



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

FACULTAD DE INGENIERIA Y TECNOLOGIA
SEDE CONCEPCION

**FITODEPURACION MIXOTROFICA EN SISTEMAS DE
RECIRCULACION ACUICOLA (RAS): DESEMPEÑO DE UN
COCULTIVO DE MICROALGAS Y BACTERIAS
NITRIFICANTES INMOVILIZADAS EN MATRIZ POLIMERICA**

Tesis para optar al Grado de Magister en Innovación en Biociencias y
Bioingeniería

Profesor Tutor: Dr. Christian Canales V.
Estudiante: **Jorge A. Silva Acosta**

© (Jorge A. Silva Acosta). Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra en cualquier forma, medio o procedimiento sin permiso por escrito del autor.

Concepción, Chile
2021

“Todo ser humano, ahora y en el futuro, debería disponer de suficiente agua limpia para beber y para higiene, y suficiente comida y energía a un costo razonable. Proporcionar agua suficiente para estas necesidades debe conseguirse de una manera equitativa que esté en armonía con la naturaleza. Porque el agua es la base de todos los ecosistemas y hábitats vivos y forma parte de un ciclo hidrológico inmutable que debe respetarse para que el desarrollo de la actividad y bienestar humano sea sostenible”

Comisión Mundial del Agua Siglo XXI

CALIFICACION

En _____, el _____ de _____ de _____, los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante _____, de la carrera de _____ ha aprobado la tesis para optar al título de _____ con una nota de _____.

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

Profesor Evaluador

DEDICATORIA

A MIS PADRES; FUENTE DE ESFUERZO Y DEDICACION.

A MIS HIJOS Y NIETO; FUENTE DE INSPIRACION.

A MONICA MI AMOR; FUENTE DE ENERGIA, PERSEVERANCIA Y ALEGRIA.

A LA VIDA, POR ESTA GRAN OPORTUNIDAD DE CONCRETAR UN SUEÑO.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos y cada uno de los que hicieron posible la realización y adecuada finalización de este trabajo; amigos, colegas, profesores e intuiciones que de alguna u otra forma permitieron, incentivaron, ayudaron y promovieron el desarrollo de este pequeño aporte al conocimiento y desarrollo de la innovación tecnológica.

Con gratitud a:

- Dra. Allisson Astuya. Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción.
- Dr. Christian Canales. Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad San Sebastián.
- Sr. Sergio Rodríguez Leal. Ingeniería y Bionegocios FDM Spa.
- Srta. Estefanía Ramírez, Sr. Gino Henríquez y Sr. Pablo Aranda, equipo de profesionales de Ingeniería y Bionegocios FDM Spa.
- Fundación Copec-UC.
- Mis compañeros del programa de magister promoción 2018; Mariett, Ligia, Carlos, Matías y Felipe.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| INDICE DE FIGURAS..... | ix |
| INDICE DE TABLAS..... | xi |
| RESUMEN..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| CAPITULO 1..... | 1 |
| 1.1 Introducción..... | 1 |
| 1.2 Hipótesis y Objetivos..... | 3 |
| 1.2.1 Hipótesis..... | 3 |
| 1.2.2 Objetivo General..... | 3 |
| 1.2.3 Objetivos Específicos..... | 3 |
| CAPITULO 2. REVISION BBLIOGRAFICA..... | 4 |
| 2.1 Reutilización del Agua en la Acuicultura Intensiva..... | 4 |
| 2.2 Las Microalgas como Fuente de Control de Desechos Orgánicos | 7 |
| 2.3 Consorcios Mixotrófos con Microalgas..... | 13 |
| 2.4 Fitodepuración Mixotrófica (FDM)..... | 15 |
| 2.5 Fitodepuración Mixotrófica en RAS..... | 17 |
| CAPITULO 3. MATERIALES Y METODOLOGIA..... | 19 |
| 3.1 Secuencia Actividades Objetivo Específico N°1..... | 19 |
| 3.1.1 Configuración General de los Fotobiorreactores..... | 20 |
| 3.1.2 Obtención e Inmovilización de Microorganismos en Biomedio..... | 22 |
| 3.1.3 Definición de Rangos de los Factores..... | 22 |
| 3.1.3.1 Mezclamiento..... | 23 |
| 3.1.3.1.1 Flujo Volumétrico de Recirculación..... | 24 |
| 3.1.3.1.2 Flujo Volumétrico de Aireación..... | 24 |
| 3.1.3.2 Irradiancia..... | 25 |
| 3.1.4 Diseño Experimental..... | 25 |
| 3.1.5 Sustrato (RIL)..... | 26 |
| 3.1.6 Experimentación Preliminar..... | 26 |
| 3.1.7 Análisis de Muestras..... | 27 |
| 3.1.8 Estimaciones, Tratamiento y Análisis de Datos..... | 27 |
| 3.2 Secuencia Actividades Objetivo Específico N°2..... | 29 |
| 3.2.1 Preparación Fotobiorreactor en RAS..... | 29 |
| 3.2.2 Ensayo Preliminar..... | 32 |
| 3.2.3 Diseño Experimental..... | 33 |
| 3.2.4 Estimaciones, Tratamiento y Análisis de Datos..... | 33 |
| CAPITULO 4. RESULTADOS..... | 35 |
| 4.1 Objetivo A..... | 35 |
| 4.1.1 Definición de Tiempo Máximo Para Ensayos..... | 35 |
| 4.1.2 Estabilidad del RIL Almacenado y Utilizado como Sustrato en los Ensayos..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 4.1.3 Concentración, Remoción y Tasa de Depuración de Amonio en Fotobiorreactor Batch Recirculado..... | 36 |
| 4.1.4 Concentración, Remoción y Tasa de Depuración de Fosfato en Fotobiorreactor Tipo Batch..... | 42 |
| 4.1.5 Concentración, Remoción y Tasa de Depuración de Nitrato en Fotobiorreactor Tipo Batch..... | 46 |
| 4.2 Objetivo B..... | 52 |
| 4.2.1 Ensayo Preliminar..... | 52 |
| 4.2.2 Concentración de Nutrientes en Fotobiorreactor Continuo... | 52 |
| 4.2.3 Eficiencia y Tasa de Remoción de Nutrientes en Fotobiorreactor Continuo..... | 55 |
| CAPITULO 5. DISCUSION DE RESULTADOS..... | 60 |
| 5.1 Depuración de Nutrientes en Sistema Batch Recirculado..... | 60 |
| 5.2 Depuración de Nutrientes en Sistema Continuo..... | 65 |
| CAPITULO 6. CONCLUSIONES..... | 69 |
| REFERENCIAS..... | 70 |
| ANEXOS..... | 87 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo de un sistema de recirculación acuícola (RAS)..... | 5 |
| Figura 2. Modelo mixotrófico. | 16 |
| Figura 3. Flujograma de actividades realizadas en el marco del objetivo específico A..... | 19 |
| Figura 4. Esquema general del sistema de fotobiorreactores en condición batch recirculado. | 21 |
| Figura 5. Sistema de fotobiorreactores en condición batch recirculado.. | 21 |
| Figura 6. Flujograma de actividades realizadas en el marco del objetivo específico B..... | 29 |
| Figura 7. Esquema general del sistema de fotobiorreactores en modo continuo en línea RAS de cultivo de salmónidos..... | 31 |
| Figura 8. Esquema general del sistema de fotobiorreactores a) elevación frontal, b) elevación lateral..... | 31 |
| Figura 9. Sistema de fotobiorreactores en modo continuo en línea RAS de cultivo de salmónidos. | 32 |
| Figura 10. Variación de la concentración de a) amonio y fosfato, b) nitrato en el tiempo. | 35 |
| Figura 11. Variación de la concentración de nutrientes en el RIL de almacenamiento utilizado durante la serie de ensayos. | 36 |
| Figura 12. Variación de la concentración de amonio en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado, a) 500 Lx, b) 15.250 Lx y c) 30.000 Lx..... | 37 |
| Figura 13. Remoción global de amonio en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado. | 39 |
| Figura 14. Estimación a través de regresión lineal de las tasas de remoción de amonio en RIL sometido a diversa condiciones de mixotrófica en reactor tipo batch. | 40 |
| Figura 15. Tasa de remoción de amonio en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado. | 41 |
| Figura 16. Variación de la concentración de fosfato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado, a) 500 Lx, b) 15.250 Lx y c) 30.000 Lx. | 43 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Remoción global de fosfato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado. | 44 |
| Figura 18. Estimación a través de regresión lineal de las tasas de remoción de fosfato en RIL sometido a diversa condiciones de mixotrófica en reactor tipo batch..... | 45 |
| Figura 19. Tasa de remoción de fosfato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado. | 46 |
| Figura 20. Variación de la concentración de nitrato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado, a) 500 Lx, b) 15.250 Lx y c) 30.000 Lx..... | 48 |
| Figura 21. Remoción global de nitrato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado..... | 49 |
| Figura 22. Estimación a través de regresión lineal de las tasas de remoción de nitrato en RIL sometido a diversa condiciones de mixotrófica en reactor tipo batch. | 50 |
| Figura 23. Tasa de remoción de nitrato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado..... | 51 |
| Figura 24. Variación de la concentración de amonio en fotobiorreactor continuo en 48 horas de funcionamiento..... | 52 |
| Figura 25. Variación de la concentración de amonio en fotobiorreactor continuo en 29 horas de funcionamiento..... | 53 |
| Figura 26. Variación de la concentración de nitrato en fotobiorreactor continuo en 29 horas de funcionamiento..... | 54 |
| Figura 27. Variación de la concentración de fosfato en fotobiorreactor continuo en 29 horas de funcionamiento..... | 55 |
| Figura 28. Variación de la concentración de nutrientes en fotobiorreactor continuo, a) amonio, b) nitrato y c) fosfato..... | 56 |
| Figura 29. Remoción de nutrientes (PTR) en fotobiorreactor continuo... | 57 |
| Figura 30. Tasa de remoción de nutrientes en fotobiorreactor continuo.. | 58 |
| Figura 31. Tasa superficial de remoción de nutrientes (STR) en fotobiorreactor continuo..... | 58 |
| Figura 32. Tasa volumétrica de remoción de nutrientes (VTR) en fotobiorreactor continuo..... | 59 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Tasas de retención y excreción de nitrógeno y fósforo expresado como porcentaje (%) del alimento consumido..... | 9 |
| Tabla 2. Rango de los factores operacionales analizados..... | 25 |
| Tabla 3. Combinatoria los factores..... | 26 |
| Tabla 4. Parámetros dimensionales y operacionales de los reactores... | 30 |
| Tabla 5. Remoción global promedio de amonio en tres niveles de irradiancia (Lx) y dos de mezclamiento (Re_M)..... | 38 |
| Tabla 6. Tasas de remoción de nutrientes en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclamiento en cinco horas de funcionamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado..... | 40 |
| Tabla 7. Remoción global promedio de fosfato en tres niveles de irradiancia (Lx) y dos de mezclamiento (Re_M)..... | 42 |
| Tabla 8. Remoción global promedio de fosfato en tres niveles de irradiancia (Lx) y dos de mezclamiento (Re_M)..... | 47 |
| Tabla 9. Tasas superficiales y volumétricas de remoción de nutrientes.. | 59 |
| Tabla 10. Resumen de indicadores de remoción de nutrientes en fotobiorreactor en batch..... | 64 |
| Tabla 11. Remociones de nutrientes contaminantes informadas en mono y cocultivo inmovilizado de microalgas y bacteria en sistema continuo..... | 67 |

RESUMEN

La acuicultura industrial ha crecido rápidamente debido al aumento en la demanda mundial de pescados y mariscos. Sin embargo en los sistemas acuícolas que mantienen altos niveles de productividad, tiende a generar mayor inestabilidad ecológica; aproximadamente el 75% del alimento excretado en acuicultura intensiva, se elimina en forma de nitrógeno y fósforo que es vertido a cuerpos de agua. Por ello se han realizado esfuerzos de investigación tendiente a eliminar estos nutrientes-contaminantes, evitando la eutrofización además de promover la reutilización del agua en sistemas de acuicultura intensiva (RAS). Para el control de los nutrientes, se utilizan biofiltros de bacterias aerobias que favorecen el proceso de nitrificación. A pesar de las ventajas que los biofiltros representan, inconvenientes como la disminución en la concentración de oxígeno, acumulación de materia orgánica y dificultad de retroenjuague, entre otros. Por otra parte es conocido que plantas acuáticas, macro y microalgas eliminan con eficacia nutrientes-contaminantes (fitodepuración), consumiendo además carbono, nitrógeno y fosforo; condición no atribuible a los biofiltros nitrificantes. Dado lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la capacidad de depuración de un cocultivo de microalgas y bacterias nitrificantes aisladas de un cultivo de salmónidos e inmovilizadas en matriz polimérica, instaladas en fotobiorreactores del tipo batch recirculado y continuo, este último como parte de un RAS para cultivo de salmónidos. Los resultados muestran que el cultivo mixto es capaz de remover simultáneamente amonio, total del amonio nitrogenado (TAN), nitrato y fosfato desde un RIL acuícola. Además se logró definir que el factor irradiancia posee un mayor efecto en el abatimiento de nutrientes respecto al mezclamiento, cuando se utiliza un sistema batch. Así mismo el cocultivo instalado en un fotobiorreactor continuo logra remover; amonio, TAN, nitrato y fosfato a una tasa aproximada de 8,8 ; 8,9 ; 14 y 6,4 mg L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, valores entre un 84,6% y un 97,6% superiores a lo informado por otras iniciativas mixotróficas experimentales. Por otra parte el sistema evaluado fue capaz de remover diariamente el TAN, a un promedio de 0,8 gramos por cada m² de biomedio y 1,7 kilogramos por cada m³ biomedio, lo que representa un 85% y 100% más, respectivamente, de lo depurado por biofiltros nitrificantes utilizados en acuicultura.

Palabras claves: RAS; Biofiltro nitrificante; Fotobiorreactor; Mixotrofia; RIL

ABSTRACT

Industrial aquaculture has grown rapidly due to the increase in world demand for fish and seafood. However, in aquaculture systems that maintain high levels of productivity, it tends to generate greater ecological instability; approximately 75% of the feed excreted in intensive aquaculture is eliminated in the form of nitrogen and phosphorus that is discharged into water bodies. For this reason, research efforts have been made to eliminate these nutrient-pollutants, avoiding eutrophication and promoting water reuse in intensive aquaculture systems (IAS). For nutrient control, aerobic bacterial biofilters are used to promote the nitrification process. Despite the advantages of biofilters, there are disadvantages such as the decrease in oxygen concentration, accumulation of organic matter and difficulty of backflushing, among others. On the other hand, it is known that aquatic plants, macro and microalgae effectively eliminate nutrients-pollutants (phytodepuration), also consuming carbon, nitrogen and phosphorus; a condition not attributable to nitrifying biofilters. Given the above, the present study aimed to determine the depuration capacity of a co-culture of microalgae and nitrifying bacteria isolated from a salmonid culture and immobilized in a polymeric matrix, installed in recirculated and continuous batch bioreactors, the latter as part of a RAS for salmonid culture. The results show that the mixed culture is capable of simultaneously removing ammonium, total ammonium nitrogen (TAN), nitrate and phosphate from an aquaculture RIL. It was also possible to define that the irradiance factor has a greater effect on nutrient removal than mixing, when a batch system is used. Likewise, the co-culture installed in a continuous photobioreactor was able to remove ammonium, TAN, nitrate and phosphate at a rate of approximately 8.8, 8.9, 14 and 6.4 mg L⁻¹ h⁻¹, respectively, values between 84.6% and 97.6% higher than those reported by other experimental mixotrophic initiatives. Moreover, the system evaluated was able to remove TAN daily, at an average of 0.8 grams per m² of biomedium and 1.7 kilograms per m³ biomedium, which represents 85% and 100% more, respectively, than that treated by nitrifying biofilters used in aquaculture.

Key words: RAS; Nitrifying biofilter; Photobioreactor; Mixotrophy; RIL.

