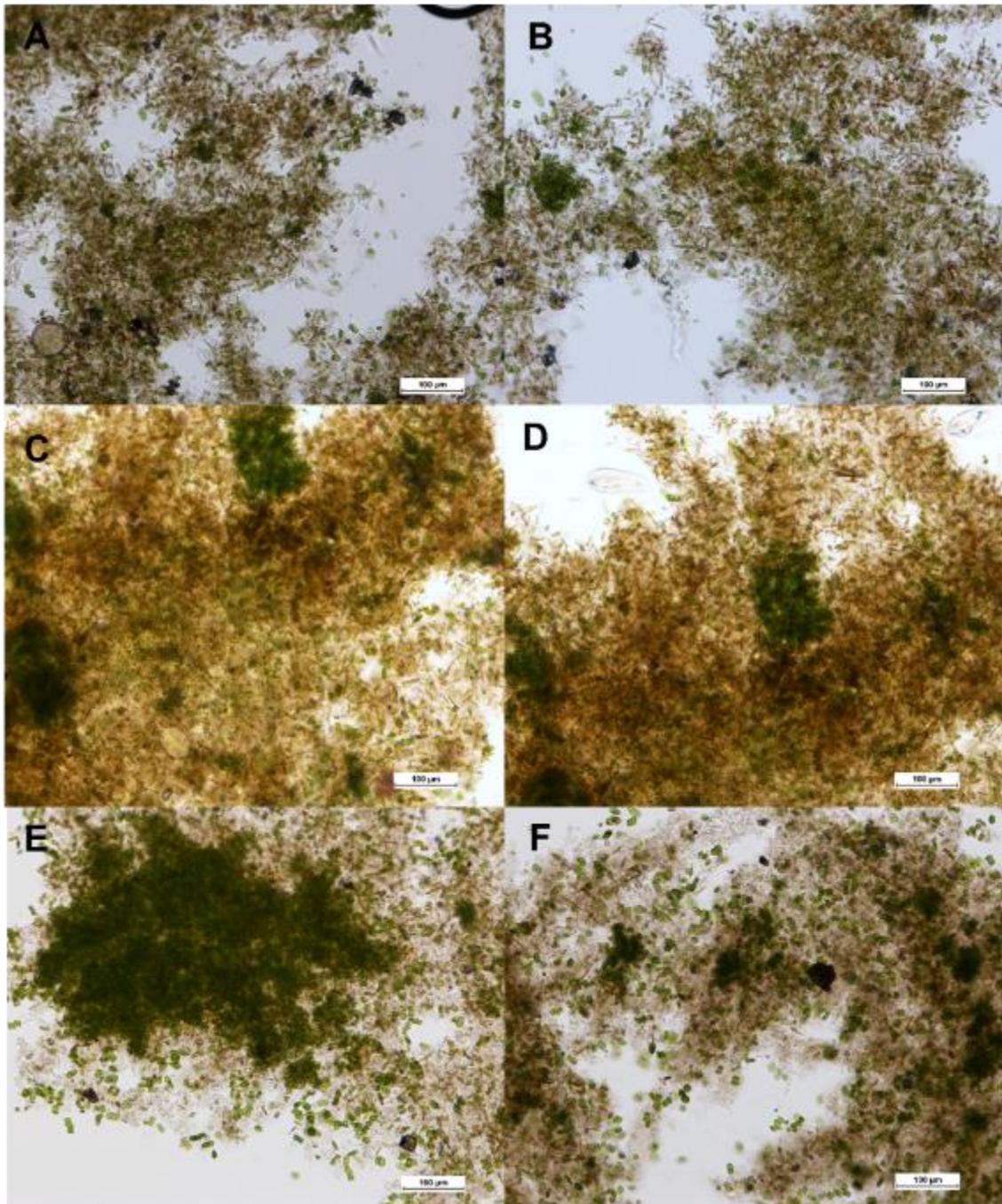


Figura 43. Observación de agregados en microscopio. A. Reactor 1 en TRH de 14 días. B. Reactor 2 en TRH de 14 días. C. Reactor 1 en TRH de 10 días. D. Reactor 2 en TRH de 10 días. E. Reactor 1 en TRH de 6 días. F. Reactor 2 en TRH de 6 días.

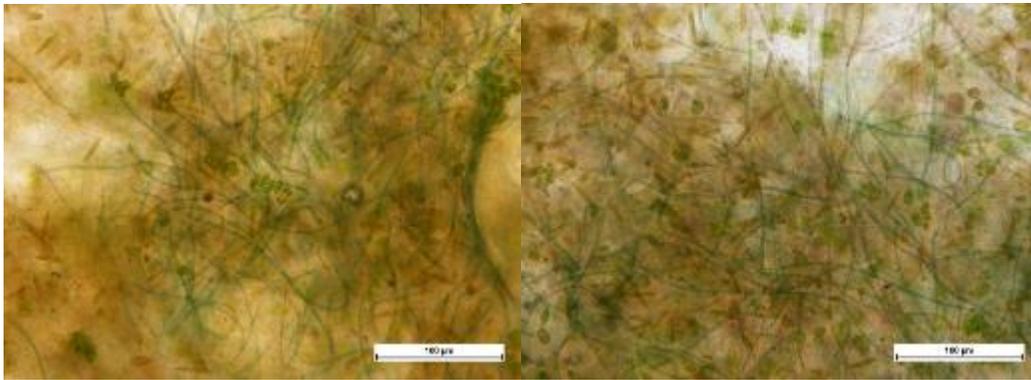


Figura 44. Observación de microalgas filamentosas en TRH de 10 días. Izquierda – reactor 1 y derecha – reactor 2.

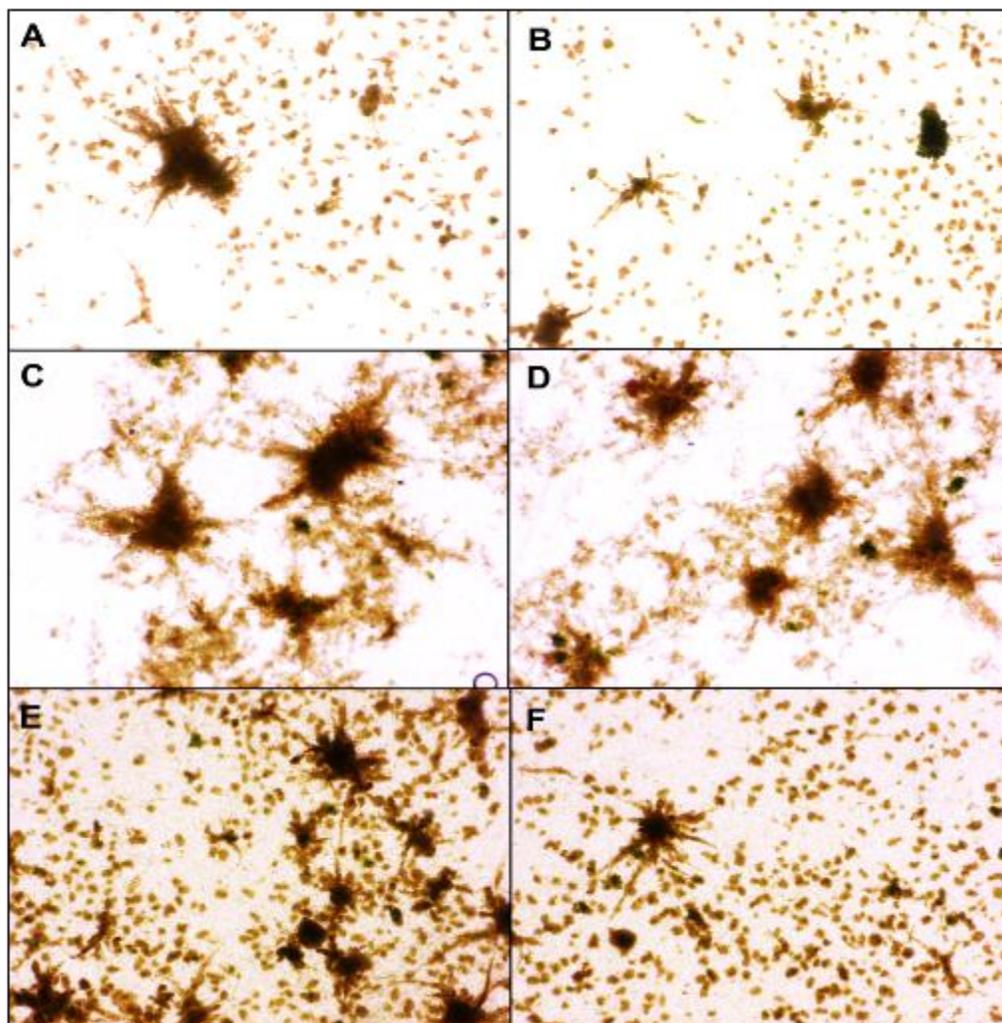


Figura 45. Observación de agregados en estereoscopio. A. Reactor 1 en TRH de 14 días. B. Reactor 2 en TRH de 14 días. C. Reactor 1 en TRH de 10 días. D. Reactor 2 en TRH de 10 días. E. Reactor 1 en TRH de 6 días. F. Reactor 2 en TRH de 6 días.