CAPITULO 1

1.1 INTRODUCCION

La acuicultura en el mundo es una industria que ha crecido rápidamente debido a un aumento significativo en la demanda mundial de pescados y mariscos, resultado proporcional al crecimiento demográfico poblacional que predice un total de 8.100 millones de personas para el 2025 (ONU 2014) y 9.700 millones para el 2050 (ONU 2019). A fines del 2018, el total de recursos hidrobiológicos cosechados por acuicultura ascendió a 114,6 millones de toneladas de peso vivo, con un valor estimado de venta de US\$263,6 mil millones de dólares (FAO 2020). Situando a la acuicultura dentro de las más dinámicas actividades proveedoras de proteína a nivel mundial, no obstante, es importante considerar que como los sistemas acuícolas mantienen un alto nivel de productividad, requiriendo aportes externos de energía, tienden a generar una mayor inestabilidad ecológica y, por tanto, pueden ser más fácilmente perturbados que los ecosistemas naturales (FAO 1983). Entre los aportes de energía externos requeridos se encuentra la demanda de agua, oxígeno, alimento, antibióticos, electricidad (Bartolli et al. 2005), y compuestos utilizados para la estabilización fisicoquímica del agua. Aproximadamente el 75% del alimento excretado en acuicultura se elimina en forma de nitrógeno y fósforo. El nitrógeno se libera al medio acuoso en forma de amonio (NH_4^+), nitrógeno orgánico o incluso nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), mientras que el fósforo se encuentra en forma de fosfatos (PO_4^{3-}) (Crab et al. 2007). Dauda et al. (2019) indican como ejemplo, que los desechos generados por el cultivo de peces en Japón, independientemente de la especie, es tan alta que una tonelada de peces genera en promedio 0,8 kg de nitrógeno y 0,1 kg de fósforo. Así, el cultivo de peces no puede ser considerado sostenible, sino todo lo contrario, un cultivo que deteriora los ambientes dulceacuícolas.

Por otra parte, la acuicultura intensiva, específicamente el cultivo de peces, se encuentra en un continuo proceso de cambio tecnológico. Este proceso se debe entre otros, al agotamiento de recursos hidrobiológicos, a un mercado consumidor cada vez más exigente y empoderado respecto al cuidado del

medio ambiente, privilegiando producto que respeten el entorno en donde se desarrolla la actividad de cultivo. A lo anterior se agrega el cambio climático, manifestado en el aumento de la temperatura, escasas hídrica y modificación del entorno natural. Todas estas forzantes generan la necesidad de dar respuesta rápida y efectiva, generando conocimiento y desarrollo tecnológico acorde.

La fitodepuración mixotrófica planteada a manera de cocultivo de microorganismos inmovilizados en matriz polimérica, podría ser utilizada como un eficiente sistema de tratamiento de aguas residuales de RAS. Los antecedentes recopilados plantean una serie de virtudes como la integración de varios procesos unitarios, la producción de biomasa valorizada, disminución del impacto ambiental y generación de economía circular a partir de los desechos orgánicos. No obstante, y a pesar que varios estudios se han aplicado exitosamente consorcios de microalgas y bacterias en la eliminación de nutrientes de diferentes flujos de aguas residuales, se requiere más investigación en este campo para la optimización de los parámetros de cultivo en unidades a gran escala y el desarrollo de modelos matemáticos confiables que describan correctamente y predigan el comportamiento de estos consorcios en determinados sistemas y condiciones operativas. Es en dicha perspectiva y dada las bondades de los procesos mixotróficos descrito, que surgen interrogantes como la viabilidad de utilizar un cocultivo inmovilizado de bacterias y microalgas nativas de un sistema de cultivo de peces, como método de abatimiento de nitrógeno y fosfato o qué nivel de eficiencia depurativa alcanzara un cocultivo, en términos de la transformación de la materia nitrogenada y fosfatada de RILes acuícola. Por lo anterior, la finalidad de la presente apunta a incrementar el conocimiento en los procesos de depuración de RILes acuícolas y su reutilización utilizando para ello un cocultivo inmovilizado en matriz polimérica de microalgas y bacterias nitrificantes aisladas de un cultivo de salmónidos.

Por otra parte, como resultado del trabajo realizado en el marco del proyecto de tesis del año 2020, se publicó un artículo de revisión en la revista Aqua Technica Vol.3 Num. 1 (2021) que se incorpora en el anexo B.

1.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 HIPOTESIS

“La actividad de la Microalga *Tetrademus dimorphus* (Turpin) (Wynne & Hallan 2016) y Bacterias Nitrificantes en cocultivo, permite la remoción simultanea de la materia nitrogenada y fosfatada de un RIL acuícola, permitiendo su reutilización conforme a los requerimientos de un cultivo de peces salmónidos”

1.2.2 OBJETIVO GENERAL

“Determinar la capacidad de depuración de un cocultivo de Microalgas *Tetrademus dimorphus* (Turpin) (Wynne & Hallan 2016) y Bacterias Nitrificantes aisladas de un cultivo de salmónidos e inmovilizadas en matriz polimérica”

1.2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- A. Evaluar el efecto de la irradiancia y mezclamiento provocado por caudal de RIL y flujo de aire, en la remoción de nutrientes de un cocultivo de microalgas y bacterias nitrificantes operado en formato batch recirculado.
- B. Estimar la capacidad de remoción de nutrientes de un cocultivo de microalgas y bacterias nitrificantes inmovilizadas en matriz polimérica en un fotobiorreactor continuo.

CAPITULO 2

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 REUTILIZACION DEL AGUA EN LA ACUICULTURA INTENSIVA

Durante las últimas décadas del siglo pasado, se han realizado importantes esfuerzos para eliminar estos nutrientes de las aguas residuales domésticas (Diniz et al. 2017) y de acuicultura para obtener una calidad de efluente satisfactoria, que no dé lugar a la eutrofización de ecosistemas naturales receptores o que permita el reciclaje de agua (Crab et al. 2007), abriendo paso al diseño e implementación de técnicas de reutilización intensiva de agua, denominadas sistemas de recirculación acuícola (RAS, por sus siglas en inglés: Recirculation Aquaculture Systems).

Los RAS interrelacionan un conjunto de procesos unitarios y componentes que se utilizan para la mantención de organismos acuáticos en cautiverio, donde el agua es continuamente tratada y re-utilizada, presentando como ventaja el uso racional del agua, ya que el volumen de recambio es menor al utilizado en sistemas abiertos de acuicultura, (Jimenez et al. 2012; Dauda et al. 2019). Así mismo, y de acuerdo con Pedersen et al. (2008), los RAS tienen el potencial de reducir los impactos ambientales de la acuicultura en comparación con los sistemas de flujo abierto, tradicionalmente utilizados, los cuales requieren en promedio 30 m³ de agua nueva al año por cada kilogramo de trucha cultivada, mientras que los RAS, dependiendo sus nivel de intensidad, fluctúan entre 0,3 y 3 m³ kg_{pez}⁻¹ año⁻¹ y el grado de recirculación fluctúa entre 95,9 y 99,6% del volumen reciclado por hora (Bregnaballe et al. 2015). Asimismo, los desechos del proceso de cultivo pueden ser manejados de mejor manera, disminuyendo el impacto sobre los cuerpos receptores de las aguas residuales. Así, los gases y sólidos suspendidos, producto del proceso metabólico del cultivo, son extraídos durante el proceso de recirculación. El oxígeno consumido también se incorpora al sistema manteniéndose el balance de nutrientes que favorece el crecimiento y

desarrollo de los organismos objeto, además de mayores densidades en los sistemas de cultivo (fig. 1).



Figura 1. Ciclo de un sistema de recirculación acuícola (RAS).

La implementación de un RAS implica necesariamente el monitoreo y manejo de los parámetros fisicoquímicos del agua, permitiendo con ello que los organismos cultivados presenten mejores tasas de crecimiento, sobrevivencia y conversión alimentaria (Jiménez, et al. 2012; Midilli et al. 2012). No obstante, estas mejoras solo se cumplen si el proceso de depuración del agua es completo, de lo contrario la presencia de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato), que van acumulándose provocan; toxicidad, disminución del tamaño corporal, aumento de la mortalidad, comportamientos anormales y deformidades esqueléticas en peces (Davidson et al. 2011-2014; Martins et al. 2009; Van Bussel et al. 2012). Una solución a este problema sería utilizar elevadas tasas de recambio de agua por masa de alimento suministrado, aumentando con ello la corriente de desechos que se libera al ambiente. Sin embargo, esto es una solución insostenible, considerando la escasez del recurso hídrico y las limitaciones que se visualizan para el uso de agua dulce en el futuro

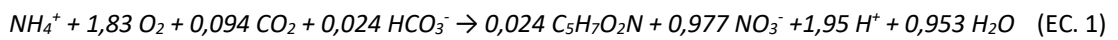
En este contexto, la manera más efectiva para evitar los efectos indeseados asociados a la liberación de aguas residuales y disminuir la demanda de agua de recambio es controlar mediante sistemas de tratamiento los nutrientes residuales que se acumulan en el RAS. Por este motivo, el tratamiento biológico de nitrificación “Biofiltros nitrificadores”, ha sido el método más factible en la reutilización del agua. Este proceso consiste en un sistema de filtración biológica instalado en la línea de agua recirculada (fig.1), en el que se mantienen bacterias aerobias que favorecen el proceso de nitrificación, nitración y, opcionalmente, anaerobias para el proceso de desnitrificación (Van Rijn 2013). Estas bacterias utilizan NH_4^+ como fuente energía, además de metabolizar y convertir el nitrógeno a formas menos tóxico o gaseoso, con lo que se disminuye la acumulación de nutrientes residuales de los compuestos nitrogenados. No obstante, el metabolismo de los peces también produce otros nutrientes residuales como fosfato (Dauda et al. 2019), que no son convertidos por los biofiltros nitrificadores, por lo tanto, se acumulan en el RAS y sólo son controlados por dilución en cada recambio de agua.

Las bacterias nitrificantes son principalmente autótrofos obligados, que utilizan dióxido de carbono como fuente primaria de carbono, por ello requieren oxígeno para crecer (Hagopian y Riley 1998). Los principales factores que afectan la nitrificación son la concentración de amoníaco-nitrógeno y nitrito-nitrógeno, la relación carbono/nitrógeno, la concentración de oxígeno disuelto, el pH y la temperatura.

En el proceso de nitrificación que se representa con la ecuación 1, se consume una significativa cantidad de oxígeno y compuestos basificantes como CaCO_3 (7,05 g/g N) y se producen gran cantidad de dióxido de carbono (5,85 g CO_2 /g TAN¹) Ebeling et al. (2009). Para el agua con baja alcalinidad inicial, esto puede ser un problema significativo, ya que requeriría de la adición de compuestos basificantes en forma de bicarbonato de sodio, cal o hidróxido de sodio para mantener una concentración entre 100 a 150 mg/L como CaCO_3 ,

¹ En agua, el amoníaco existe en dos formas: amoníaco no ionizado, NH_3 , y amonio ionizado, NH_4^+ . La concentración relativa de cada una de estas formas está en función del pH, temperatura y salinidad (Anthonisen et al., 1976). La suma de NH_4^+ y NH_3 , generalmente se define como total amonio nitrogenado (TAN) o simplemente amoníaco (Ebeling et al. 2006).

adecuada especialmente para RAS (Timmons et al. 2009; Bregnballe 2015; Summerfelt et al. 2015; Boyd et al. 2016).



Además de los biofiltros nitrificadores, se han reportado otros métodos como ósmosis inversa y tecnología electroquímica para el control de las concentraciones de nutrientes (Qin et al. 2005; Gupta et al. 2015). No obstante, su alto requerimiento de energía es un inconveniente, aumentando tanto en los costos operativos como en los posibles impactos por el uso de combustibles fósiles. Adicionalmente, se han utilizado sistemas de humedales e hidropónicos de plantas superiores a modo de control de aguas residuales acuícolas (Sindilariu et al. 2008; Vymazal 2009; Goddek et al. 2018).

A pesar de las ventajas antes mencionadas, los biofiltros nitrificantes presentan inconvenientes que incluyen; disminución en la concentración de oxígeno disuelto, aporte de CO₂, consumo de alcalinidad, dificultad de retroenjuague, acumulación de materia orgánica y reservorio de microorganismos no deseados. Las bacterias ocupadas en los biofiltros actuales son selectivas y pueden disminuir la concentración de un residuo específico a la vez por reactor, teniendo que aumentar el tamaño de la planta de tratamiento y la energía requerida para depurar otros compuestos presentes en el agua residual (Mook et al. 2012).

2.2 LAS MICROALGAS COMO FUENTE DE CONTROL DE DESECHOS ORGANICOS

La FAO define a las aguas residuales como aquellas que no tienen valor inmediato para el fin para el que se utilizó ni para el propósito para el que se produjo debido a su calidad, cantidad o al momento en que se dispone de ella². No obstante, las aguas residuales de un usuario pueden servir de suministro para otro usuario en otro lugar. Por lo general, las aguas residuales

² Food and Agriculture Organization of the United Nations, [AQUASTAT Web Site](#)

pueden contener grandes cantidades de desechos orgánicos e inorgánicos metabolizables por microorganismos heterótrofos demandantes de oxígeno (DBO), organismos patógenos, nutrientes como nitrógeno y fósforo, compuestos inorgánicos y sedimentos (Sonune & Ghate 2004) y difieren su composición según fuente de origen, fluctuando entre < 1 mg/l a más de 650 mg/l de NH₄-N (Timmons et al. 2009; De Godos et al. 2009; González-Fernández et al. 2011).

Una alternativa para manejar y controlar los nutrientes de desecho, es utilizar organismos que consuman nutrientes producidos en los procesos de acuicultura. En ese contexto, es conocido que las plantas acuáticas, macro y microalgas eliminan con eficacia una variedad de nutrientes-contaminantes (Apandi et al. 2018), tales como nitrógeno, fosfato, carbonos orgánicos, ácidos volátiles grasos, compuestos farmacéuticos, colorantes textiles, y metales pesados (Wang et al. 2016), convirtiéndolas en una posibilidad real para la eliminación de nutrientes del agua residual urbana (Bashan & Bashan 2010; Calicioglu & Demirer 2017), industrial (Bordel et al. 2009; Wu et al. 2017) y agrícola (Markou & Georgakakis 2011; Jayakumar et al. 2017). Algunas de las especies estudiadas pertenecen a los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Tetraselmis*, *Dunaliella*, *Tribonema*, *Ascochloris*, *Desmodesmus*, *Chalymondomonas*, *Coelastrum*, *Parachlorella* y *Asterarcys*, con especies que pueden utilizar en su crecimiento diferentes compuestos de nitrógeno tales como amonio, nitrato o urea, además de fósforo (Ruiz 2011; Ayesha et al. 2020). En los efluentes de acuicultura, los elementos que pueden servir como nutrientes para las microalgas están relacionados con la alimentación de la especie en cultivo, siendo el nitrógeno y el fósforo los de mayor incidencia. Estos elementos se presentan en forma semisólida (heces fecales) y disuelta (orina). Piedrahita (2003) indica que los excrementos fecales de los peces contienen entre 3,6% – 35% N y 15% – 70% P, mientras que la cantidad de N y P, como productos excretados sería de 37% – 72% y 1% – 62%, respectivamente (tabla 1). Por otro lado, Lin et al. (2002) y Guo et al. (2013) plantean que los rangos de nutrientes pueden fluctuar en términos de concentración entre 0,12-14,7 mg/L de NH₄⁺, 0,02-1,5 mg/L de NO₂⁻, 0,01-5,3 mg/L de NO₃⁻ y 3,1-17,7 mg/L de PO₄³⁻. Así mismo, las aguas residuales de

la acuicultura contienen relativamente pocos microorganismos patógenos (Abdel-Raouf et al. 2012), haciéndola adecuada como medio de cultivo para las microalgas. No obstante, aún se requieren estudios detallados del impacto de los factores bióticos y abióticos en las microalgas para alcanzar el potencial completo como sistema de depuración (Ayesha et al. 2020).

Tabla 1. Tasas de retención y excreción de nitrógeno y fósforo expresado como porcentaje (%) del alimento consumido (Piedrahita 2003; Dauda et al. 2019).

| Retenido como tejidos | | No digerido en heces fecales (partícula) | | Excretado (forma disuelta) | | Especie | Referencia |
|-----------------------|-------|--|-------|----------------------------|-------|---------------------------|--|
| N | P | N | P | N | P | | |
| 49 | 36 | 14 | 55 | 37 | 9 | <i>Salmón Atlántico</i> | Johnsen et al. (1993); Bergheim & Asgard (1996). |
| | 17-19 | | 48-54 | | 28-34 | <i>Salmón Atlántico</i> | Holby & Hall (1994). |
| 11 | 32 | | | | | <i>Carpa</i> | Avnimelech & Lacher (1979). |
| 27 | 30 | | | | | <i>Bagre de Canal</i> | Boyd (1985). |
| 10 | 40 | 35 | 15 | 55 | 45 | <i>Lubina</i> | Lemarie et al. (1998). |
| 30 | | 10 | | 60 | | <i>Besugo</i> | Porter et al. (1987). |
| 19-26 | | | | | | <i>Besugo</i> | Krom et al. (1995). |
| 30 | | 13 | | 57 | | <i>Trucha arcoiris</i> | Beveridge et al. (1991) |
| 25 | 30 | 15 | 70 | 60 | 0 | <i>Trucha arcoiris</i> | Hakanson (1988); Pillay (1992) |
| 21-22 | 18,8 | 3,6-5,4 | 19-22 | 59-72 | 60-62 | <i>Híbrido de tilapia</i> | Siddiqui & Al-Harbi (1999). |

Los principales nutrientes requeridos para el crecimiento de microalgas son el carbono, nitrógeno y fósforo. Gonçalves et al. (2017) indica que, dado que las aguas residuales presentan concentraciones considerables de estos nutrientes, varios estudios han reportado el potencial de crecimiento de microalgas en aguas residuales de diferentes fuentes, tanto domésticas, como agrícolas e industriales. Dichos estudios han revelado que el uso de aguas residuales para el cultivo de microalgas promueve un tratamiento eficaz de

estas aguas; las eficiencias reportadas sobre la eliminación de nitrógeno y fósforo alcanzan a 60 – 99% y 54 – 95%, respectivamente. Simultáneamente, contribuyen a la producción de biomasa de microalgas a costos reducidos, con menores impactos ambientales ya que no se requiere suministro de nutrientes (Boelee et al. 2011; Park et al. 2011; Silva-Benavides & Torzillo 2012). El cultivo de microalgas en aguas residuales atrae, además, la atención de los investigadores, puesto que a largo plazo el uso de fertilizantes sintéticos como fuente de nutrientes se volverá insostenible. Sin embargo, hasta ahora sólo alrededor del 30% de los trabajos publicados se refieren al uso de aguas residuales como medio nutricional para las microalgas, mientras que el 70% restante plantea el uso de fertilizantes sintéticos como fuente de nutrientes para el cultivo de las microalgas (Gonçalves et al. 2017).

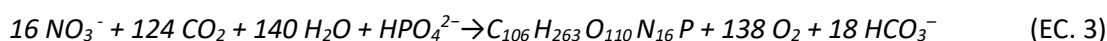
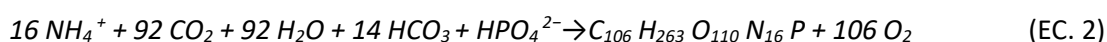
Por otra parte Xifan et al. (2020), concluyen sobre la importancia de las microalgas para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales de acuicultura, ya que estas pueden, además de disminuir la concentración de N y P, producir biomasa para la alimentación acuícola (Rawat et al. 2011) y con ello aportar al círculo virtuoso de la economía circular³.

Sin embargo, una de las limitaciones del uso de microalgas para el tratamiento de aguas en acuicultura es el volumen necesario de los reactores, requiriéndose vastas extensiones de terreno como es el caso de lagunas de estabilización, o sistemas de lagunaje de alta carga “HRAP”. En dicha perspectiva, Pagand et al. (2001) determinaron que se requiere, en la mejor de las condiciones operativas, 150 m² de laguna para tratar los residuos producidos por el cultivo intensivo de 1 ton de *Dicentrarchus labrax*. Así mismo, estos sistemas que son planteados como canales de poca profundidad, que poseen sistemas mecánicos de mezclado, dificultan y aumentan el costo de la separación de la biomasa generada del agua depurada (Olguín 2003; Molazadeh et al. 2019). Por otro lado, para una efectiva eliminación de nutrientes son necesarias altas productividades de biomasa fotosintética, así como la selección de microalgas que soporten las

³ <https://economipedia.com/definiciones/economia-circular.html>

condiciones del medio y los posibles contaminantes (Ruiz 2011). El uso exclusivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales presenta problemas de olor, prolongados tiempo de retención hidráulica y limitada transmisión de luz (De Pauw & Van Vaerenbergh 1983).

Los procesos de tratamiento que utilizan organismos fotoautótrofos pueden ser representados como muestran las siguientes relaciones estequiométricas (Stumm 2012), donde las fuentes de nitrógeno pueden ser $\text{NH}_4^+\text{-N}$ o nitrato, ecuaciones 2 y 3 respectivamente. $\text{C}_{106} \text{H}_{263} \text{O}_{110} \text{N}_{16} \text{P}$ representa la fórmula química para las microalgas (Ebeling et al. 2006).



Según lo anterior, y considerando que las microalgas metabolizan 1 g de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, se consume 3,13 g Alk/g de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y 4,02 g Alk / g de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, respectivamente. Así también, por cada gramo de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ convertido en biomasa de algas, se consumen 18,07 g CO_2 / g $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y se usan 24,4 g CO_2 / g $\text{NO}_3^-\text{-N}$. De manera correspondiente, se producen 15,14 y 19,7 g de O_2 , respectivamente, por gramo de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y por gramo de $\text{NO}_3^-\text{-N}$. Finalmente, se genera una cantidad importante de biomasa microalgal, 15,85 g por gramo de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ o por cada gramo de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ metabolizado. Cabe destacar que el mayor consumo de carbono inorgánico que utilizan las microalgas corresponde a la fuente de CO_2 y alcalinidad, con 4,93 y 0,75 g, respectivamente (Ebeling et al. 2006).

Por otra parte, la eliminación de P se puede realizar mediante un proceso mejorado de eliminación de fósforo biológico utilizando organismos acumuladores de polifosfato bajo condiciones anaerobias-aerobias (Cokro et al. 2017). Sin embargo, Hernández-García, et al. (2019) lograron la eliminación del 82% de NH_4^+ y 43% de ortofosfato de una mezcla de aguas residuales y lixiviados, que contenía 167 mg/L de NH_4^+ y 23 mg/L de PO_4^{3-} , empleando tan sólo la especie de microalga *Desmodesmus spp.*

El cultivo de microalgas para tratamiento de aguas residuales se puede realizar en sistemas de células suspendidas o inmovilizadas (Gómez–Serrano et al. 2015; Hoffman 1998), siendo el más común el suspendido (Pires et al. 2013). No obstante, la desventaja de utilizar algas en suspensión es la contaminación secundaria causada por la reinoculación entre cosechas, esto puede representar entre 60 a 90% de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del efluente (Shengbing & Gang 2010).

Para superar los problemas asociados a la recolección de microalgas que requiere mucho tiempo y energía, se han reportado sistemas de cultivo basados en la inmovilización celular (Pires et al. 2013; Shengbing & Gang 2010). Según Tampion y Tampion (1987), una célula inmovilizada consiste en una célula que, por medio de técnicas naturales o artificiales, no puede desplazarse independientemente de sus vecinos. La inmovilización natural o pasiva se produce a través de la capacidad innata de las células de microalgas para adherirse a una superficie específica, lo que resulta en la formación de una biopelícula (Gonçalves et al. 2017). Los métodos más comúnmente utilizados para la inmovilización de microalgas incluyen el encapsulamiento de células en una matriz polimérica, como alginato y carragenano, entre otros, como así también la adhesión celular con formación de biopelícula en una superficie sólida (Mallick 2002; Eroglu et al. 2015; Hameed & Ebrahim 2007; Christenson & Sims 2011). No obstante, los altos costos asociados a la matriz de inmovilización pueden ser un factor limitante cuando el objetivo es procesar grandes cantidades de aguas residuales (Gonçalves et al. 2017).

El crecimiento de microalgas puede ser influenciado por varios factores, tanto bióticos como abióticos. Los bióticos incluyen la presencia de patógenos, como bacterias, hongos y virus, y la competencia interespecífica, mientras que los factores abióticos incluyen la luz (calidad y cantidad), la temperatura, pH, salinidad, perfiles cualitativos y cuantitativos de nutrientes, concentración de oxígeno disuelto y la presencia de compuestos tóxicos. Además, el crecimiento de la microalga puede verse afectado por las condiciones operativas, como el tiempo de residencia hidráulica, la tasa de recolección, la

transferencia de gas y la mezcla, ya que estos parámetros controlan la disponibilidad de CO₂, las tasas de corte y la exposición a la luz (Yen et al. 2013; Kumar et al. 2010).

2.3 CONSORCIOS MIXOTROFOS CON MICROALGAS

Aunque las microalgas se han aplicado con éxito en la eliminación de nutrientes de diferentes aguas residuales, resulta complejo mantener un monocultivo de microalgas en estos bioprocesos. En consecuencia, varios estudios reportan las ventajas del uso de consorcios de microalgas en cultivo (Muñoz & Guieysse 2006; Subashchandrabose et al. 2011; González-Fernández et al. 2011; He et al. 2013; Wilkie & Mulbry 2002). Estos consorcios pueden ocurrir naturalmente en el medio ambiente o ser generados artificialmente, por combinación de microorganismos que no necesariamente coexisten, para un propósito específico.

Entre las diferentes posibilidades de consorcios que se pueden establecer, las más utilizadas para el tratamiento de aguas residuales incluyen los consorcios de microalgas, que están constituidos exclusivamente por microorganismos fotosintéticos (eucariotas y/o procarióticos), y los consorcios de microalgas y bacterias, que están constituidos por microorganismos fotosintéticos y bacterias heterótrofas (Gonçalves et al. 2017). Las especies de microalgas y bacterias que forman el consorcio pueden presentar interacciones, tanto competitivas como cooperativas, las cuales han sido ampliamente reportadas (Muñoz et al. 2005; Unnithan et al., 2014; Fukami et al., 1997, Natrah et al., 2014). Varios estudios han reportado que la excreción de metabolitos de microalgas presenta un efecto bactericida, afectando el crecimiento bacteriano (Natrah et al. 2014; Kellam & Walker 1989; Najdenski et al. 2013). Por otro lado, también se ha reportado que las microalgas pueden servir como un hábitat para las bacterias, protegiéndolas de condiciones ambientales adversas, mejorando el crecimiento bacteriano a través de la liberación de metabolitos extracelulares (Unnithan et al. 2014). Mandal et al. (2011) han demostrado que las sustancias poliméricas extracelulares producidas por la microalga *Amphidinium carterae* estimulan el crecimiento de *Bacillus pumilus*.

Se sabe que al aumentar el crecimiento de microalgas, también aumentan las tasas de absorción de nutrientes. El estudio realizado por De-Bashan et al. (2002 y 2004), donde se co-cultivó *Azospirillum brasilense* con *Chorella vulgaris* y *C. sorokiniana* en esferas de alginato, observó una mejora en el crecimiento de microalgas y la eliminación de nitrógeno y fósforo de las aguas similares a residuales municipales.

Además de la eficiencia en la eliminación de nutrientes, estos sistemas pueden aventajar a los procesos actuales de tratamiento de aguas residuales ya que pueden reducir significativamente los costos incorporados a la oxigenación de los tanques de lodos activados; y los efectos invernadero asociados a plantas de tratamiento de aguas residuales pueden considerarse despreciable, ya que el CO₂ liberado por las bacterias se convierte en la materia orgánica por microalgas (De Godos et al. 2009).

Teniendo en cuenta los intercambios de CO₂/O₂ observados en estos consorcios y los efectos beneficiosos asociados, el concepto de "algas activadas" (Tiron et al. 2015) se ha convertido en una estrategia atractiva para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales, combinando los pasos de tratamiento secundario y terciario en un solo proceso (McGriff y McKinney 1972; Gonçalves et al. 2017).

En la misma perspectiva Shen et al. (2017) co-inmovilizaron en esferas de alginato la bacteria *Pseudomonas putida* y la microalga *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de aguas residuales en condiciones de cultivo discontinuo y continuo, registrándose para el primero un aumento significativo de la densidad celular de *C. vulgaris* y *P. putida* en comparación con los controles, además de una mayor eliminación de amonio, fosfato y DQO que cualquier tratamiento individual de las especies señaladas. Estas observaciones indican que la utilización de nutrientes por *C. vulgaris* y *P. putida* mejoraron para ambas en situación de cohabitación. Mutjaba y Lee (2017) experimentaron con *C. vulgaris* inmovilizada e inoculando con lodos activados a diversas proporciones, obteniendo rendimientos en la depuración de nitrógeno entre un

66 y 95% a las 24 y 84 horas, respectivamente; mientras que el fósforo se eliminó por completo a las 24 horas del cocultivo con relaciones de inóculo de 0,5 y 1, lo que sugiere que existe una relación óptima de inóculo para lograr un rendimiento eficiente en la eliminación de nutrientes. Wu et al. (2019), también reportaron la ventaja de la inmovilización de microalgas en una matriz polimérica, ya que en esta se pudo mantener una gran densidad de células de algas en el reactor, mejorando la tolerancia de las microalgas a altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, acelerando así la velocidad y la capacidad de tratamiento. En este estudio se inmovilizó *C. vulgaris* en alginato y Biochar⁴, el cual posee una estructura porosa de gran superficie específica y una excelente biocompatibilidad, logrando una remoción en torno al 66,7% a los 8 días, con concentraciones iniciales de entre 40 y 160 mg NH₄⁺/ L. Agregado a lo anterior, la inmovilización de microalgas representa una solución a los altos costos de recolección en los sistemas suspendidos (Xifan et al. 2020).

2.4 FITODEPURACION MIXOTROFICA (FDM)

La fitodepuración mixotrófica (FDM) corresponde a la integración de dos tecnologías de tratamiento terciario de aguas residuales, la biofiltración a partir de bacterias autotróficas y la fitodepuración (fotoautótrofas) (fig.2). La primera técnica es utilizada en la acuicultura intensiva y la otra ha sido ampliamente utilizada en la depuración de aguas residuales domésticas. Este bioproceso mixotrófico ha sido objeto de estudio para la generación de biogás a escala de laboratorio en Bélgica (Van Den Hende 2011), para la producción de proteínas a partir de desechos agrícolas (Salatia et al. 2017) y para tratamientos de agua residuales de diverso origen (Wang et al. 2012; Mitra et al. 2012). Sin embargo, y a excepción de la aproximación realizadas por Ramli et al. (2018) y Del Canto (2019), no se registran precedente de su uso en depuración de aguas residuales de acuicultura, ni se ha estudiado el impacto económico que tendría la utilización de este bioproceso respecto del

⁴ Biochar (de origen inglés, a partir de bio- y charcoal, "carbón vegetal"; también llamado 'biocarbón' en español) es el nombre que recibe el carbón vegetal cuando es empleado como enmienda para el suelo. Es decir, es biomasa de origen vegetal procesada por medio de la pirolisis.

tratamiento convencional a nivel industrial. Adicionalmente, se sugiere que esta tecnología podría tener un importante efecto de reducción de la huella de carbono, debido a la disminución de la demanda de energía para mantener la aireación en los procesos convencionales y la reducción de las emisiones de CO₂ por la presencia de las bacterias heterotróficas (Cakir & Stenstromb 2005).

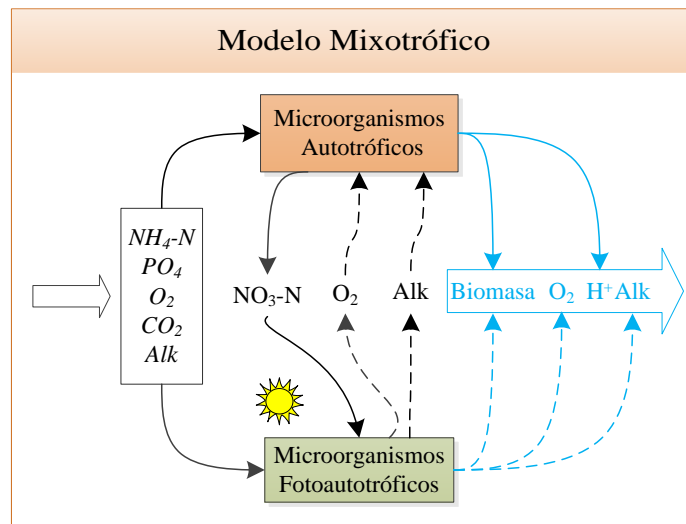


Figura 2. Modelo mixotrófico.

Hipotéticamente, mediante el uso de consorcios de bacterias y microalgas para el tratamiento de aguas residuales de acuicultura, el CO₂ producido por las bacterias se convierte en biomasa microalgal, mientras que el O₂ liberado por la fotosíntesis aumenta los niveles de oxígeno disuelto en el agua (fig.2) evitando el uso de desgasificadores, como ocurre en el caso de los reactores nitrificantes. En el biorreactor, este O₂ es utilizado por bacterias nitrificantes para la biodegradación aeróbica de compuestos orgánicos, cerrando el ciclo. En consecuencia, la absorción de CO₂ por la biomasa fotosintética aumenta el rendimiento de biomasa final (Muñoz et al. 2005). Dado que el contenido de nitrógeno en las microalgas puede alcanzar hasta el 60% de su peso seco (Hedges et al. 2002), se puede conseguir una reducción adicional en la concentración de compuestos nitrogenados del efluente en los procesos de nitrificación y nitración, además de evitar el proceso anaeróbico de desnitrificación -que requiere una fuente externa de carbono orgánico, ej. metanol- ya que el uso de compuestos nitrogenados queda retenido en la biomasa microalgal. Del Canto (2019) experimento en un sistema mixotrófico

utilizando aguas residuales sintética y proveniente de un cultivo de truchas, obtuvo depuraciones en torno al 100% para nitrato, fosfato y amonio, a partir de concentraciones iniciales máximas de 13,7 mg/L, 18 mg/L y 0,72 mg/L, a las 48 de iniciado el proceso, respectivamente.