El comportamiento de los agregados se encuentra ligado a la concentración de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Los EPS son los polímeros naturales de alto peso molecular secretados por microorganismos a su entorno que, constituyen la integridad funcional y estructural de las biopelículas, y se consideran el componente fundamental que determina las características fisicoquímicas de una biopelícula (Staudt et al., 2004).

Los EPS se componen de los metabolitos secretados resultantes del crecimiento microbiano, los materiales intracelulares liberados por la lisis celular y la materia orgánica adsorbida del influente (C. Park et al., 2008). Estos EPS gobiernan la formación de flóculos, la sedimentabilidad y la calidad de los efluentes (C. Park & Novak, 2009). Se ha reportado que, las microalgas también producen EPS que pueden afectar la floculación y los cambios en las condiciones ambientales se reflejan en de la producción de EPS por parte de las microalgas como de las bacterias (Pereira et al., 2013)

Los EPS se componen de una amplia variedad de especies moleculares orgánicas e inorgánicas y las proteínas son el componente orgánico predominante de la matriz extracelular, influyendo en las propiedades de superficie como en el volumen de los flóculos (C. Park et al., 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, en la figura 46 se presenta un comparativo de la cantidad de EPS ligado por gramo de sólidos suspendidos volátiles durante los tres TRH estudiados. Se encontró que la mayor concentración de EPS se presentó durante el TRH de 10 días, seguido por el día 14 días y finalmente el de 6 días. Como se observa, en los tres TRH la concentración de proteínas fue mayor a la de carbohidratos, confirmando así la propiedad de agregación, obteniendo valores de $37 \pm 1.3 \text{ mg g SSV}^{-1}$ para el TRH de 10 días, $30 \pm 4.8 \text{ mg g SSV}^{-1}$ y $28 \pm 3.8 \text{ mg g SSV}^{-1}$ para el TRH de 6 días y en ese mismo orden se presentó la agregación del sistema.

Lo anterior también guarda relación con la cantidad de biomasa generada en el sistema en este caso en forma de sólidos suspendidos volátiles (SSV). En la figura 47 se presenta el seguimiento de los sólidos en los reactores durante la operación del experimento. En el TRH de 14 días donde la carga orgánica es de $68.4 \text{ mg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, del día 43 al 58 se observa una fase exponencial en la que, los microorganismos se multiplican con rapidez, pasando de 750 a $860 \text{ mg SSV L}^{-1}$, seguido se observa del día 65 al 72 una fase estacionaria, allí la concentración de la biomasa no varía, manteniéndose en $800 \text{ mg SSV L}^{-1}$ y no se observa fase de decaimiento. Al pasar al TRH de 10 días donde la carga orgánica pasa a $95.7 \text{ mg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, se observa nuevamente una fase exponencial alcanzando una concentración de SSV de 1040 mg L^{-1} , aparentemente, el sistema se estaba aclimatando y por ende soportando cargas orgánicas cada vez más altas, sin embargo, al pasar al TRH de 6 días y al aumentar la carga orgánica hasta $159.5 \text{ mg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, se observa una fase de decaimiento, disminuyendo la biomasa hasta una concentración de $855 \text{ mg SSV L}^{-1}$.

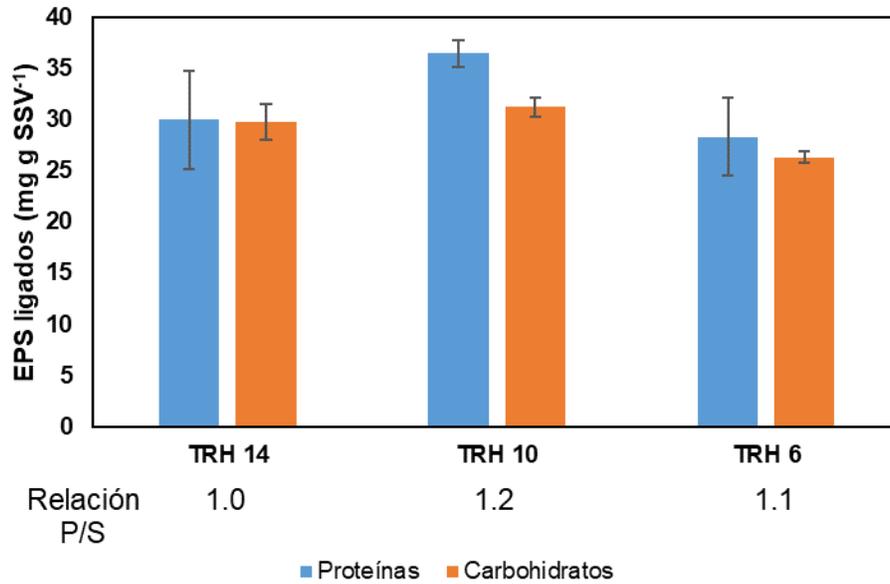


Figura 46. Comparación de la cantidad de EPS ligado obtenido por gramo de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en los TRH de 14, 10 y 6 días

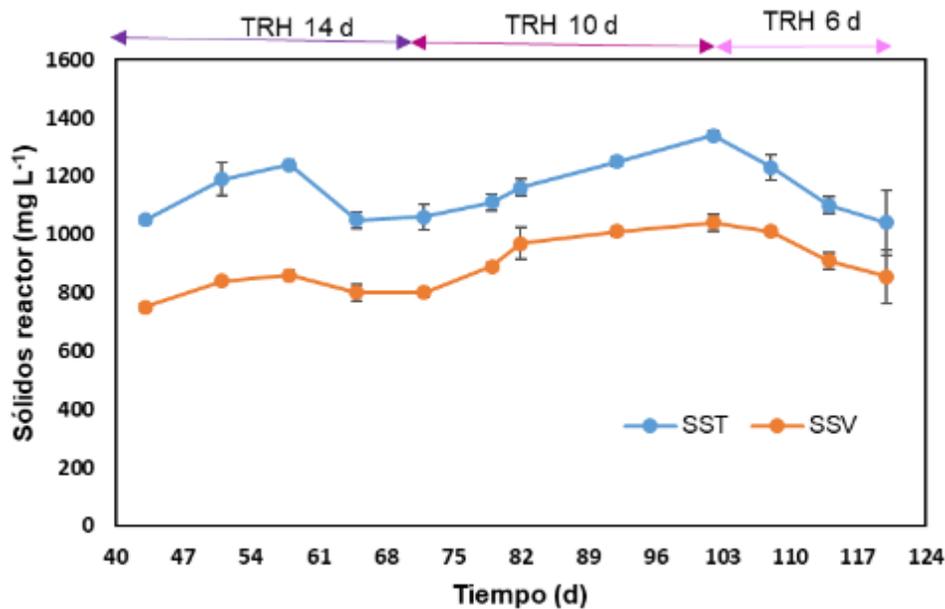


Figura 47. Seguimiento de los SST y SSV en los reactores en los TRH de 14, 10 y 6 días

En cuanto al comportamiento de los sólidos en el efluente, como se observa en la gráfica 48, se presentó un aumento de los mismos al pasar del TRH de 10 al de 6 días, producto de la desagregación de la biomasa, pasando de tener 138.8 mg SST L⁻¹ en el TRH de 10 días a 216.7 mg SST L⁻¹ en el TRH de 6 días. De igual forma,

los SSV aumentaron pasando de 115.6 mg SSV L⁻¹ en el TRH de 10 días a 201.7 mg SSV L⁻¹ en el TRH de 6 días.