Por otra parte, Kwon et al. (2020) reportaron beneficios y desventajas de utilizar un modelo mixotrófico con más de una especie de microalgas, al observar que la actividad de los nitrificadores fue inhibida significativamente por la luz. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la luz sobre los nitrificadores se compensa en el cocultivo, consumiendo menos potencia que el del cultivo de bacterias aireadas mecánicamente. Así, el cocultivo logró una nitrificación completa sin aireación forzada, independientemente de las especies de microalgas utilizadas.

A los beneficios de la utilización de los sistemas mixotróficos mencionados anteriormente, se suma la obtención de un producto intermediario para producir biofertilizantes (Mulbry et al. 2005), biomasa de microalgas para alimentación en acuicultura, ganado y aves de corral (Guo et al. 2013; Maisashvili 2015), biogás (Muñoz, et al. 2005; Van Den Hende et al. 2011) y biodiesel (Guo et. al. 2013), entre muchas otras aplicaciones comerciales, enfatizando de esta manera la construcción de una forma de desarrollo económico con un producto que logra compatibilizar la protección del medio ambiente, apelando a la producción sustentable de la industria acuícola.

2.5 FITODEPURACION MIXOTROFICA EN RAS

A pesar de las interesantes propiedades y amplio uso para los consorcios mixotrófos en la recuperación de aguas contaminadas, en la práctica su evaluación se enmarca solo en aguas residuales municipales e industriales, utilizando en ello preparaciones sintéticas que no guardan relación con las condiciones a las que se verían sometidos los sistemas de tratamientos a que apuntan. Lo anterior no escapa a los escasos reportes donde se han evaluado las interacciones de microalgas y bacterias en acuicultura de agua dulce, específicamente en sistemas de recirculación (RAS).

Los RAS son cada vez más importantes debido a la limitación de la tierra y de agua para realizar las actividades de acuicultura y a su capacidad para minimizar el impacto ambiental, Badiola et. al. (2012) y Ramli et. al. (2017) cuantificaron el efecto de la microalga *Stigeoclonium nanum* inmovilizada en alginato, sobre el crecimiento y depuración de aguas residuales de un RAS. Los resultados mostraron un crecimiento de algas significativamente mayor que en suspensión, así como también la eliminación del total de amonio nitrogenado (TAN). Así mismo, la depuración de TAN por *S. nanum* inmovilizada fue significativamente más eficiente que el abatimiento de NO₃-N. Luego, Ramli et al. (2018), evaluaron el efecto de las microalgas en RAS sobre la calidad del agua y la comunidad bacteriana, logrando establecer que las concentraciones de amoníaco no resultaron significativamente diferentes entre RAS con y sin microalgas; pero, nitrito, nitrato y fosfato fueron significativamente más bajos en RAS con microalgas que sin ellas.

3.1.1 CONFIGURACION GENERAL DE LOS FOTOBIORREACTORES.

La investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Bioprocesos Microalgales perteneciente al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Concepción, Chile, con el patrocinio de la empresa “Ingeniería y Bionegocios FDM Spa”. Para tales efectos se implementaron tres (3) fotobiorreactores del tipo fluidizado de tres fases, Hirata y Noguchi (1994), Nicolella et al. (2000), Souza et al. (2004), Florez y Posada (2007), operados en paralelo y configuración Bach Recirculado (fig.4), utilizando aguas residuales (RIL), provenientes de un sistema de recirculación acuícola (RAS) para cultivo de salmónidos, perteneciente al Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción ubicado en la Estación de Biología Marina Dichato, comuna de Tome.

La construcción de los fotobiorreactores consideró los subsistemas, iluminación, aireación, impulsión y de termorregulación del RIL para mantener el sistema a una temperatura constante de 10°C. Cada fotobiorreactor fue fabricado en base a tubos cilíndricos de metacrilato, también conocido por su sigla PMMA o “Acrílico” como denominación comercial, con dimensiones exteriores de 74 y 9 cm de altura y diámetro respectivamente, con una capacidad de tratamiento de 2,85 litros de RIL. Cada reactor fue construido de modo tal que funcionara con un flujo ascendente de agua y salida por rebalse en la zona superior del cilindro; entrada y salida de agua se conectan a un acumulador isotérmico con la bomba sumergible que impulsa el reingreso del agua residual (fig.4 y 5). Con ello el sistema en su conjunto alberga 6 L de RIL por cada fotobiorreactor.

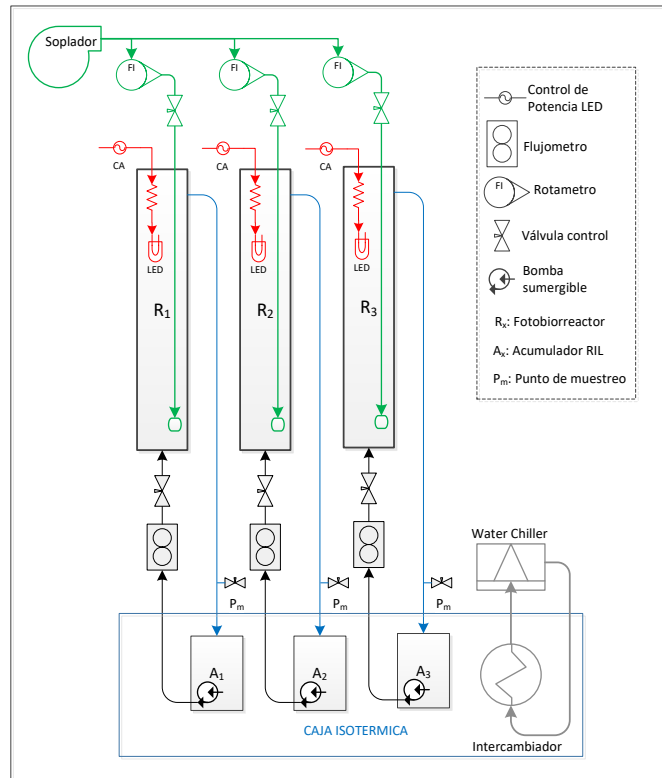


Figura 4. Esquema general del sistema de fotobiorreactores en condición batch recirculado.



Figura 5. Sistema de fotobiorreactores en condición batch recirculado.

3.1.2 OBTENCION E INMOVILIZACION DE MICROORGANISMOS EN BIOMEDIO

Los microorganismos utilizados en el estudio corresponden a un cocultivo microalgal-bacteriano fueron proporcionados por la empresa biotecnológica “Ingeniería y Bionegocios FDM Spa”. El señalado cocultivo está compuesto por la microalga *Tetradismus dimorphus* (Turpin) (Wynne & Hallan 2016) y Bacterias *Nitrificantes*, aislados de aguas residuales proveniente del “RAS-Dichato-UdeC”. El inóculo proporcionado se aclimato en cámara a una temperatura de 10°C, para posteriormente ser inmovilizados en matriz biopolimérica en forma esferas de alginato (*ALg*), según metodología propuesta por Del Canto, 2019. El alginato fue preparado disolviendo 1,5 g en 100 mL de agua destilada, homogeneizado mediante agitador a 28.000 rpm, hasta obtener una mezcla completamente homogénea. Luego, al alginato se agregó 20 ml del inóculo de microorganismos mantenidos en cámara. Las microalgas utilizadas en el inóculo, se encontraban en su fase exponencial de crecimiento, a una densidad óptica de 3 a 4 de absorbancia (ABS) cuantificada a 680 nm. Finalmente, la mezcla *ALg* / inóculo, se esterifico, dejándola caer gota a gota en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2), preparada por la mezcla de 2 g de cloruro de calcio y 100 mL de agua destilada, homogeneizada con agitador magnético a 8.000 rpm. Las esferas ya convertidas en un biomedio, se mantuvieron en la solución de CaCl_2 por 24 horas. El tamaño de la esfera está dado por el diámetro de la punta de descarga; para este estudio se prepararon esferas de 3 mm de diámetro nominal.

3.1.3 DEFINICION DE RANGOS DE LOS FACTORES

A través de ensayos preliminares y/o recomendaciones de trabajos similares se definieron los valores extremos para cada uno de los siguientes factores y sub factores de operación:

3.1.3.1 MEZCLAMIENTO

Dado que los flujos del RIL y aireación afectan a las variables mezclado, transferencia de masa en un reactor, entre otros, Qingshan et al. (2017), resulta importante expresarlos en términos de las fuerzas inerciales y viscosas que actúan sobre el bioproceso. En dicho contexto el número de Reynolds (Re), que a través de su expresión adimensional, relaciona la viscosidad, densidad, velocidad y dimensión típica de un flujo, resulta ser una forma de definir el mezclado. Así mismo este indicador, proporciona una indicación de la pérdida de energía causada por efectos viscosos. Cuando las fuerzas viscosas tienen un efecto dominante en la pérdida de energía, el número de Reynolds es pequeño (≤ 2.000) e implica un flujo del tipo laminar. Un número de Reynolds mayor de 4.000 indican que las fuerzas viscosas influyen poco en la pérdida de energía y comportamiento turbulento. Finalmente, si el número de Reynolds llega a estar entre más de 2.000 e igual o menor que 4.000, se considera que el flujo de ese fluido es transicional.

Para efecto de estimación del número de Reynolds de la mezcla (Re_M), se utilizaron los flujos volumétricos de RIL y aireación, y las siguientes funciones:

| Función | Fuente |
|---|--|
| $(Re_M) = (\rho_M \phi_R U_M) / \mu_M$ | Garcia y Garcia (2009) |
| $U_M = U_L + U_G$ | Awad (2012) |
| $U_L = 4 Q_L / \pi \phi_R^2$ | Awad (2012) |
| $U_G = 4 Q_G / \pi \phi_R^2$ | Awad (2012) |
| $(1 / \rho_M) = (x / \rho_G) + (1 - x / \rho_L)$ | Beattie y Whalley (1982), Garcia y Garcia (2009) |
| $\mu_M = \mu_L (1 - \beta) (1 + 2,5 \beta) + \mu_G \beta$ | Beattie y Whalley (1982), Garcia y Garcia (2009), Afshin & Swanand (2013) |
| $\beta = (\rho_L x) / (\rho_L x + \rho_G x (1 - x))$ | Awad (2012) |
| $x = \sigma_G / (\sigma_L + \sigma_G)$ | Awad (2012) |

Donde:

U_L : Velocidad superficial del liquido

U_G : Velocidad superficial del gas

U_M : Velocidad superficial de la mezcla

Q_L : Caudal del liquido

Q_G : Flujo del gas

ϕ_R : Diámetro del reactor

ρ_L : Densidad del liquido

ρ_G : Densidad del gas

ρ_M : Densidad de la mezcla

μ_L : Viscosidad del liquido

μ_G : Viscosidad del gas

μ_M : Viscosidad de la mezcla

σ_L : Flujo másico del liquido

σ_G : Flujo másico del gas

3.1.3.1.1 FLUJO VOLUMETRICO DE RECIRCULACION

El rango de caudal de recirculación se obtuvo por ensayos, para ello se utilizó un flujómetro digital marca “Sea”, modelo YF-S201; este instrumento posee un rango de medición de 0,1 a 30 LPM. El flujómetro se ubicó en línea de ingreso a la columna del fotobiorreactor, tal como se muestra en la fig.4. Los valores de caudal se establecieron según los siguientes criterios; un mínimo que permitiese mantener en movimiento un volumen de esferas (biomedios) mayor o igual al 80% y un caudal máximo, aquel donde el 80% de los biomedios se agrupasen en el tercio superior de la columna del reactor.

3.1.3.1.2 FLUJO VOLUMETRICO DE AIREACION

Los rangos permisibles de aireación fueron definidos empíricamente. Para tal efecto se utilizó un rotámetro marca “Veto”, con capacidad de medición entre 1-10 LPM, instalado como se muestra en la fig. 4. El mínimo flujo de aire se estableció como aquel que no genero expansión alguna del lecho de biomedios en la columna, mientras que el máximo fue definido como el flujo al cual se produjera una expansión tal, que el lecho se expandiera en toda la columna del fotobiorreactor y sin que con ello se produjera la desintegración de los biomedios.

3.1.3.2 IRRADIANCIA

La irradiancia o iluminancia corresponde al flujo luminoso expresados en lúmenes aplicados a una superficie determinada (Lumen/m^2) expresado en Lux (Lx) y fue cuantificada con un Luxómetro. La energía fue provista por una fuente de poder de 650 W y dosificada por un control de potencia “Dimmer” (fig.4), el cual permitió suministrar la energía eléctrica que genero entre 500 y 30.000 Lx , la cual corresponde a los límites de la fotolimitación y fotoinhibición en microalgas, Qingshan et al. (2017).

3.1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Establecido el rango de irradiancia y estimado el número de Reynolds para la mezcla a partir del flujo volumétrico del RIL y aireación (tabla 2), se diseñó un modelo experimental de combinatorias de ensayos. El diseño experimental para evaluar el efecto de los factores, contemplo con un total 15 ensayos. Las variables respuestas para los ensayos fueron la concentración de amonio, nitrato y fosfato, expresados en mg L^{-1} en el tiempo. En la tabla 3 se muestra la combinatoria de los factores.

Tabla 2. Rango de los factores operacionales analizados.

| Factor | Parámetros para estimación de (Re_M) | Rango |
|-------------------------|--|--------------|
| Mezclamiento (Re_M) | Flujo volumétrico de recirculación (LPM) | 1 a 5 |
| | Flujo volumétrico de aireación (LPM) | 0 a 4 |
| Irradiancia (Lx) | N/a | 500 a 30.000 |

N/a: no aplica

Se realizaron serie de tres ensayos por día en 16 horas continuas (ver apartado 3.1.6). Una vez concluida la serie se dispuso tanto de RIL como los biomedios nuevos; así mismo el sistema de reactores fue limpiado y preparado de modo tal que las condiciones fueran similares en todos los tratamientos.

Tabla 3. Combinatoria los factores.

| Factores | |
|------------------------------------|---|
| <i>Irradiancia (Lx)</i> | <i>Mezclamiento estimado (Re_M)</i> |
| 500 | < 2500 |
| 500 | > 2500 |
| 15.250 | < 2500 |
| 15.250 | > 2500 |
| 30.000 | < 2500 |
| 30.000 | > 2500 |

3.1.5 SUSTRATO (RIL)

El sustrato utilizado fue recolectado como residuo industrial líquido (RIL) del sistema de recirculación acuícola (RAS-Dichato-UdeC), perteneciente Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción y donde se mantenían en cultivo intensivo ejemplares de *Oncorhynchus mykiss* (Trucha arcoíris). Con objeto mantener constante las características físico químicas del RIL durante la experimentación, se trataron y acopiaron 0,3 m³ del RIL en recipiente estanco, filtrada mecánicamente a 50 micrones y desinfectada con sistema UV recirculado durante 12 horas. El RIL se almacenó en una cámara refrigerada a 3°C y diariamente se chequeo el nivel de concentración de amonio, nitrato y fosfato.

3.1.6 EXPERIMENTACION PRELIMINAR

Definido el diseño experimental, se realizó un ensayo de prueba, con el fin de establecer el tiempo máximo que demandaría cada uno de los ensayos definidos. Para lo anterior, se consideró aplicar las condiciones menos favorables en términos disponibilidad de luz (500 Lx), nula aireación y máximo caudal de recirculación 5 LPM. El muestreo se realizó cada hora, entre la primera y cuarta, posteriormente entre hora 17 y 12, para finalizar con dos muestreos trascurrido 24 y 52 horas respectivamente. El punto de extracción de las muestras se indica como "P_m" en la fig. 4.

3.1.7 ANALISIS DE MUESTRAS

La concentración de nutrientes fue evaluada mediante densidad óptica y curva de calibración respectiva. Estas mediciones se llevaron a cabo por métodos colorimétricos utilizando un “Espectrofotómetro Microplacas Epoch™”, junto con el programa “Gen5” para la recolección de datos. Se utilizaron adaptaciones de los protocolos de medición de amonio, nitrato y fosfato, descritos en el manual de instrucciones del fotómetro multiparamétrico “HI83399”. El amonio exudado por los peces respecto a la absorción microalgal se midió según el método de Nessler (SMC, 2016), el cual se modificó para que pudiese realizarse la medición de la absorbancia en una placa de multipocillos. Para este efecto se dispuso de 300 µL de la muestra problema y se le adicionó 10 µL del reactivo A y 10 µL del reactivo B; luego se homogeneizó y se dejó reaccionar por 5 min, prosiguiendo a su lectura a una longitud de onda de 420 nm. El nitrato fue cuantificado según el método de determinación por espectrometría UV (SMC, 2016) y consistió en depositar 2 µL de la muestra problema en la placa de micro-volúmenes “Take3”, seguido de la lectura realizada a la longitud de 220 nm, se corrigió para eliminar el sesgo de interferencias, medida a 275 nm. Para la medición de fosfato se utilizó el método aminoácidos (SMC, 2016), cuya adaptación consistió en depositar 150 µL de la muestra problema y 150 µL de una dilución de los reactivos A y B en 10 ml de agua mili-Q; se homogeneizó y se dejó reaccionar durante 5 minutos, posteriormente se llevó a cabo la lectura de la muestra a una longitud de onda de 810 nm.

3.1.8 ESTIMACIONES, TRATAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS

Los resultados de cada ensayo fueron sistematizados y ordenados en base de datos, trabajados en planilla electrónica, desde la cual se estimaron las siguientes variables respuesta:

- Remoción global; según la siguiente ecuación:

$$R_g = (1 - (C_t/C_{t0})) \times 100$$

Donde:

C_t : Concentración al tiempo t .

C_{t_0} : Concentración al tiempo t_0 .

- Tasa de remoción (T_R); fue calculada por ajuste de curva, para ello se utilizó paquete estadístico que posee Excel Microsoft 2016.
- Análisis varianzas de varianza de un factor; se utilizó paquete estadístico Excel Microsoft 2016.

3.2 SECUENCIA ACTIVIDADES OBJETIVO ESPECIFICO B

Con antecedentes obtenidos del primer objetivo específico, se realizaron las actividades señaladas en la figura 6. Las cuales son detalladas a continuación.

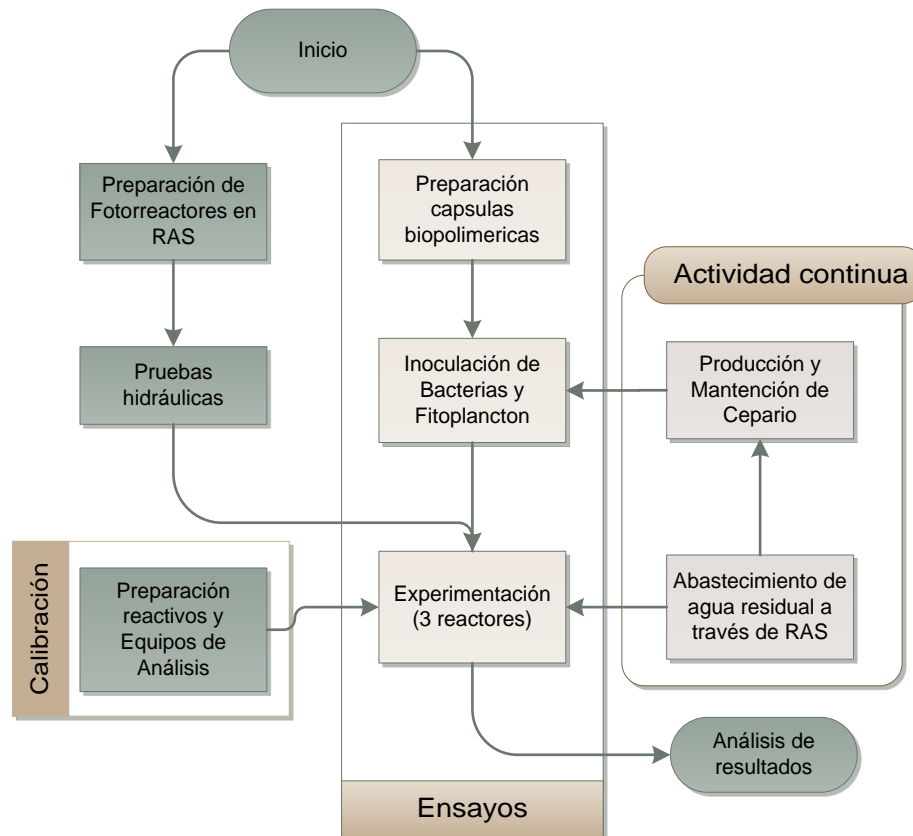


Figura 6. Flujograma de actividades realizadas en el marco del objetivo específico B.

3.2.1 PREPARACION FOTOBIORRECTOR EN RAS

El reactor tipo “continuo” utilizado en los ensayos fue diseñado y escalado aproximando relaciones geométricas, densidad de carga y tasa de ocupación de los biomedios utilizadas en el fotobiorreactor en condición Bach recirculado del primer objetivo específico (Tabla 4).

Los señalados fotobiorreactores fueron construidos e instalados y operados en una línea RAS (fig. 7, 8 y 9) de la Piscicultura Pangue, ubicada en la provincia de Concepción, km 25 camino a Florida. El plantel de cultivo

señalado se dedica al cultivo de trucha arcoíris. Los ensayos se realizaron con ejemplares entre 100 y 200 g de peso individual y una densidad de cultivo promedio de 25 k / m³.

Las condiciones de cultivo de peces se mantuvieron constante por 60 días antes de los ensayos, siendo alimentados a una razón de entre 1 a 1,5 % de su peso corporal por día. Se chequearon los parámetros ambientales diariamente; se evaluó la biomasa y densidad a objeto de mantener lo más constante posible la carga de biomasa.

Tabla 4. Parámetros dimensionales y operacionales de los reactores

| Parámetro | Unidad | Fotobiorreactor | |
|--|-----------------|-------------------|-----------|
| | | Batch Recirculado | Continuo |
| <i>Dimensional:</i> | | | |
| Diámetro (ϕ) | m | 0,09 | 0,4 |
| Altura efectiva (h) | m | 0,47 | 0,95 |
| Diámetro /Altura efectiva (ϕ / h) | admc. | 0,2 | 0,4 |
| Volumen Reactor (V_R) | L | 2,85 | 120 |
| Nº de Biomedios (N_B) | global | 24.000 | 1.000.000 |
| Volumen Biomedios (V_b) | L | 0,36 | 15 |
| Concentración Biomedio (N_B / V_R) | L ⁻¹ | 8.421 | 8.333 |
| Tasa de ocupación (V_b / V_R) | % | 12,6% | 12,5% |

Durante el periodo de aclimatación de los peces, el sistema opero como RAS tradicional (fig. 1), para ello, entre otros procesos unitarios típicos de estos sistemas, se operó con un biofiltro nitrificante sumergido que permito controlar la concentración del total de amonio nitrificante (TAN).

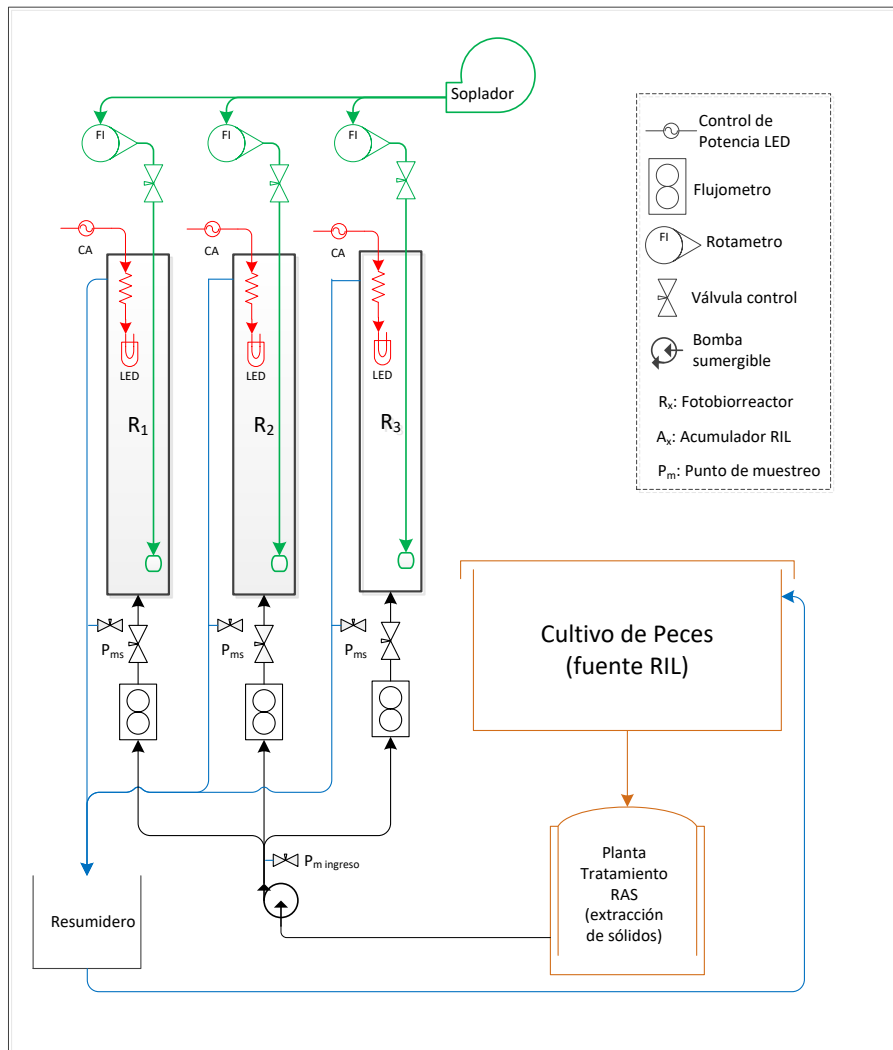


Figura 7. Esquema general del sistema de fotobiorreactores en modo continuo en línea RAS de cultivo de salmónidos.

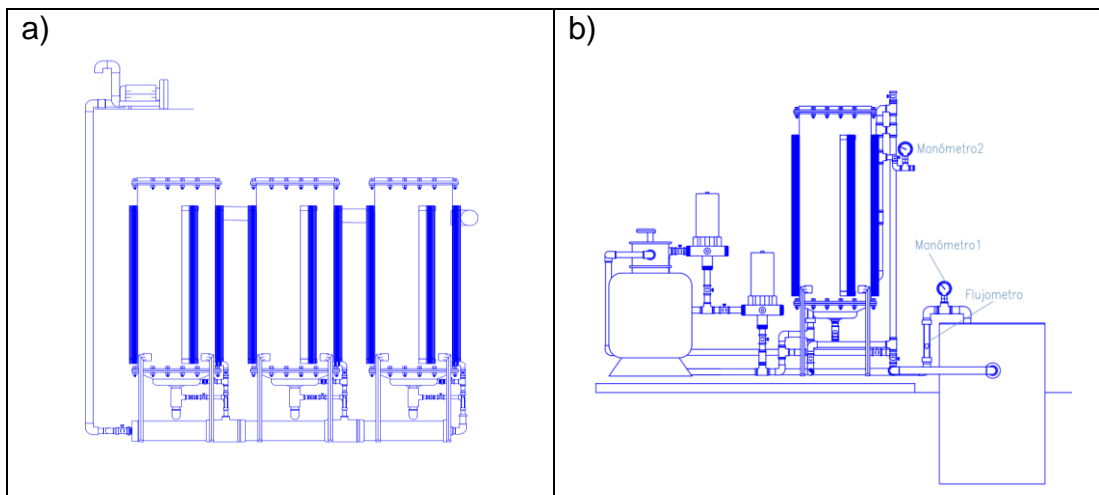


Figura 8. Esquema general del sistema de fotobiorreactores a) elevación frontal, b) elevación lateral.



Figura 9. Sistema de fotobiorreactores en modo continuo en línea RAS de cultivo de salmónidos.

3.2.2 ENSAYO PRELIMINAR

En paralelo a la adaptación de los fotobiorreactores al sistema RAS y aclimatación de los peces, se procedió a realizar un ensayo preliminar tendiente a establecer el tiempo en el que sistema se estabilice y tienda a comportarse en forma estacionaria en un formato continuo. Esta experiencia se extendió por 48 horas y se avaluó solo la concentración de amonio en la entrada (afluente) y salida (efluente) de los reactores, según procedimiento de análisis de muestras indicado en el apartado 3.1.7.

Para efecto de lo anterior, dos de los reactores utilizados en el desarrollo del primer objetivo específico de este estudio (fig. 5), fueron instalados en una línea de RIL del RAS a 0,15 LPM, 19 min de tiempo de residencia hidráulica y 0,12 LPM de flujo de aire. Cada reactor fue sembrado con igual volumen de biomedios, pero solo en uno de ellos fue inoculado con microalgas y bacterias nitrificantes según lo descrito en el apartado 3.1.2. El otro reactor se consideró como control del proceso.

3.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Con los resultados del apartado anterior se definió el procedimiento experimental aplicado en cada ensayo en fotobiorreactores:

- Preparación de biomedios: con 72 h de anticipación se preparó e inmovilizo microalgas y bacterias nitrificantes según lo descrito en el apartado 3.1.2.
- Siembra: entre 24 a 30 h antes de cada ensayo se sembraron los biomedios en los fotobiorreactores. Junto con lo anterior se ajustaron los caudales de RIL y aireación.
- Toma de muestras: las muestras por triplicado fueron extraídas posterior al tratamiento al que es sometido el RIL, una vez que se desaloja desde los estanques de cultivo de peces (fig.7). Inmediatamente después se extrajeron las muestras a la salida del reactor, según se indica el punto como "P_{ms}" en la figura 7.
- Análisis de muestras: el tratamiento y análisis de las muestras se realizó según lo indicado en el apartado 3.1.7.

3.2.4 ESTIMACIONES, TRATAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS

Los resultados de cada ensayo fueron sistematizados y ordenados en base de datos, trabajados en planilla electrónica, desde la cual se estimaron las siguientes variables respuesta:

- % de nutriente eliminado (PTR):

$$PTR = (C_{in} - C_{out} / C_{in}) \times 100$$

- Tasa de conversión superficial, Colt et al., 2006.

$$STR = Q (C_{in} - C_{out}) / A_{medios}$$

- Tasa de conversión volumétrica (VTR), Colt et al., 2006.

$$VTR = Q (C_{in} - C_{out}) / V_{medios}$$

Donde:

- STR : tasa de conversión superficial ($\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$)
- VTR : tasa de conversión volumétrica ($\text{mg m}^{-3} \text{d}^{-1}$)
- C_{in} : concentración nutriente en el afluente del reactor (mg / m^3)
- C_{out} : concentración nutriente en el efluente del reactor (mg / m^3)
- A_{medios} : área de superficie activa total del medio (m^2)
- V_{medios} : volumen de medios (m^3)
- Q : Caudal del afluente ($\text{m}^3 \text{d}^{-1}$)

- Análisis varianzas de varianza de un factor; se utilizó paquete estadístico Excel Microsoft 2016.
- Estimación Total de amonio nitrogenado (TAN): En agua, el amoníaco existe en dos formas: amoníaco no ionizado, NH_3 , y amonio ionizado, NH_4^+ . La concentración relativa de cada una de estas formas está en función del pH, temperatura y salinidad (Anthonisen et al., 1976). La suma de NH_4^+ y NH_3 , generalmente se define como total amonio nitrogenado (TAN) o simplemente amoníaco (Ebeling et al. 2006). En función de lo anterior se utilizaron las siguientes funciones:

$$TAN = \text{NH}_3 + \text{NH}_4$$

$$\text{NH}_3 = \alpha \text{ TAN (Lawson, 1995)}$$

$$\alpha = 1 / (1 + 10^{(10,068 - 0,033 T - \text{pH})}) \text{ (Lawson, 1995)}$$

Donde:

NH_3 : concentración amoniaco

NH_4 : concentración amonio

α : Fracción molar de NH_3

T : temperatura en $^{\circ}\text{C}$

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 OBJETIVO A

4.1.1 DEFINICION DE TIEMPO MAXIMO PARA ENSAYOS

Establecer el tiempo máximo al que fueran sometidos cada uno de los experimentos, requirió estudiar preliminarmente el comportamiento en la remoción de los sustratos a condiciones de mínima iluminación y aporte de aireación. En dicho contexto y tal como muestra la figura 10, se registró una caída importante en la concentración de los sustratos en las primeras horas 5 horas del ensayo, situación que se incrementa y estabiliza, para el caso del amonio y fosfato transcurrido 17 horas. Para el caso del nitrato, la estabilización en la concentración comienza a las 19 horas de iniciada la experiencia. Con lo anterior y dada las velocidades de decremento en la concentración, se consideró no extender más allá de 17 horas los ensayos con la combinatoria de factores propuestos (Tabla 5).