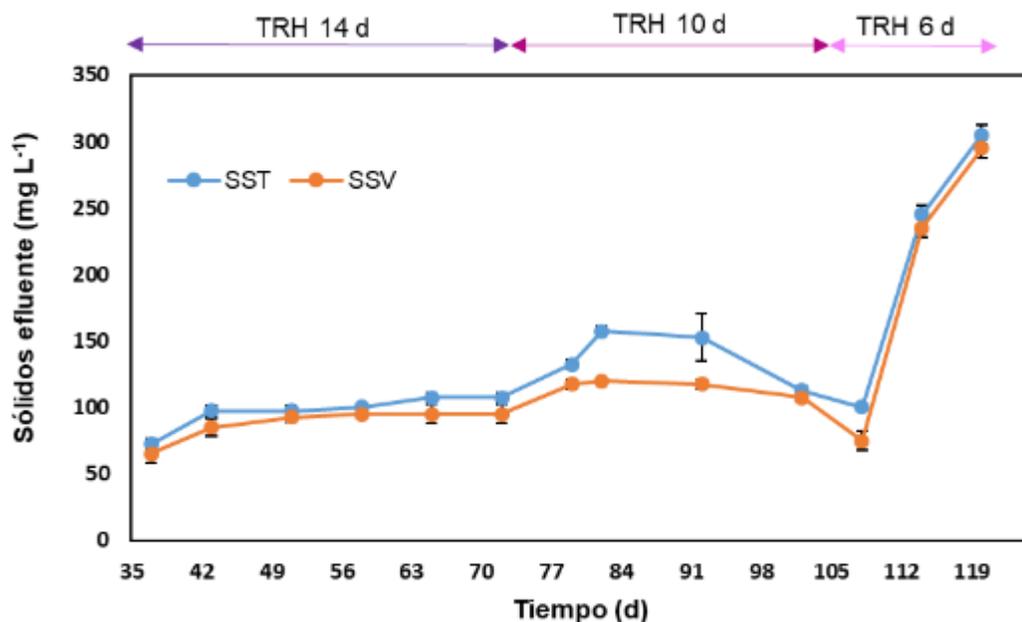


Figura 48. Seguimiento de los SST y SSV en el efluente en los TRH de 14, 10 y 6 días

6.2.2.1.2. pH, temperatura y oxígeno disuelto

A continuación, los datos obtenidos del sistema de los parámetros de pH, temperatura y oxígeno disuelto durante la fase 2 de este experimento. Las mediciones se hicieron únicamente dos veces en el día, la primera a las 9:00 a.m. y la segunda a las 2:00 p.m. y posteriormente estas se promediaron, no se realizó medición en línea para pH y temperatura por lo cual, se desconoce los valores que pudieron alcanzar estos parámetros durante la noche. Se realizó únicamente un experimento de medición de oxígeno disuelto en línea por 24 horas para cada TRH evaluado, con el fin de conocer si se generaron condiciones anóxicas en las noches.

Como se puede observar en la figura 49, en esta fase 2 el TRH de 14 días no tuvo mayor variación en comparación con la fase de formación de agregados. La carga orgánica de entrada y la concentración de N-NH₄⁺ no generaron aumento ni disminución del mismo, obteniéndose valores entre 7.9 y 9.6 para el reactor 1 y para el reactor 2 se obtuvieron valores en un rango entre 8.1 y 9.8. el pH no se modificó puesto que, se podía presentar desagregación de la biomasa y como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que bajo un valor mayor a 8 las microalgas tienen la suficiente capacidad de desarrollarse y generar agregados (Arcila et al., 2021).

Al pasar al pH de 10 días, se observa una variación en el pH donde este disminuye hasta valores entre 7.1 y 8.3 para el reactor 1 y 7 y 8.4 para el reactor 2. Lo anterior ocurrió debido a la disminución del TRH, esto trajo consigo un mayor volumen de influente con alta concentración de materia orgánica y N-NH_4^+ , ya se ha reportado que la asimilación del amonio está estrechamente relacionada con el pH del medio (Brewer & Goldman, 1976), cuando se utiliza amonio como fuente de nitrógeno, el pH del medio puede disminuir rápidamente hasta niveles de 3, sin embargo en este caso solo disminuyó 2 unidades. Aunque el descenso del pH puede generar inhibición en el crecimiento de las microalgas, en este experimento se logró todo lo contrario, la biomasa en forma de SSV presentó aumento como se reportó en el ítem 6.2.2.1.1. y aunque el pH presentó disminución, se encontraba aún en el rango óptimo para las microalgas.

Contrario a lo que sucedió con el TRH de 10 días, en el TRH de 6 días, al aumentar el volumen de influente, se presentó disminución en el pH a niveles entre 6.7 y 7.6 en ambos reactores. Asimismo, se presentó disminución en la concentración de la biomasa debido a que un descenso de pH suele ser letal, en cambio las microalgas suelen soportar mejor los incrementos del pH hasta un cierto límite (Richmond, 2014).

Además del aumento periódico del caudal influente con alta concentración de N-NH_4^+ que, disminuyó paulatinamente el pH, otro factor que influyó en el mismo fue la temperatura, puesto que cuando hay un incremento en la temperatura como se observa en la figura 50, el pH disminuye. La razón por la cual la temperatura afectó el pH del sistema es que, las moléculas de agua tienden a descomponerse en sus constituyentes, el hidrógeno y el oxígeno, al aumentar la temperatura. A medida que aumentó la temperatura, una mayor proporción de moléculas de agua se rompieron, lo que produjo más hidrógeno, que luego aumentó el pH del sistema.

La temperatura no solo afectó el pH del medio sino también la concentración de oxígeno disuelto. Como se puede observar en la figura 51 a medida que avanzó el experimento y sus respectivos TRH a estudiar, la temperatura fue aumentando y el oxígeno disuelto disminuyendo, esto debido a que la solubilidad del oxígeno disminuye a medida que aumenta la temperatura.

En la figura 52 se presenta el monitoreo del oxígeno disuelto en tiempo real por 24 horas para los tres TRH evaluados. Se observa que en ninguno de los tres tiempos hubo condiciones anóxicas, pero si disminución de la concentración de oxígeno disuelto según cada tiempo evaluado. A medida que se disminuye el TRH, disminuye también la concentración de oxígeno disuelto presente en el medio, debido al aumento de la temperatura a lo largo del experimento que como se mencionó anteriormente disminuye la solubilidad del oxígeno del medio.