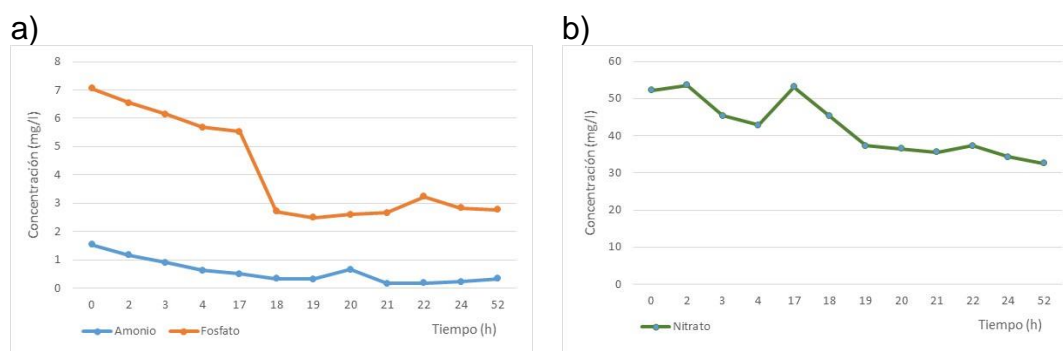


Figura 10. Variación de la concentración de a) amonio y fosfato, b) nitrato en el tiempo.

4.1.2 ESTABILIDAD DEL RIL ALMACENADO Y UTILIZADO COMO SUSTRATO EN LOS ENSAYOS

La concentración de nutrientes en el RIL utilizado como fuente de sustrato durante los ensayos, se muestran en la figura 11. En esta es posible observar que las concentraciones de amonio, nitrato y fosfato del RIL de almacenamiento, variaron levemente en el tiempo, no generándose diferencias en la concentración durante el tiempo que se extendieron la serie de ensayos. Con lo anterior se aseguró una condición similar para todos los ensayos realizados.

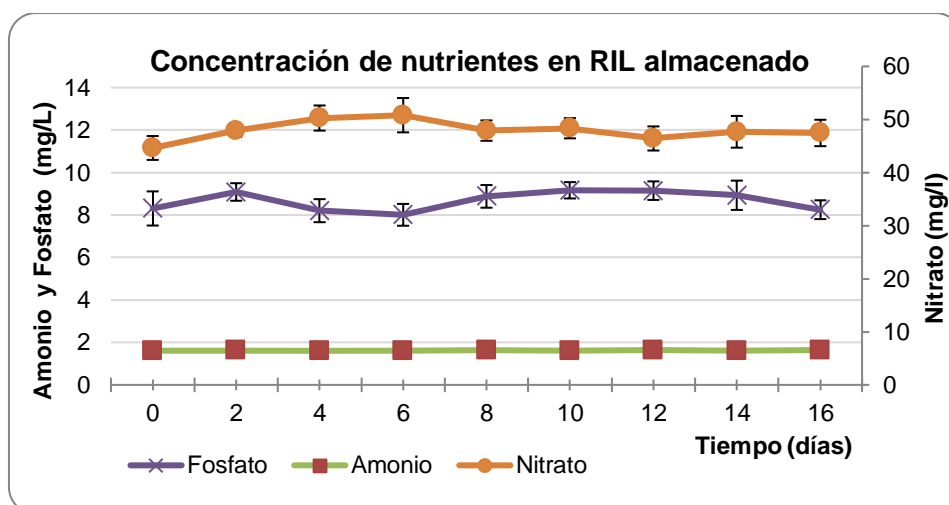


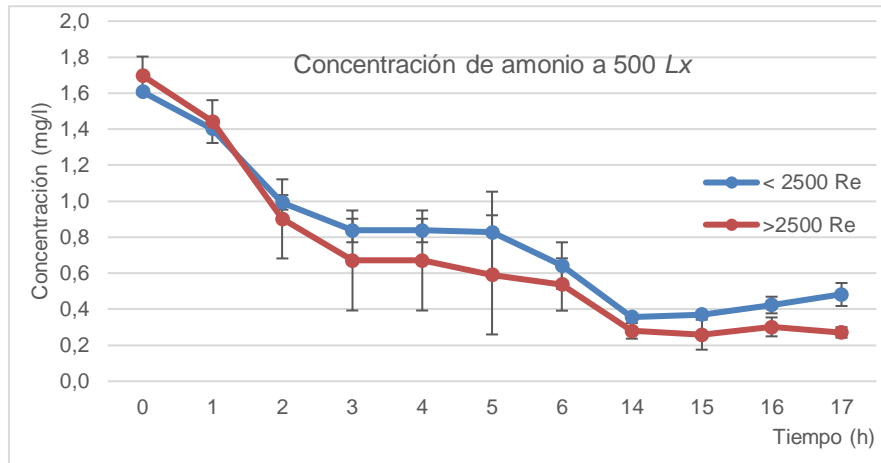
Figura 11. Variación de la concentración de nutrientes en el RIL de almacenamiento utilizado durante la serie de ensayos.

4.1.3 CONCENTRACION, REMOCION Y TASA DE DEPURACION DE AMONIO EN FOTOBIOREACTOR BATCH RECIRCULADO

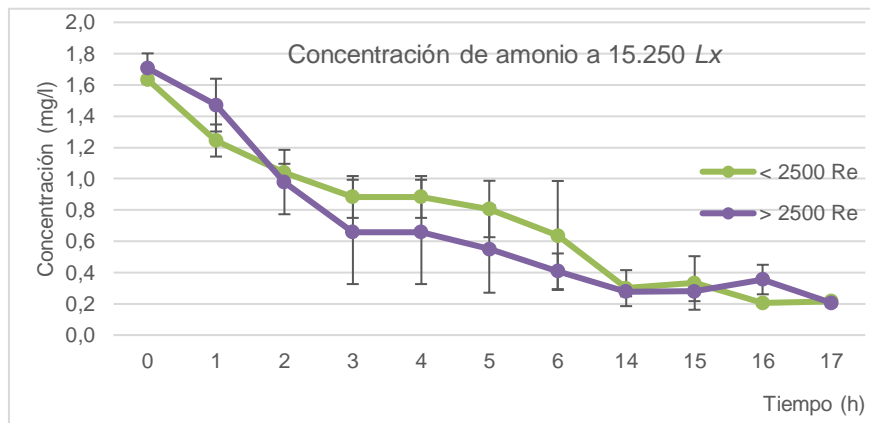
Los experimentos fueron desarrollados en tandas de tres por día en un lapso de dos semanas consecutivas. En dicho periodo la concentración de amonio experimento una rápida disminución de la concentración, sobre todo en las primeras cinco horas, alcanzando una tasa promedio de caída del orden de $0,19 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, que en las últimas horas los ensayos se estabilizaron,

debido al agotamiento progresivo del sustrato que caracteriza al sistema batch, tal como se muestra en la figura 12.

a)



b)



c)

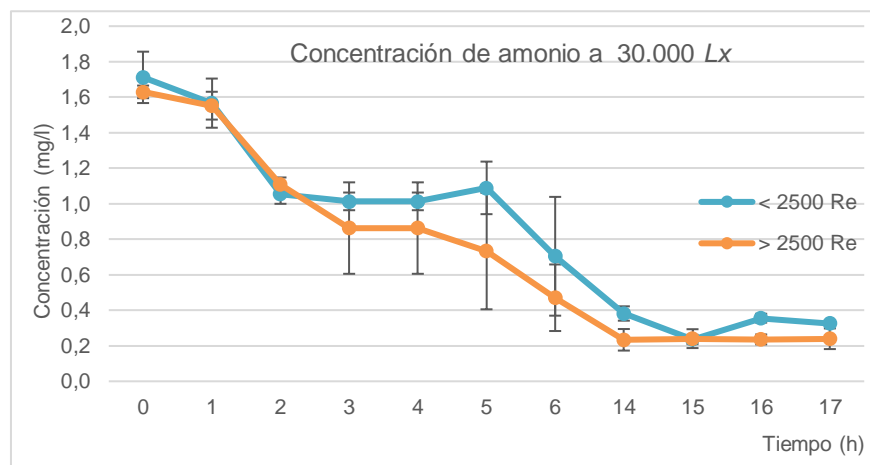


Figura 12. Variación de la concentración de amonio en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado, a) 500 Lx, b) 15.250 Lx y c) 30.000 Lx.

Cabe destacar que se aprecian diferencias entre los experimentos realizados respecto a la tasa global de remoción. Al observar los datos, se ve una diferencia entre los experimentos sometidos a 500 Lx cuando modifican su nivel de mezclamiento, generando entre 70% y 84% en promedio a menos de 2.500 Re_M y por sobre 2.500 Re_M , respectivamente (tabla 5 y fig. 13). De la misma forma acontece cuando se aplican 30.000 Lx de irradiancia, donde la remoción se manifiesta entre 81% y 85%, siendo ligeramente mayor cuando se aplica más de 2.500 Re_M en su mezclamiento (fig.13). Por su parte las experiencias a 15.250 Lx , registro las mayores remociones globales, las que fluctuaron entre 86,7 % y 87,8%, no evidenciándose diferencia importante entre los dos regímenes de mezclamiento (fig.13).

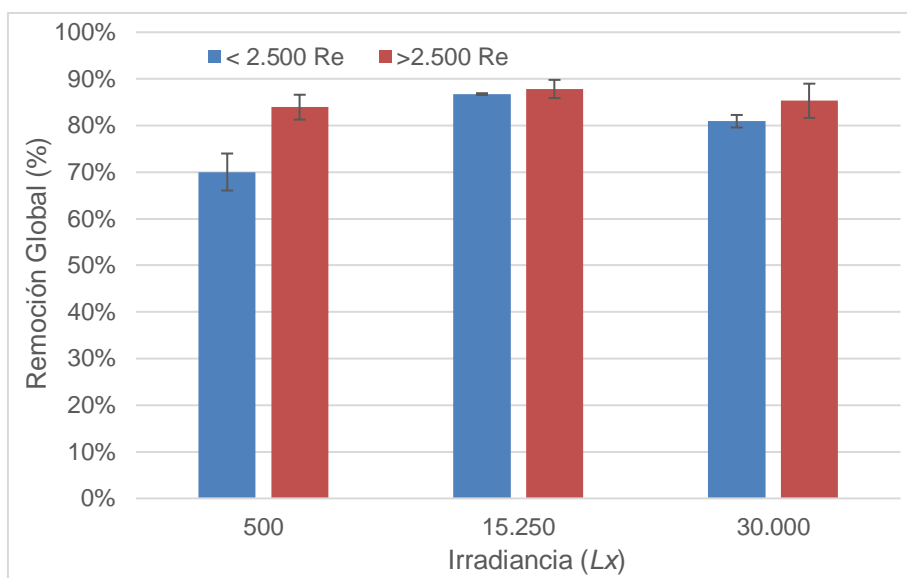
Tabla 5. Remoción global promedio de amonio en tres niveles de irradiancia (Lx) y dos de mezclamiento (Re_M).

| Factores | | Remoción Global (%) | |
|--------------------------------------|---|---------------------|----------------------------|
| <i>Irradiancia (Lx)</i> | <i>Mezclamiento (Re_M)</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación estándar</i> |
| 500 | < 2.500 | 70,0% | 4,0% |
| 500 | > 2.500 | 83,9% | 2,7% |
| 12.250 | < 2.500 | 86,7% | 0,2% |
| 12.250 | > 2.500 | 87,8% | 2,0% |
| 30.000 | < 2.500 | 80,9% | 1,3% |
| 30.000 | > 2.500 | 85,3% | 3,7% |

Dado que las mayores caídas de la concentración de amonio se registran entre la cuarta y sexta hora para todos los niveles de irradiancia y mezclamiento (fig. 12), es que resulto adecuado evaluar para cada experimento el comportamiento en términos de tasa de depuración dentro de las cinco primeras horas de funcionamiento, dado el mayor potencial biológico observado en dicho periodo. En función de lo señalado, se registran en la tabla 6 las tasas promedio de remoción, estimadas en base a regresión lineal (fig. 14), estas fluctuaron entre $0,14 \pm 0,05$ y $0,24 \pm 0,06$ $mg L^{-1} h^{-1}$ para el amonio. Así mismo los experimentos con mayores tasas correspondieron a los ensayos sobre los cuales se aplicaron niveles de mezclamiento mayores 2.500 Re_M , sin embargo dentro de estos últimos destacan en cuantían de

depuración, en el orden de magnitud, los ensayos sometidos a 15.250 Lx y 500 Lx de irradiancia, por sobre los cuales se aplicaron 30.000 Lx (fig.15). Sin embargo los análisis estadísticos no arrojaron diferencias significativas (anexo A).

a)



b)

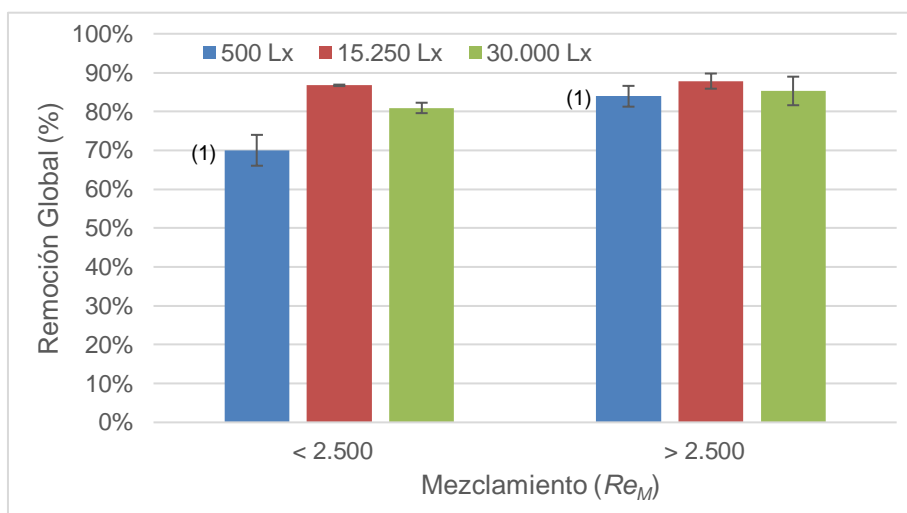


Figura 13. Remoción global de amonio en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado. (1) Diferencia significativa $p < 0,05$ al 95 % de confianza.

Tabla 6. Tasas de remoción de nutrientes en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclado en cinco horas de funcionamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado.

| Factores | | Tasa de Remoción ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) | | | | | |
|----------------------|------------------------|---|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
| | | Amonio | | Nitrato | | Fosfato | |
| Irradiancia (Lx) | Mezclamiento (ReM) | Promedio | Desv. Estd. | Promedio | Desv. Estd. | Promedio | Desv. Estd. |
| 500 | < 2.500 | 0,17 | 0,05 | 2,10 | 0,25 | 0,48 | 0,08 |
| 500 | > 2.500 | 0,23 | 0,06 | 2,09 | - | 0,68 | 0,22 |
| 12.250 | < 2.500 | 0,15 | 0,05 | 3,74 | - | 0,61 | 0,00 |
| 12.250 | > 2.500 | 0,24 | 0,06 | 0,02 | - | 0,65 | 0,24 |
| 30.000 | < 2.500 | 0,14 | 0,05 | 0,61 | - | 0,45 | 0,00 |
| 30.000 | > 2.500 | 0,19 | 0,07 | 0,25 | 0,18 | 0,58 | 0,20 |

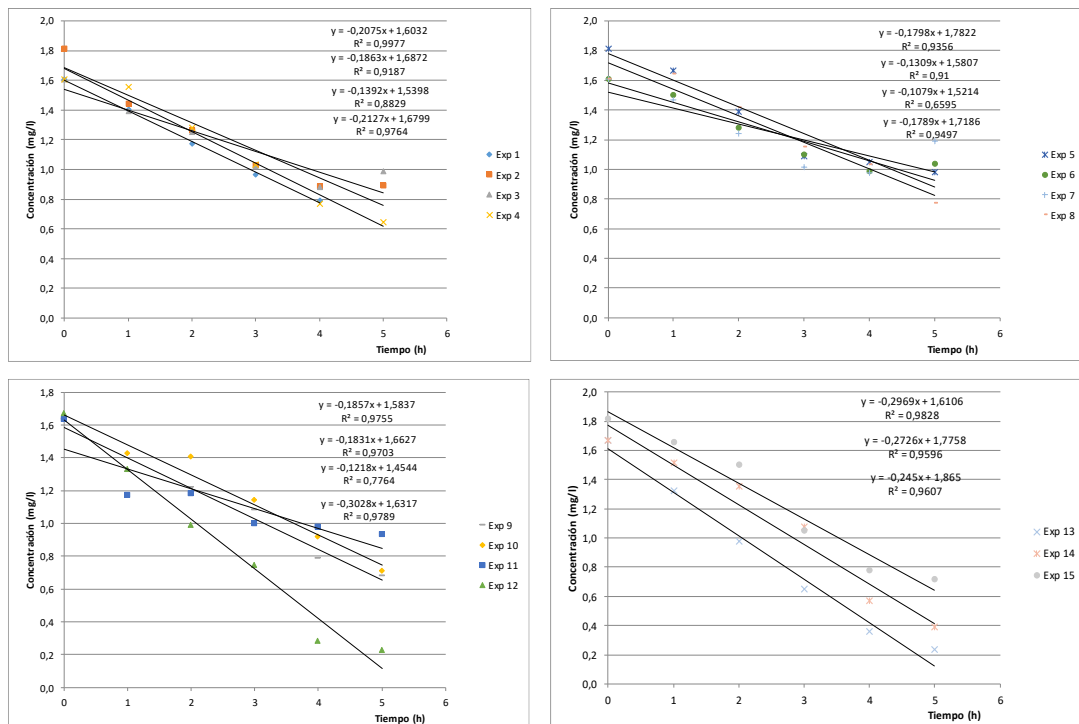
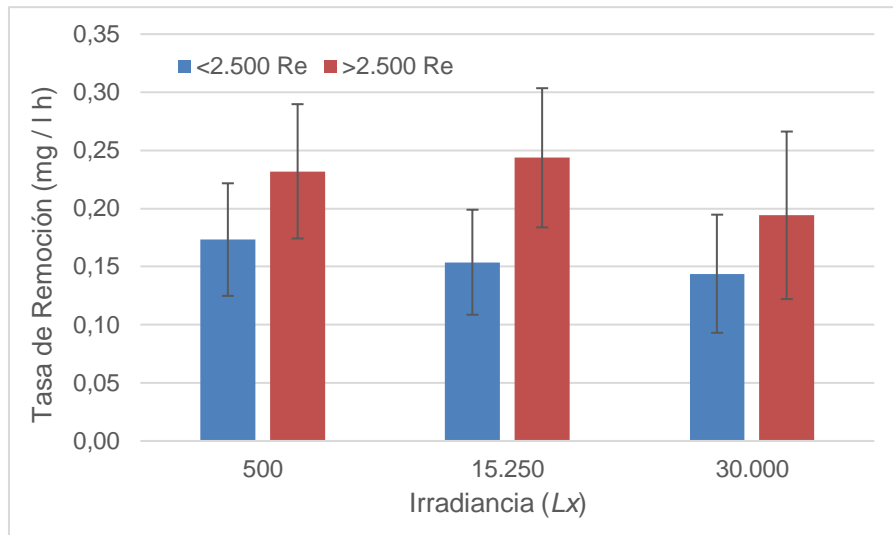


Figura 14. Estimación a través de regresión lineal de las tasas de remoción de amonio en RIL sometido a diversa condiciones de mixotrófica en reactor tipo batch.

a)



b)

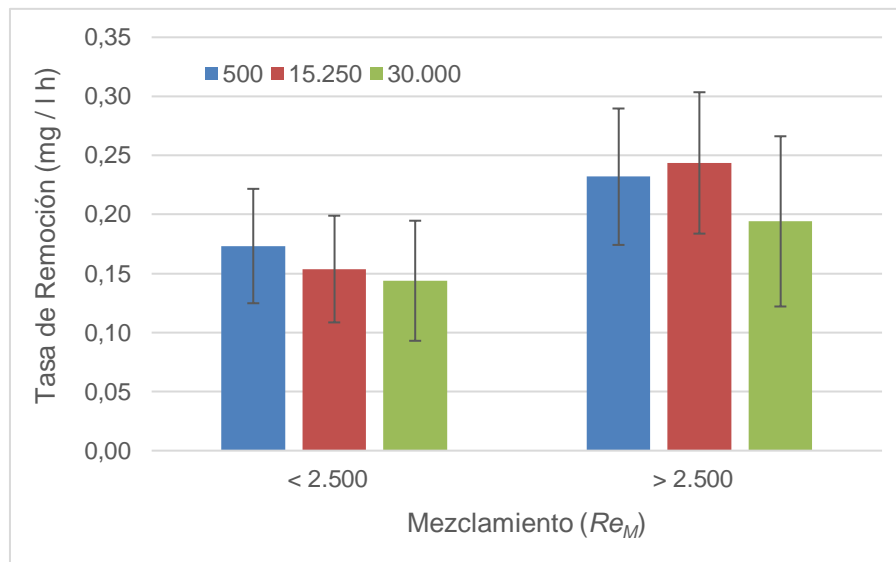


Figura 15. Tasa de remoción de amonio en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado.

4.1.4 CONCENTRACION, REMOCION Y TASA DE DEPURACION DE FOSFATO EN FOTOBIORREACTOR TIPO BATCH

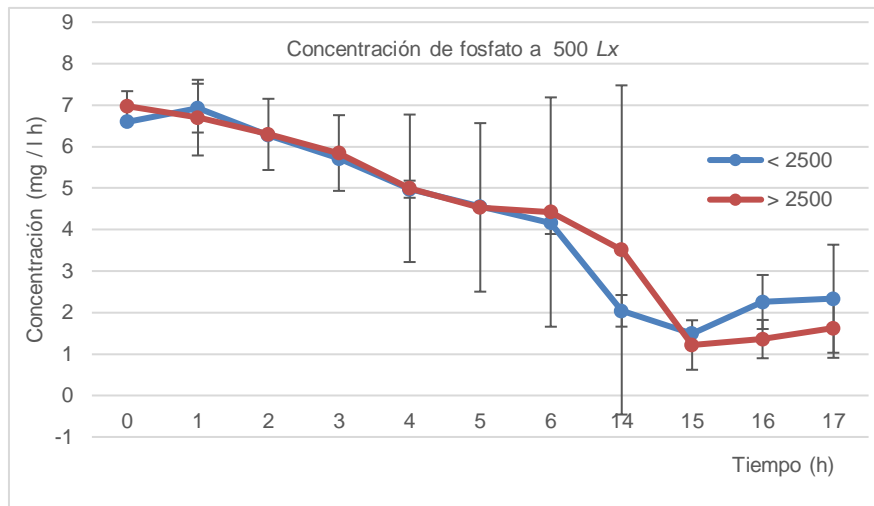
El comportamiento del fosfato en términos de concentración, para los ensayos realizados, se grafica en la figura 16. En ella se puede observar la tendencia a la rápida caída de la concentración de fosfato durante las primeras horas de funcionamiento, a una tasa general del orden de $0,57 \pm 0,12 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; no registrando diferencias de importancia por efecto del mezclado los tratamientos a 500 y 15.250 Lx de irradiancia y solo en los ensayos que fueron sometidos a una irradiancia mayor (30.000 Lx), se genera una diferenciación notoria entre los dos niveles de mezclado, siendo favorecida la remoción al tratamiento de mayor condición de mezclado ($>2.500 \text{ Re}_M$). Sin embargo, en la misma figura 16, también es posible observar una estabilización en la remoción a partir de la hora 14 del experimento, que afecta indistintamente a todos los tratamientos.

Mientras que desde la perspectiva de la remoción global, el fosfato fue removido entre un 64,7% y 86,8% (tabla 7); registrándose en tal sentido, diferencias entre los ensayos realizados. Siendo las mayores remociones aquellas ocurridas en las experiencias con mayor nivel de irradiancia y mezclado (fig. 17 a). Sin embargo, solo fue posible establecer diferencias significativas en tratamiento a 30.000 Lx de irradiancia y mezclado ($p < 0,05$).

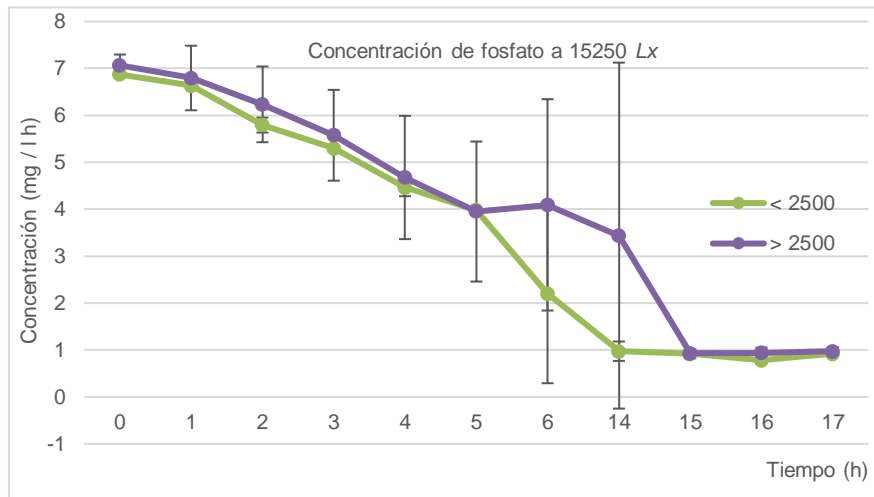
Tabla 7. Remoción global promedio de fosfato en tres niveles de irradiancia (Lx) y dos de mezclado (Re_M).

| Factores | | Remoción Global (%) | |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>Irradiancia</i> (Lx) | <i>Mezclamiento</i> (Re_M) | <i>Promedio</i> | <i>Desviación estándar</i> |
| 500 | < 2.500 | 64,7% | 19,7% |
| 500 | > 2.500 | 73,2% | 14,5% |
| 15.250 | < 2.500 | 86,6% | 0,5% |
| 15.250 | > 2.500 | 85,3% | 0,5% |
| 30.000 | < 2.500 | 81,6% | 1,3% |
| 30.000 | > 2.500 | 86,8% | 0,9% |

a)



b)



c)

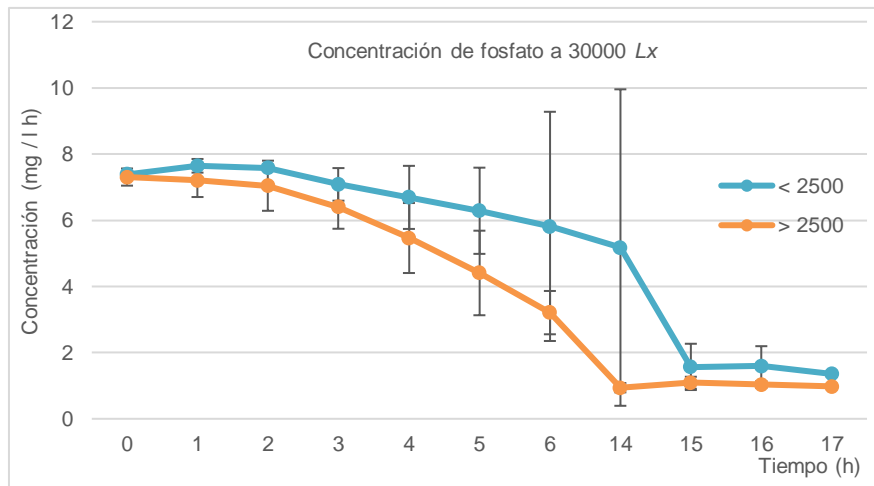
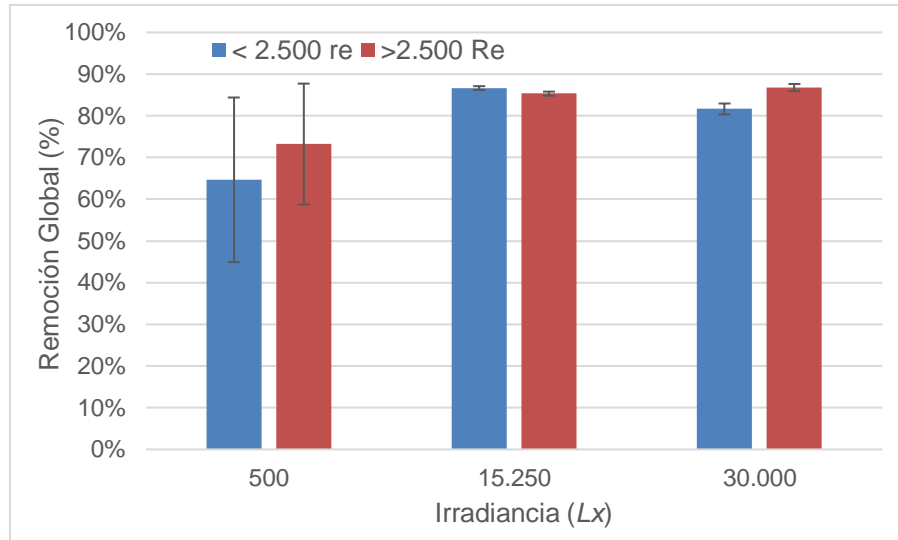


Figura 16. Variación de la concentración de fosfato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado, a) 500 Lx, b) 15.250 Lx y c) 30.000 Lx.

a)



b)

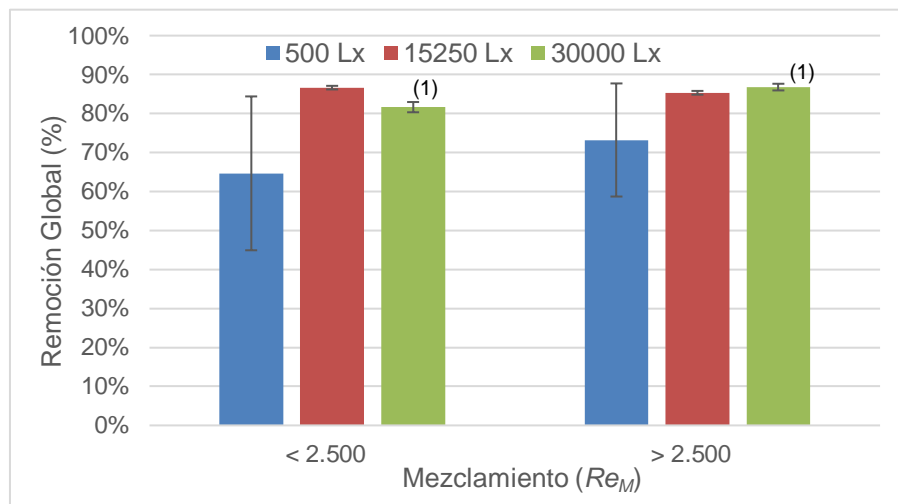


Figura 17. Remoción global de fosfato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado. (1) Diferencia significativa $p < 0,05$ al 95 % de confianza.

Según se observa en el comportamiento general de caída de la concentración de fosfato en el tiempo (fig. 16), las mayores tasas de depuración, independiente a los niveles de tratamiento sometidos, se distribuyen entre la cuarta y sexta hora de funcionamiento. Dado lo anterior al analizar la tabla 6 y figuras 18 y 19, es posible observar que los ensayos presentaron diferencias importantes a considerar, fluctuando sus tasas entre $0,45$ y $0,68 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para la hora cinco, siendo las mayores remociones en los tratamientos asociados a niveles de mezclamiento superiores a $2.500 Re_M$ e irradiancia

igual o menores a 15.250 Lx (fig.19). Sin embargo los análisis estadísticos no arrojaron diferencias significativas.