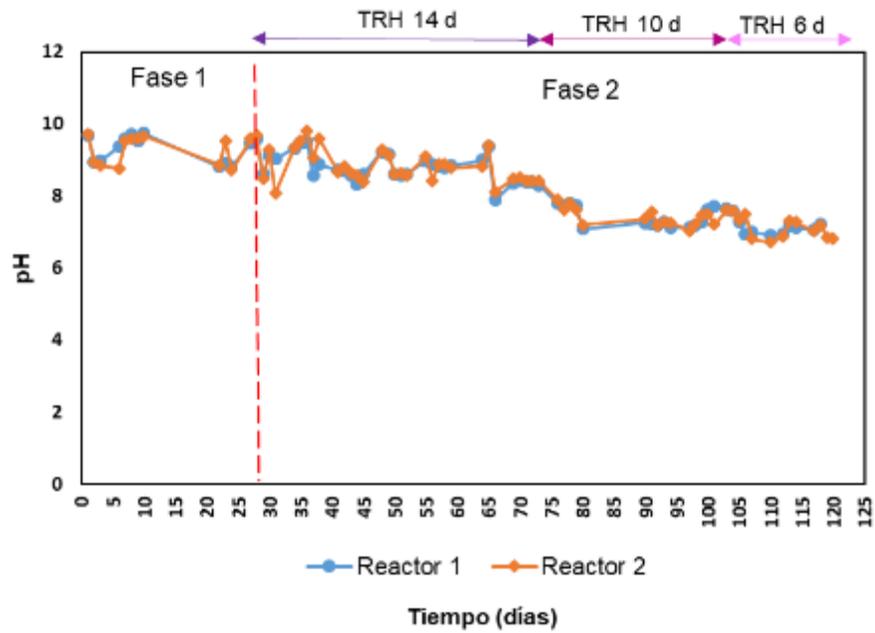


Figura 49. Monitoreo de pH en fase 2 del experimento 2

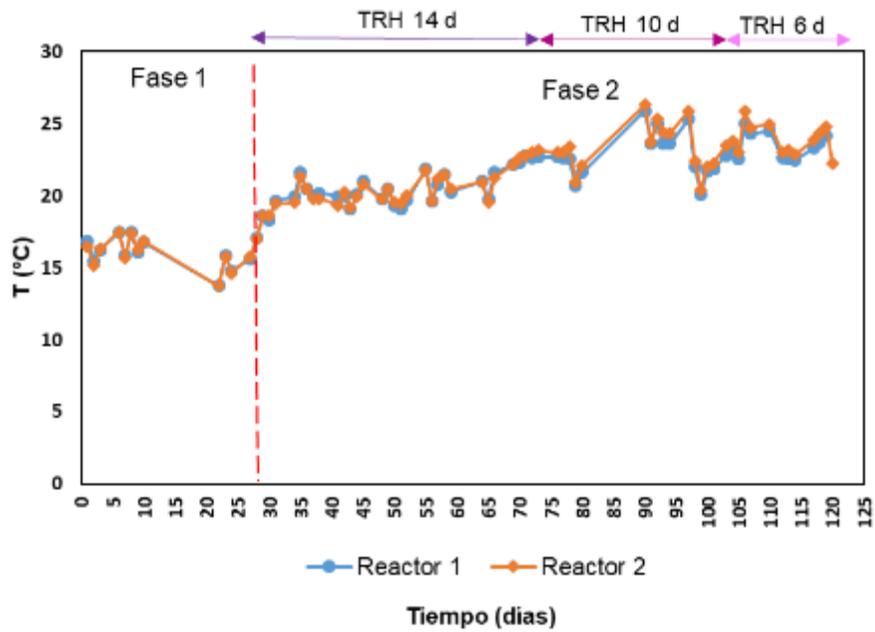


Figura 50. Monitoreo de temperatura en fase 2 del experimento 2

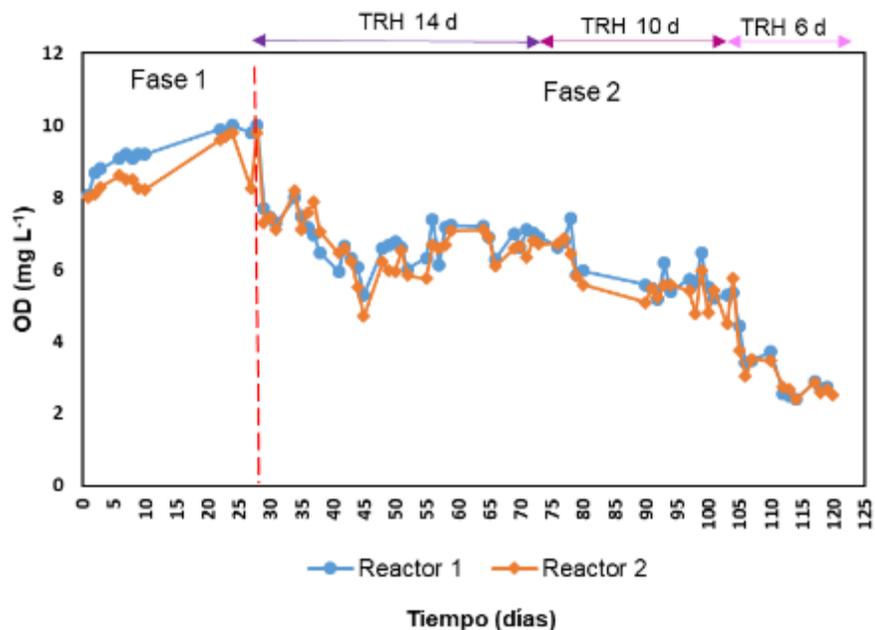


Figura 51. Monitoreo de oxígeno disuelto en fase 2 del experimento 2

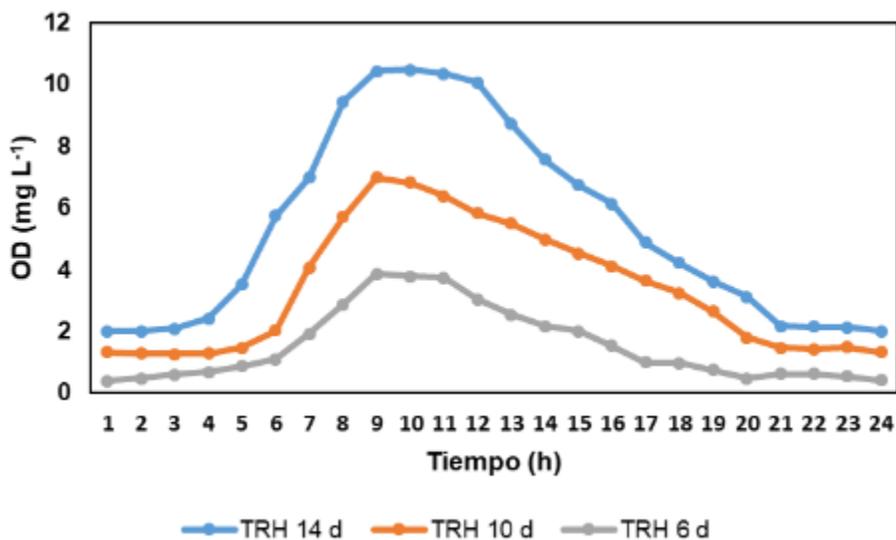


Figura 52. Monitoreo de oxígeno disuelto en tiempo real por 24 horas en fase 2 del experimento 2

6.2.2.1.3. Remoción de $N-NH_4^+$, $P-PO_4^{3-}$ y DQO_s

Se calculó el porcentaje de remoción de $N-NH_4^+$, $P-PO_4^{3-}$ y DQO_s en el efluente para los TRH de 14, 10 y 6 días, bajo el tratamiento del digestato centrifugado con un

factor de dilución 1:10. En la figura 53 se puede observar los porcentajes de remoción obtenidas para cada tiempo.

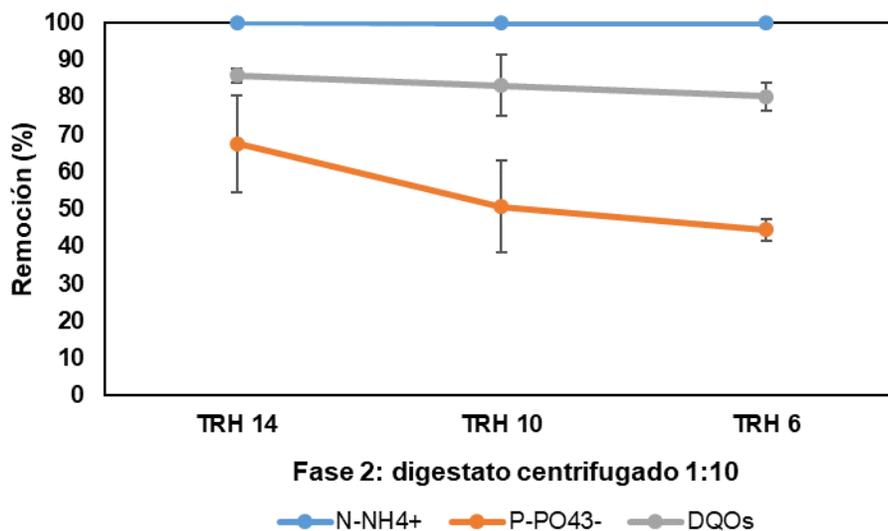


Figura 53. Remoción de materia orgánica y nutrientes en fase 2 del experimento 2

Durante el tratamiento con el TRH de 14 días se obtuvo una remoción de N-NH₄⁺ de 100%, 67 ± 13% de P-PO₄³⁻ y 86 ± 2% de DQO_s. Durante el tratamiento con el TRH de 10 días, la remoción del N-NH₄⁺ se mantuvo igual al 100%, la remoción del P-PO₄³⁻ disminuyó al 51 ± 12% y la de la DQO_s a 83 ± 8%. Finalmente, al operar con el TRH de 6 días y aumentar la carga orgánica en el sistema, no se afectó la remoción del N-NH₄⁺ permaneciendo al 100%, sin embargo, si afectó considerablemente las eficiencias de remoción de P-PO₄³⁻ y DQO_s las cuales disminuyeron a 44 ± 3% y 80 ± 4% respectivamente. Partiendo de los resultados obtenidos en cada TRH, se lograron las mejores eficiencias de remoción de materia orgánica y nutrientes con el TRH de 14 días.

En la tabla 16 se presenta una revisión de las eficiencias de remoción de N-NH₄⁺, P-PO₄³⁻ y DQO_s en sistemas microalga bacteria en HRAP con digestato municipal. Como se observa en los trabajos reportados, con una concentración en un rango de 50 a 112 mg N-NH₄⁺ L⁻¹, se mantiene una eficiencia de remoción de hasta el 96%, pero para esta investigación, con una concentración mayor, es decir de 117.6 ± 1.3 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ se obtuvo una eficiencia de remoción de N-NH₄⁺ del 100%. Por su parte en cuanto a la remoción de la DQO_s como se observa en el trabajo reportado por Gu et al (2021), trabajando con una concentración de DQO_s de 421 mg L⁻¹, apenas se obtiene una eficiencia de remoción del 49%, contrario a este trabajo, donde al operar con más del doble de la concentración reportada, es decir con 959.3 ± 0.8 mg L⁻¹ de DQO_s se obtienen eficiencias de remoción entre 80 y 86%.

Tabla 16. Revisión bibliográfica de eficiencias de remoción de N-NH₄⁺ P-PO₄³⁻ y DQO_s en sistemas microalga bacteria en HRAP con digestato municipal

TRH (d)	N-NH ₄ ⁺ influente (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ efluente (mg L ⁻¹)	%Remoción N-NH ₄ ⁺	P-PO ₄ ³⁻ influente (mg L ⁻¹)	P-PO ₄ ³⁻ efluente (mg L ⁻¹)	% Remoción P-PO ₄ ³⁻	DQO _s influente (mg L ⁻¹)	DQO _s efluente (mg L ⁻¹)	%Remoción DQO _s	Fuente
5	245	170	31	32.4	9	72	291	260	11	(Bankston et al., 2020)
5	2000	1950	2.5	N.R	N.R	N.R	1300	N.R	N.R	(Wang et al., 2019a)
5	800 1600	595 1280	26 20	33	N.R	N.R	69	N.R	N.R	(Ayre et al., 2017)
6	50	3	94	199	0	100	138	105	24	(Díaz-Zamorano., 2020)
8	50	2	96	N.R	N.R	N.R	300	N.R	N.R	(Scarponi et al., 2021)
10	112	28	75	4.7	2	57	421	257	39	(Gu et al., 2021)
14	117.6	0.03	100	51.2	16	67	959.3	136	86	Este trabajo
10	117.6	0.07	100	51.2	25	51	959.3	162	83	
6	117.6	0.1	100	51.2	17	44	959.3	191	80	

6.2.2.1.4. Mecanismos de remoción del nitrógeno

Una de las principales problemáticas en el tratamiento de digestato de tipo municipal es la alta concentración de nitrógeno en forma de NH₄⁺. La remoción de N- NH₄⁺ implica mayores costos operativos en las plantas de tratamiento de agua residual por la oxigenación necesaria del sistema para realizar los respectivos procesos de nitrificación y desnitrificación. Sin embargo, como se puede observar en la figura 54, al realizarse un balance de nitrógeno de este experimento, el nitrógeno total de influente presentó una concentración de 197.9 mg L⁻¹ donde en su mayoría fue NH₄⁺ con 117.6 ± 1.3 mg L⁻¹, de lo cual al realizar el tratamiento mediante el sistema microalga-bacteria se obtiene que en los tres TRH estudiados, este NH₄⁺ es removido casi un 100% del digestato, pasando a ser volatilizado en forma de amoníaco en su mayoría, convertido en nitritos y nitratos y/o permanecido en la biomasa microalga-bacteria efluente.

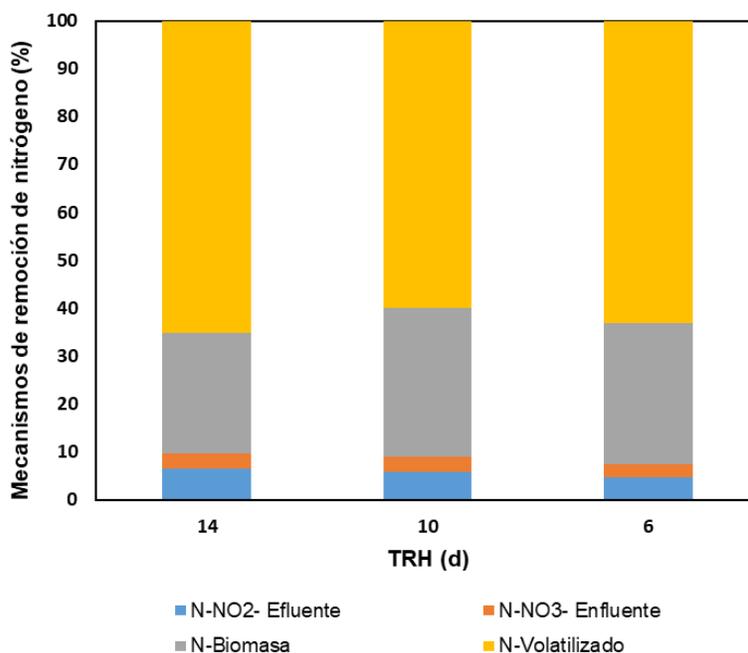


Figura 54. Mecanismos de remoción de nitrógeno en fase 2 del experimento 2

6.2.3. Perfil de radiación fotosintéticamente activa

La radiación fotosintéticamente activa (RFA) es la cantidad de radiación integrada del rango de longitudes de onda que puede producir actividad fotosintética en las microalgas (Sun et al., 1998). Este rango comprende entre los 400 y 700 nm. La unidad de medida para la RAF es $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La proporción de RAF del total de energía solar medida es del 40% para Norteamérica. El factor de conversión utilizado para la luz natural es de 1 W m^{-2} equivale a $4.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Masojídek et al., 2013).

Los datos de radiación obtenidos durante la operación del experimento se ajustaron de acuerdo a las consideraciones mencionadas, se hizo un reajuste reduciendo el resultado un 52% que representa la radiación que realmente llega al sistema bajo las mallas de sombreo del experimento. Se tomaron los datos de radiación de los meses de operación de este experimento, se realizó el cálculo del promedio de radiación fotosintéticamente activa de cada mes y se graficó.

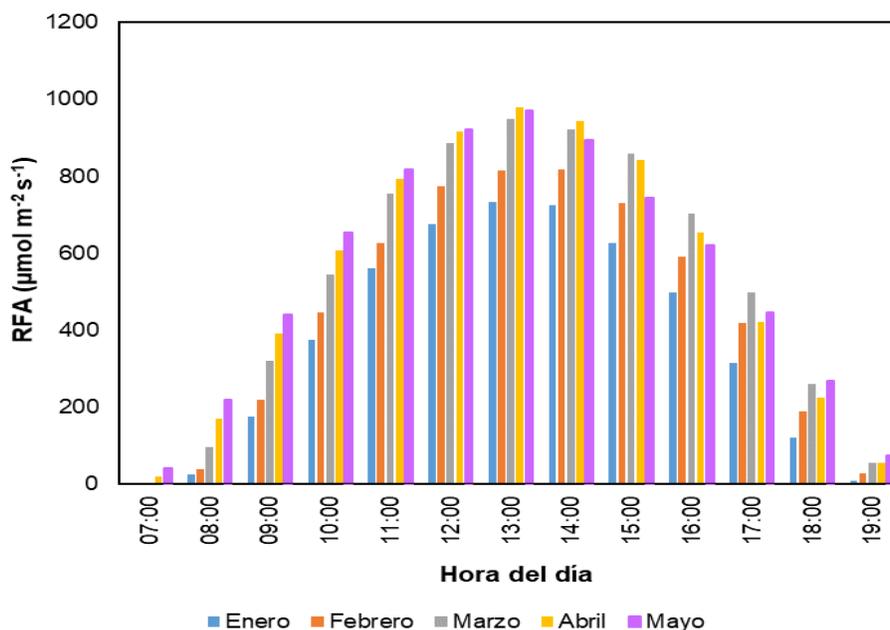


Figura 55. Valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) durante los meses de operación del experimento 2

En la figura 55 se presentan los valores de radiación fotosintéticamente activa por día durante el periodo de realización del experimento 2. En el mes de enero y febrero cuando se realizó la fase 1 de formación de agregados, se obtuvo una radiación máxima de $818 \pm 122 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para el mes de marzo se operó el sistema con el digestato centrifugado y diluido 1:10 bajo el TRH de 14 días y se obtuvo una radiación máxima de $948 \pm 91 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para el mes de abril se operó el sistema bajo el TRH de 10 días y se obtuvo una radiación máxima de $978 \pm 51 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, finalmente para el mes de mayo se operó bajo el TRH de 6 días y se obtuvo una radiación máxima de $978 \pm 64 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Los resultados anteriores se encuentran estrechamente relacionados con la actividad fotosintética de las microalgas. Como se pudo observar el mes que presentó más alta radiación fue abril, justamente cuando se estaba llevando a cabo la operación bajo el TRH de 10 días, en este tiempo se presentó la concentración más alta de biomasa (figura 47). Asimismo, se encontró que la temperatura estuvo enteramente relacionada con la radiación debido a que, a mayor radiación, mayor es la temperatura en el sistema y como se observó en la figura 49, en la operación del TRH de 10 días se presentaron las temperaturas más altas, lo que también trajo consigo menor concentración de oxígeno disuelto en el medio y reducción de pH, sin embargo aunque se presentaran dichas variaciones, el sistema nunca se inhibió, debido a que se encontró en condiciones óptimas de operación.

Se ha reportado que la tolerancia de radiación por parte de las microalgas típicamente ocurre en rangos de 200 a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Gordon & Polle, 2007), sin

embargo, no es un límite fundamental para su desarrollo, puesto que se algunos estudios como el de Hu et al (1998) reportaron que, se puede las microalgas pueden alcanzar una tolerancia de radiación de hasta aproximadamente $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comprobándose en este experimento donde en todos los meses de operación de los reactores las radiaciones reportadas alcanzaron valores mayores a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el sistema no presentó inhibición.

6.2.4. Comparación con la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021

Al realizarse una comparación de las características del efluente generado en este experimento con la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021 que, establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores, propiedad de la nación en valor instantáneo de medición (tabla 17), se obtiene que los efluentes de los TRH de 14 y 10 días cumplen según la norma para ser dispuestos en el suelo a través de infiltración y otros riegos.

Tabla 17. Comparación de efluente con Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-2021

Parámetro (mg L ⁻¹) excepto cuando especifique	Efluente este trabajo			NOM-001-SEMARNAT-2021
				Límites permisibles Suelo
	TRH 14	TRH 10	TRH 6	Infiltración y otros riegos
				V.I.
Temperatura (°C)	20.2	23.1	23.7	35
SST	97	139	217	140
DQO	136	192	191	210
pH	8.8	7.5	7.2	6 - 9

V.I: Valor Instantáneo

Cabe resaltar que para la disposición en suelo como infiltración y otros riegos, fósforo y nitrógeno no aplican y por ende no se tuvieron en cuenta en la comparación.

7. CONCLUSIONES

Se logró obtener un consorcio microalga-bacteria a partir de un inóculo de lodos activados, proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales y de agua residual sintética. Este consorcio se obtuvo en forma de agregados de tipo flóculos. Esto fue posible al mantener el ambiente del sistema con los nutrientes necesarios y con disponibilidad de radiación solar para la proliferación de las microalgas presentes en los lodos activados.

Los géneros de microalgas que predominaron en fueron *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Tetrademus*, *Navicula* y algunas microalgas filamentosas, información basada en la observación microscópica realizada.

Al operar el sistema utilizando digestato centrifugado y diluido 1:10 se observó que el consorcio microalga-bacteria se mantuvo estable bajo los TRH de 14 y 10 días, por lo que la concentración alimentada de digestato no inhibió el crecimiento de la biomasa. El aumento de la carga orgánica para los TRH de 14 y 10 días no generó desagregación del sistema ni disminuyó la sedimentabilidad, pero al aumentar la carga orgánica al operar con TRH de 6 días, la biomasa presentó reducción en su concentración, disgregación de la misma y disminución en la sedimentabilidad.

Los agregados microalga-bacteria de tipo flóculos de mayor tamaño se encontraron bajo el TRH de 10 días, esto producto de la presencia de microalgas filamentosas y a la más alta producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) con 37 ± 1.3 mg proteínas g^{-1} SSV y 31 ± 1 mg carbohidratos g^{-1} SSV los cuales gobernaron la formación de flóculos y la sedimentabilidad del sistema, de esta forma la sedimentabilidad más alta se logró también en este TRH con 2.37 ± 0.03 m h^{-1} .

El TRH de 14 días presentó las remociones más altas de nutrientes y materia orgánica (100% N-NH₄⁺, 67% P-PO₄³⁻ 86% y DQO_s), seguido por el TRH de 10 días (100% N-NH₄⁺, 51% P-PO₄³⁻ 83% y DQO_s). El TRH de 6 días presentó las más bajas remociones de nutrientes y materia orgánica (100% N-NH₄⁺, 44% P-PO₄³⁻ 80% y DQO_s), producto de la alta carga orgánica, inhibición del sistema, reducción de la biomasa y disgregación de la misma.

El N-NH₄⁺ presente en el influente (digestato centrifugado 1:10) fue removido casi en su totalidad por el sistema microalga-bacteria, obteniéndose un efluente con concentraciones de 0.03, 0.07 y 0.1 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ en los TRH de 14, 10 y 6 días respectivamente y los mecanismos de remoción de nitrógeno estuvieron gobernados por la volatilización en forma de amoníaco y como nitrógeno en la biomasa para los tres TRH.

A menor TRH, mayor es la carga orgánica en el influente y ocurre mayor oscurecimiento del sistema, por ende, es menor la disponibilidad de luz para las

microalgas y la realización de la fotosíntesis disminuyendo así el oxígeno disuelto en el medio y a su vez la concentración de nitrito y nitrato.

Una baja radiación fotosintéticamente activa generó afectación en la biomasa. La alta radiación no inhibió el sistema y por el contrario cuando se presentó disminución de la misma, la concentración de biomasa disminuyó también. Asimismo, la radiación afectó la temperatura en el sistema de forma directamente proporcional. Los meses que presentaron mayor radiación, presentaron mayor temperatura en el medio y esto a su vez generó disminución en la concentración de oxígeno disuelto y menor pH.

El pH se vio afectado por la alta concentración de N-NH_4^+ . Al reducir el TRH, aumentó la concentración de N-NH_4^+ , que, al ser consumido, genera a su vez la disminución del pH del medio.

El efluente de los TRH de 14 y 10 días puede ser dispuesto en suelos por medio de infiltración y otros riegos según la NOM-001-SEMARNAT-2021. De igual manera, puede reintroducirse a la planta de tratamiento de agua residual y finalizar su tratamiento debido a que ya no presenta N-NH_4^+ el cual resulta ser uno de los mayores problemas al tratar efluentes de este tipo.

El TRH de 10 días con carga orgánica de $95.6 \text{ mg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ resulta ser el más adecuado para tratar el digestato municipal centrifugado con factor de dilución 1:10, debido a que presenta el más alto crecimiento de biomasa, mayor agregación y tamaño de diámetro de partícula de los agregados, mayor producción de EPS útiles para la agregación, mayores propiedades de sedimentabilidad y altas remociones de materia orgánica y nutrientes, esto logrado a partir de la más alta radiación fotosintéticamente activa.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde Alonso, J. E., Cid Blanco, A., Fidalgo Paredes, J. P., Torres Vaamonde, J. E., & Herrero López, C. (1995). Microalgas: Cultivo y aplicaciones. In *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*.
<https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Abdul Aziz, N. I. H., Hanafiah, M. M., & Mohamed Ali, M. Y. (2019). Sustainable biogas production from agrowaste and effluents – A promising step for small-scale industry income. *Renewable Energy*, 132, 363–369.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.07.149>
- Åkerström, A. M., Mortensen, L. M., Rusten, B., & Gíslérød, H. R. (2014). Biomass production and nutrient removal by *Chlorella* sp. as affected by sludge liquor concentration. *Journal of Environmental Management*, 144, 118–124.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.015>
- Akizuki, S., Cuevas-Rodríguez, G., & Toda, T. (2021). Nitrification of anaerobic digestate using a consortium of microalgae and nitrifiers in an open photobioreactor with moving bed carriers. *Chemosphere*, 263.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127948>
- Arcila, J. S., & Buitrón, G. (2016). Microalgae–bacteria aggregates: effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment, biomass settleability and methane potential. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(11), 2862–2870. <https://doi.org/10.1002/jctb.4901>
- Arcila, J. S., & Buitrón, G. (2017). Influence of solar irradiance levels on the formation of microalgae-bacteria aggregates for municipal wastewater treatment. *Algal Research*, 27(September), 190–197.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.011>
- Arcila, J. S., Céspedes, D., & Buitrón, G. (2021). Influence of the wavelength photoperiods and N/P ratio on wastewater treatment with microalgae-bacteria. *Water Science and Technology*, 00(0), 1–13.
<https://doi.org/10.2166/wst.2021.257>
- Arellano, V. M. (2013). Implementación de un proceso aerobio de lodos granulares con membranas sumergidas. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 144.
- Arias, D. M., Uggetti, E., García-Galán, M. J., & García, J. (2017). Cultivation and selection of cyanobacteria in a closed photobioreactor used for secondary effluent and digestate treatment. *Science of the Total Environment*, 587–588, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.097>
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>
- Ayre, J. M., Moheimani, N. R., & Borowitzka, M. A. (2017). Growth of microalgae

- on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal Research*, 24, 218–226.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.023>
- Bankston, E., Wang, Q., & Higgins, B. T. (2020). Algae support populations of heterotrophic, nitrifying, and phosphate-accumulating bacteria in the treatment of poultry litter anaerobic digestate. *Chemical Engineering Journal*, 398(May), 125550. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125550>
- Barnett, J. Z. (2015). *Effects of Light Quality and Light Quantity on the Growth Kinetics of a Louisiana Native Microalgal / Cyanobacterial Co-culture*. 3285. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bjornsson, W. J., Nicol, R. W., Dickinson, K. E., & McGinn, P. J. (2013). Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: Functional coupling of energy and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 25(5), 1523–1528. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9968-0>
- Boffill-Rodríguez, Y., García-Rodríguez, A., & Castellanos-Estupiñan, J. (2012). Preliminary quantitative estimate production rates of microalgal biomass from the reaction of photosynthesis. *Tecnología Química*, 32(1), 31–41.
- Bond, J. G., Arredondo-Jiménez, J. I., Rodríguez, M. H., Quiroz-Martínez, H., & Williams, T. (2005). Oviposition habitat selection for a predator refuge and food source in a mosquito. *Ecological Entomology*, 30(3), 255–263. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2005.00704.x>
- Borowitzka, M. A. (1990). Progress in industrial microbiology. *Journal of Biotechnology*, 131(3399), 496. <https://doi.org/10.1126/science.131.3399.496>
- Borowitzka, M. A., & Moheimani, N. R. (2013). Open Pond Culture Systems. *Algae for Biofuels and Energy*, 133–152. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9>
- Boussiba, S., & Gibson, J. (1991). Ammonia translocation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 88(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90692-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90692-4)
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Brewer, P. G., & Goldman, J. C. (1976). Alkalinity changes generated by phytoplankton growth. *Limnology and Oceanography*, 21(1), 108–117. <https://doi.org/10.4319/lo.1976.21.1.0108>
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour Technol*, 99(10), 4044–4064.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>

- Chen, Yeh, Aisyah, Lee, & Chang. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, *102*(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Cheng, J., Xu, J., Huang, Y., Li, Y., Zhou, J., & Cen, K. (2015). Growth optimisation of microalga mutant at high CO₂ concentration to purify undiluted anaerobic digestion effluent of swine manure. *Bioresource Technology*, *177*, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.099>
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., & Das, K. C. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*, *101*(9), 3097–3105. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.026>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, *29*(6), 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Chu, F. F., Chu, P. N., Shen, X. F., Lam, P. K. S., & Zeng, R. J. (2014). Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, *152*, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.013>
- Chuka, D., Ogbonna, J., & Moheimani, N. (2020). A review on microalgal culture to treat anaerobic digestate food waste effluent. *Algal Research*, *47*(January), 101841. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101841>
- Craggs, R. J., Lundquist, T. J., & Benemann, J. R. (2013). Wastewater Treatment and Algal Biofuel Production. *Algae for Biofuels and Energy*, 1–288. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9>
- Cuellar, S., Aleman, G., Chandra, R., Garcia, S., Contreras, J., Markou, G., Muylaert, K., Rittmann, B., & Parra, R. (2017). Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*, *24*, 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.018>
- de Godos, I., 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. *Bioresource Technology*, *101*(14), 5150–5158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.010>
- Dębowski, M., Szwaja, S., Zieliński, M., Kisiełewska, M., & Stańczyk-Mazanek, E. (2017). The Influence of Anaerobic Digestion Effluents (ADEs) Used as the Nutrient Sources for *Chlorella* sp. Cultivation on Fermentative Biogas Production. *Waste and Biomass Valorization*, *8*(4), 1153–1161. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9667-1>

- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>
- Doucha, J., & Lívanský, K. (1995). Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system : Productivity and operational parameters. *Algological Studies*, 76, 129–147. <https://doi.org/10.1127/algol>
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2006). Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 811–826. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4>
- Drath, M., Kloft, N., Batschauer, A., Marin, K., Novak, J., & Forchhammer, K. (2008). Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiology*, 147(1), 206–215. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117218>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, Pa., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- El-Kassas, H. Y. (2013). Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* Sp. grown under nutrient stress conditions. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 39(4), 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.007>
- Farooq, J., & Ali, M. B. (2014). Real time hand gesture recognition for computer interaction. *2014 International Conference on Robotics and Emerging Allied Technologies in Engineering*, 73–77. <https://doi.org/10.1109/iCREATE.2014.6828342>
- Fdez, L. A., Álvarez, C., Sales, D., & Romero, L. I. (2011). Biological pretreatment applied to industrial organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW): Effect on anaerobic digestion. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.06.010>
- Fernandes, F., Silkina, A., Fuentes-Grünwald, C., Wood, E. E., Ndovela, V. L. S., Oatley-Radcliffe, D. L., Lovitt, R. W., & Llewellyn, C. A. (2020a). Valorising nutrient-rich digestate: Dilution, settlement and membrane filtration processing for optimisation as a waste-based media for microalgal cultivation. *Waste Management*, 118, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.08.037>
- Fernandes, F., Silkina, A., Fuentes-Grünwald, C., Wood, E. E., Ndovela, V. L. S., Oatley-Radcliffe, D. L., Lovitt, R. W., & Llewellyn, C. A. (2020b). Valorising nutrient-rich digestate: Dilution, settlement and membrane filtration processing for optimisation as a waste-based media for microalgal cultivation. *Waste Management*, 118, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.08.037>
- Fernández, E., Galván, A., & Quesada, A. (1998). Chapter 33 Nitrogen Assimilation and its Regulation. *Molecular Biology*, 637–659.

- Foladori, P., Petrini, S., & Andreottola, G. (2018). Evolution of real municipal wastewater treatment in photobioreactors and microalgae-bacteria consortia using real-time parameters. *Chemical Engineering Journal*, 345, 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.178>
- 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(6), 738–744. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.023>
- Gomez, L. (2007). Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química, Vol. XIX, Núm. 2.*, 3(19). <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>
- González-Camejo, J., Viruela, A., Ruano, M. V., Barat, R., Seco, A., & Ferrer, J. (2019). Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Research*, 40(December 2018), 101511. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101511>
- González Hernández, C., Sol Hernández, M., & Franco Nava, M. (2014). Estimación de Iluminación en un Fotobiorreactor Productor de Biomasa a Partir de Microalgas. *Conciencia Tecnológica*, 47, 29–35.
- Gordon, J. M., & Polle, J. E. W. (2007). Ultrahigh bioproductivity from algae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 969–975. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1102-x>
- Gu, Z., Liu, Y., Zou, G., Zhang, Q., Lu, R., Yan, H., Cao, L., Liu, T., & Ruan, R. (2021). Enhancement of nutrients removal and biomass accumulation of *Chlorella vulgaris* in pig manure anaerobic digestate effluent by the pretreatment of indigenous bacteria. *Bioresource Technology*, 328(December 2020), 124846. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124846>
- Gutierrez, J., Kwan, T. A., Zimmerman, J. B., & Peccia, J. (2016). Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Research*, 19, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.016>
- Gutiérrez, R., Ferrer, I., Uggetti, E., Arnabat, C., Salvadó, H., & García, J. (2016). Settling velocity distribution of microalgal biomass from urban wastewater treatment high rate algal ponds. *Algal Research*, 16, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.037>
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 1037–1047. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621–639.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>

- Huang, W., Li, B., Zhang, C., Zhang, Z., Lei, Z., Lu, B., & Zhou, B. (2015). Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 179, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.024>
- Ihnken, S., Beardall, J., Kromkamp, J. C., Serrano, C. G., Torres, M. A., Masojídek, J., Malpartida, I., Abdala, R., Jerez, C. G., Malapascua, J. R., Navarro, E., Rico, R. M., Peralta, E., Ezequiel, J. P. F., & Figueroa, F. L. (2014). Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in chlorella mass culture. *Aquatic Biology*, 22(November), 95–110. <https://doi.org/10.3354/ab00586>
- Kim, T. H., Lee, Y., Han, S. H., & Hwang, S. J. (2013). The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 130, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.134>
- Koutra, E., Economou, C. N., Tsafrakidou, P., & Kornaros, M. (2018). Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends in Biotechnology*, 36(8), 819–833. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.015>
- Koutra, E., Mastropetros, S. G., Ali, S. S., Tsigkou, K., & Kornaros, M. (2021). Assessing the potential of *Chlorella vulgaris* for valorization of liquid digestates from agro-industrial and municipal organic wastes in a biorefinery approach. *Journal of Cleaner Production*, 280, 124352. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124352>
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F. X., & van Langenhove, H. (2010). Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.04.004>
- Kwon, G., Nam, J.-H., Kim, D.-M., Song, C., & Jahng, D. (2019). Growth and nutrient removal of *Chlorella vulgaris* in ammonia-reduced raw and anaerobically-digested piggery wastewaters. *Environmental Engineering Research*, 25(2), 135–146. <https://doi.org/10.4491/eer.2018.442>
- Li, C., Li, J., Pan, L., Zhu, X., Xie, S., Yu, G., Wang, Y., Pan, X., Zhu, G., & Angelidaki, I. (2020). Treatment of digestate residues for energy recovery and biochar production: From lab to pilot-scale verification. *Journal of Cleaner Production*, 265, 121852. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121852>
- Li, Y., Chen, Y. F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., Zhu, J., & Ruan, R. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(8), 5138–5144. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>
- Lorenzo, Y., & Obaya, M. C. (2005). La digestión anaerobia. aspectos teóricos.

- Parte I. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 39, 35–48.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659006>
- Lowry, O., Rosebrough, J., Farr, L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
[https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Marcilhac, C., Sialve, B., Pourcher, A. M., Ziebal, C., Bernet, N., & Béline, F. (2014). Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. *Water Research*, 64, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.012>
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition, April*, 21–36. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>
- Medina, M., & Neis, U. (2007). Symbiotic algal bacterial wastewater treatment: Effect of food to microorganism ratio and hydraulic retention time on the process performance. *Water Science and Technology*, 55(11), 165–171.
<https://doi.org/10.2166/wst.2007.351>
- Mehrabadi, A., Craggs, R., & Farid, M. M. (2015). Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production. *Bioresource Technology*, 184, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.004>
- Möller, K., & Müller, T. (2012). Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(3), 242–257. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100085>
- Muga, H. E., & Mihelcic, J. R. (2008). Sustainability of wastewater treatment technologies. *Journal of Environmental Management*, 88(3), 437–447.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.03.008>
- Nagarajan, D., Lee, D. J., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2020). Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource Technology*, 302(December 2019), 122817.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122817>
- Ogbonna, J. C., Yada, H., & Tanaka, H. (1995). Effect of cell movement by random mixing between the surface and bottom of photobioreactors on algal productivity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(2), 152–157.
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)94083-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)94083-4)
- Oswald. (2003). My sixty years in applied algology. *Journal of Applied Phycology*, 15(2/3), 99–106. <https://doi.org/10.1023/a:1023871903434>
- Oswald, W. J. (1991). Introduction to advanced integrated wastewater ponding systems. *Water Science and Technology*, 24(5), 1–7.
<https://doi.org/10.2166/wst.1991.0106>
- Park, C., & Novak, J. T. (2009). Characterization of Lectins and Bacterial Adhesins in Activated Sludge Flocs. *Water Environment Research*, 81(8), 755–764.

<https://doi.org/10.2175/106143008x370421>

- Park, C., Novak, J. T., Helm, R. F., Ahn, Y. O., & Esen, A. (2008). Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Research*, 42(14), 3879–3889. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.014>
- Park, & Craggs. (2011). Nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science and Technology*, 63(8), 1758–1764. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.114>
- 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. *Bioresource Technology*, 101(22), 8649–8657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>
- Perazzoli, S., Bruchez, B. M., Michelon, W., Steinmetz, R. L. R., Mezzari, M. P., Nunes, E. O., & da Silva, M. L. B. (2016). Optimizing biomethane production from anaerobic degradation of *Scenedesmus* spp. biomass harvested from algae-based swine digestate treatment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 109, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.027>
- Pereira, S. B., Mota, R., Santos, C. L., De Philippis, R., & Tamagnini, P. (2013). Assembly and export of extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacteria. A phylogenomic approach. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394313-2.00007-X>
- Phang, S. M., Miah, M. S., Yeoh, B. G., & Hashim, M. A. (2000). Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 395–400. <https://doi.org/10.1023/a:1008157731731>
- Prajapati, S. K., Kumar, P., Malik, A., & Vijay, V. K. (2014). Bioconversion of algae to methane and subsequent utilization of digestate for algae cultivation: A closed loop bioenergy generation process. *Bioresource Technology*, 158, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.023>
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>
- Qiang, H., Richmond, A., & Zarmi, Y. (1998). Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of spirulina platensis (cyanobacteria). *European Journal of Phycology*, 33(2), 165–171. <https://doi.org/10.1080/09670269810001736663>
- Richmond, A. (2014). Handbook of Microalgal Culture. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Blackwell). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9781118567166>
- Sayedine, F., Kermanshahi-pour, A., He, Q. S., Tibbetts, S. M., Lalonde, C. G. E., & Brar, S. K. (2020). Microalgae cultivation in thin stillage anaerobic digestate for

- nutrient recovery and bioproduct production. *Algal Research*, 47(July 2019), 101867. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101867>
- Scarponi, P., Volpi Ghirardini, A. M., Bravi, M., & Cavinato, C. (2021a). Evaluation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* growth on pretreated organic solid waste digestate. *Waste Management*, 119, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.047>
- Scarponi, P., Volpi Ghirardini, A. M., Bravi, M., & Cavinato, C. (2021b). Evaluation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* growth on pretreated organic solid waste digestate. *Waste Management*, 119, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.047>
- Schädler, T., Neumann-Cip, A. C., Wieland, K., Glöckler, D., Haisch, C., Brück, T., & Weuster-Botz, D. (2020). High-density microalgae cultivation in open thin-layer cascade photobioreactors with water recycling. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/app10113883>
- Singh, J., & Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 2596–2610. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.06.014>
- Sompech, K., Chisti, Y., & Srinophakun, T. (2012). Design of raceway ponds for producing microalgae. *Biofuels*, 3(4), 387–397. <https://doi.org/10.4155/bfs.12.39>
- Sousa, C., de Winter, L., Janssen, M., Vermuë, M. H., & Wijffels, R. H. (2012). Growth of the microalgae *Nannochloris oleoabundans* at high partial oxygen pressures and sub-saturating light intensity. *Bioresource Technology*, 104, 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.048>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stanley, E. H., Short, R. A., Harrison, J. W., Hall, R., & Wiedenfled, R. C. (1990). Variation in nutrient limitation of lotic and lentic algal communities in a Texas (USA) river. *Hydrobiologia*, 206(1), 61–71. <https://doi.org/10.1007/BF00018970>
- Staudt, C., Horn, H., Hempel, D. C., & Neu, T. R. (2004). Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(5), 585–592. <https://doi.org/10.1002/bit.20241>
- Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research*, 45(11), 3351–3358. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.046>
- Sun, J., Nishio, J. N., & Vogelmann, T. C. (1998). Green light drives CO₂ fixation

- deep within leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39(10), 1020–1026.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029298>
- Tan, X., Chu, H., Zhang, Y., Yang, L., Zhao, F., & Zhou, X. (2014). *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch processing wastewater in an airlift circulation photobioreactor. *Bioresource Technology*, 170, 538–548. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.086>
- Toledo-Cervantes, A., Serejo, M. L., Blanco, S., Pérez, R., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2016). Photosynthetic biogas upgrading to bio-methane: Boosting nutrient recovery via biomass productivity control. *Algal Research*, 17, 46–52.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.017>
- Tricolici, O., Bumbac, C., Patroescu, V., & Postolache, C. (2014). Dairy wastewater treatment using an activated sludge-microalgae system at different light intensities. *Water Science and Technology*, 69(8), 1598–1605.
<https://doi.org/10.2166/wst.2013.752>
- Uggetti, E., Sialve, B., Hamelin, J., Bonnafous, A., & Steyer, J. P. (2018). CO₂ addition to increase biomass production and control microalgae species in high rate algal ponds treating wastewater. *Journal of CO₂ Utilization*, 28(October), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.009>
- Uggetti, E., Sialve, B., Latrille, E., & Steyer, J. P. (2014). Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology*, 152, 437–443.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.036>
- Wang, C. Y., Fu, C. C., & Liu, Y. C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.03.004>
- Wang, Li, Chen, Min, Chen, Zhu, & Ruan, R. R. (2010). Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp.* *Bioresource Technology*, 101(8), 2623–2628.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.062>
- Wang, Prasad, & Higgins. (2019). Aerobic bacterial pretreatment to overcome algal growth inhibition on high-strength anaerobic digestates. *Water Research*, 162, 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.011>
- Wang, Q., Hyman, M., & Higgins, B. T. (2021). Factors impacting the effectiveness of biological pretreatment for the alleviation of algal growth inhibition on anaerobic digestate. *Algal Research*, 53(October 2020), 102129.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102129>
- Ward, A. J., Lewis, D. M., & Green, F. B. (2014). Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, 5(1), 204–214.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.001>
- Weissman, J. C., Goebel, R. P., & Benemann, J. R. (1987). Photobioreactor

design: Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 31(4), 336–344. <https://doi.org/10.1002/bit.260310409>

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*, 36(4), 379–381. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.003>

Young, P., Taylor, M., & Fallowfield, H. J. (2017). Mini-review: high rate algal ponds, flexible systems for sustainable wastewater treatment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2282-x>

Zhang, L., Cheng, J., Pei, H., Pan, J., Jiang, L., Hou, Q., & Han, F. (2018). Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. *Renewable Energy*, 115, 276–287. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.08.034>