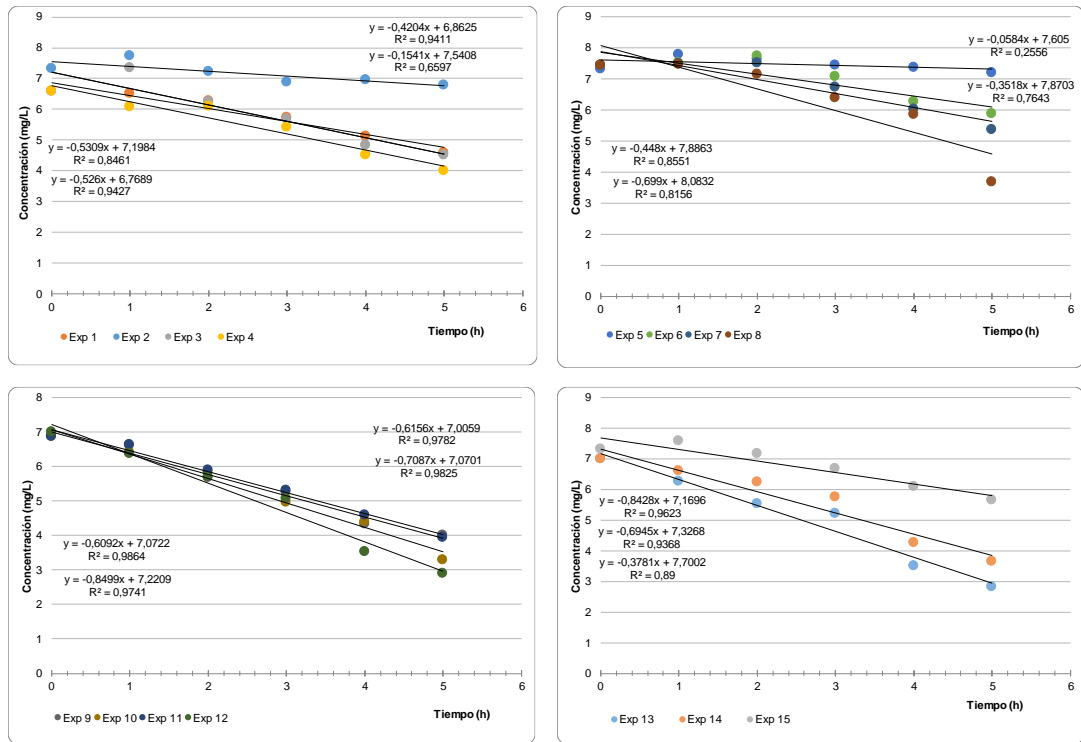
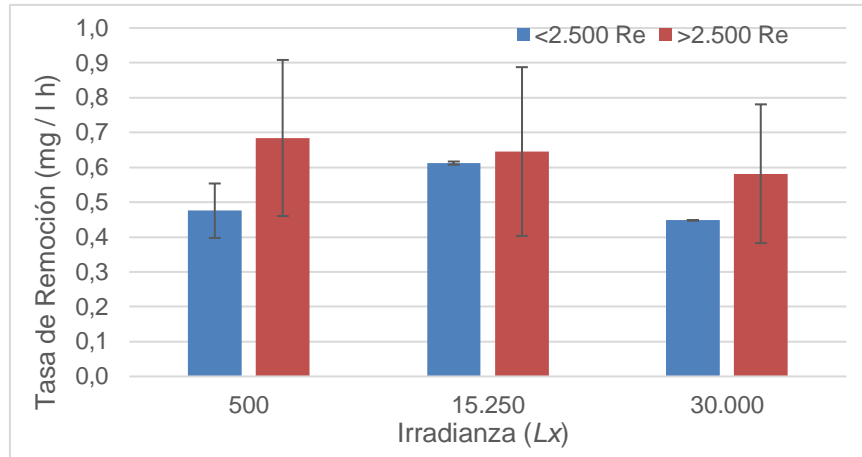


Figura 18. Estimación a través de regresión lineal de las tasas de remoción de fosfato en RIL sometido a diversa condiciones de mixotrófica en reactor tipo batch.

a)



b)

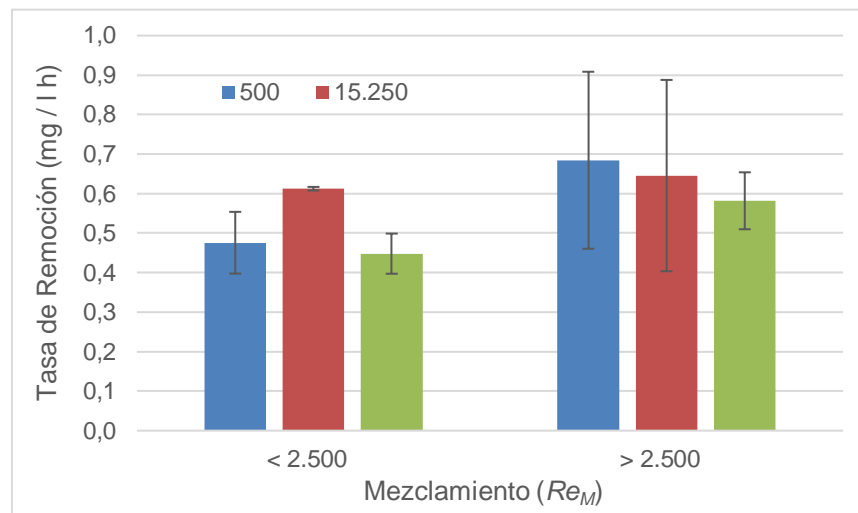


Figura 19. Tasa de remoción de fosfato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado.

4.1.5 CONCENTRACION, REMOCION Y TASA DE DEPURACION DE NITRATO EN FOTOBIORREACTOR TIPO BATCH

El efecto del sistema fotobiorreactor, sobre la concentración de nitrato del RIL utilizado en los diferentes ensayos, mostro un comportamiento bastante irregular, tal como se puede apreciar en la figura 20. Si bien en general, todos los ensayos tienden a disminuir la concentración posterior a la primera hora de funcionamiento, algunos aumentaron la concentración al cabo de algunas horas de funcionamiento, con ello solo es posible identificar un patrón de

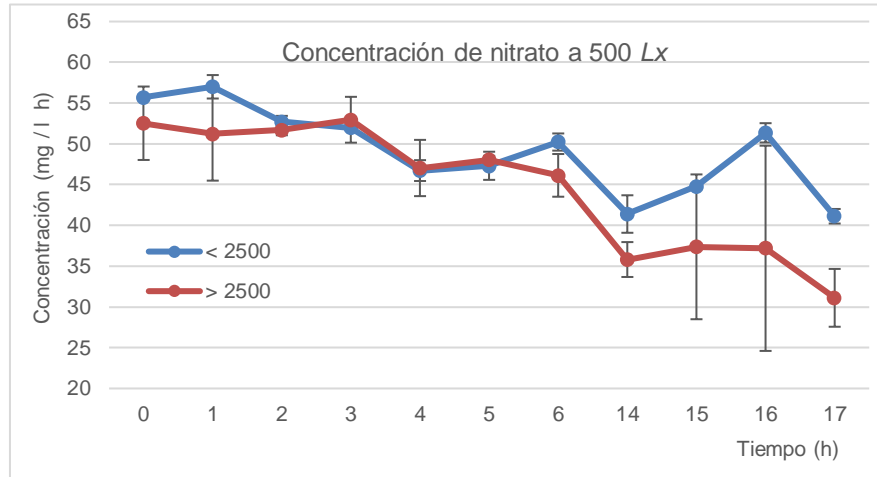
comportamiento de depuración relativamente definido en los ensayos con niveles de irradiancia de 500 *Lx* independiente del nivel de mezclamiento, situación que se modifica a partir de la sexta hora en que se observa un clara caída del concentración de nitrato en el ensayo a 500 *Lx* y más de 2.500 de *Re_M* (fig. 20 a), mientras que en los restante tratamiento no se observan diferencias entre los dos niveles de mezclamiento (fig. 20 b y c).

Por otra parte, si se observa la tabla 8 y figura 21, se podrá apreciar que en términos globales, registraron remociones de nitrato entre 26,2% y 40,8%, siendo el ensayo sobre el cual se aplicó una irradiancia de 500 *Lx* y más de 2.500 *Re_M* en mezclamiento el que presentan la mayor remoción global de nitrato (fig. 21 b) con una diferencia significativa entre los niveles de mezclamiento ($p < 0,05$) al 95 % de significancia. Así mismo se generó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre 500 *Lx* y 15.250 *Lx* cuando el mezclamiento sobrepaso 2.500 *Re_M* (fig. 21 a).

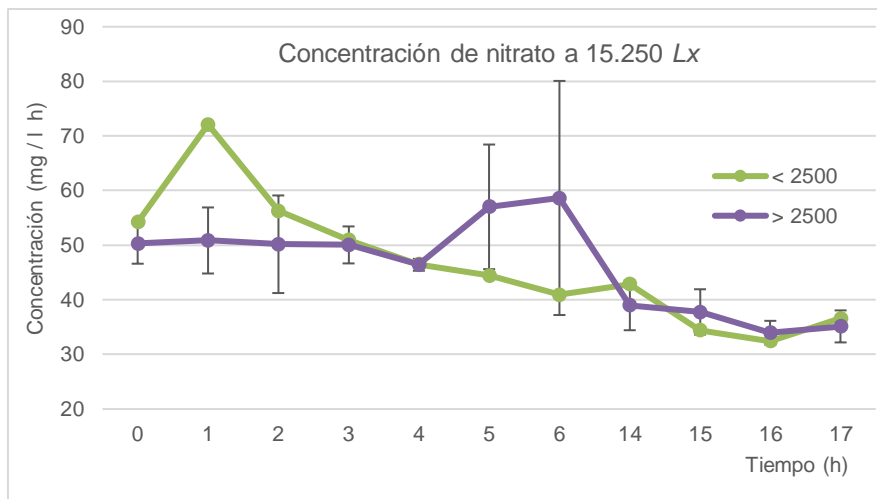
Tabla 8. Remoción global promedio de fosfato en tres niveles de irradiancia (*Lx*) y dos de mezclamiento (*Re_M*).

| Factores | | Remoción Global (%) | |
|-------------------------|--------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| <i>Irradiancia (Lx)</i> | <i>Mezclamiento (Re_M)</i> | <i>Promedio</i> | <i>Desviación estándar</i> |
| 500 | < 2.500 | 26,2% | 1,6% |
| 500 | > 2.500 | 40,8% | 1,7% |
| 15.250 | < 2.500 | 32,5% | - |
| 15.250 | > 2.500 | 30,2% | 2,3% |
| 30.000 | < 2.500 | 28,6% | - |
| 30.000 | > 2.500 | 32,6% | 8,2% |

a)



b)



c)

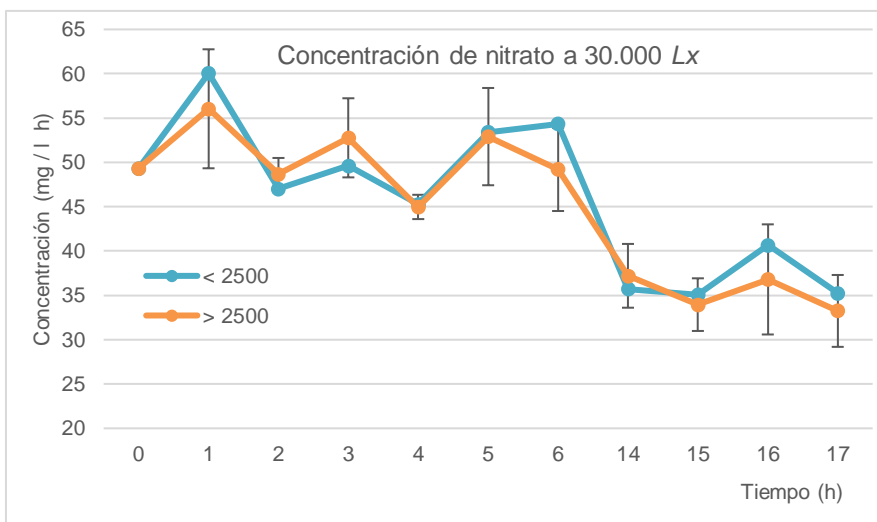
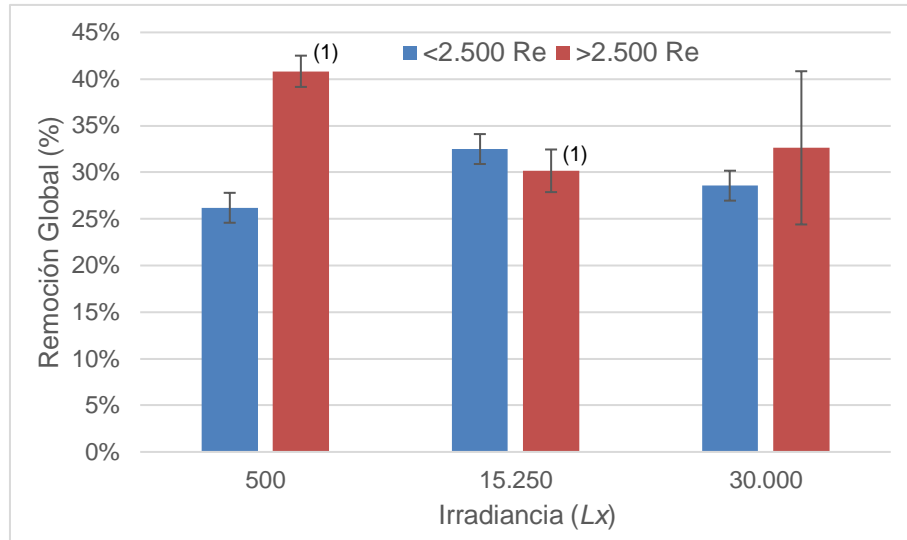


Figura 20. Variación de la concentración de nitrato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de irradiancia y mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado, a) 500 Lx, b) 15.250 Lx y c) 30.000 Lx.

a)



b)

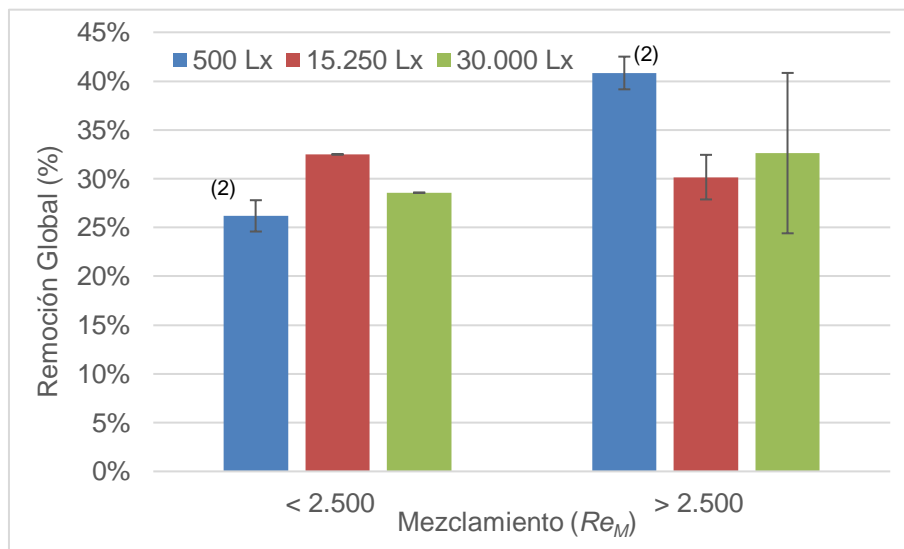
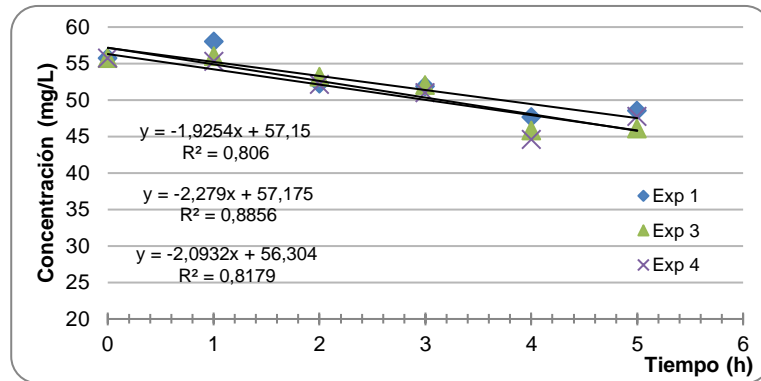


Figura 21. Remoción global de nitrato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado. (1) y (2), diferencias significativas, $p < 0,05$ al 95 % de confianza.

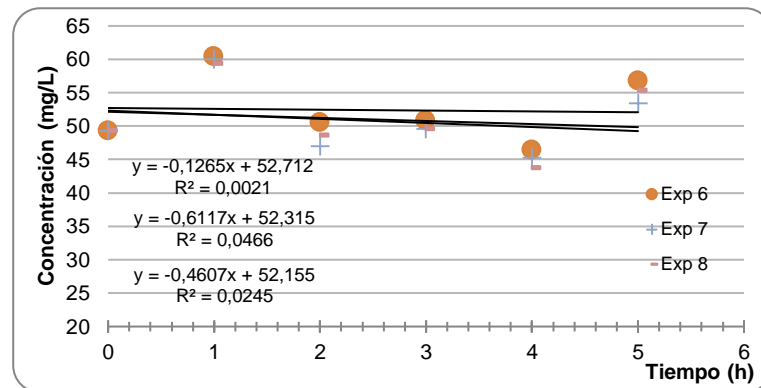
Los resultados de remoción en términos de tasas, estimadas en base a la pendiente registrada hasta la quinta hora funcionamiento (fig. 22), son presentadas en la tabla 6 y fig. 23. En ellas se observa la extrema variabilidad entre los ensayos, los generando dispares disminución de la concentración de nitrato en las primeras cinco horas. Los valores máximos rondaron en torno a $3,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para los experimentos sometidos a 15.250 Lx y menos de 2.500 Re , sin embargo la estimación de las tasas de remoción para dicho

tratamiento arrojó bajos coeficientes de regresión (fig. 22 c). En función de lo anterior se consideran más representativos los ensayos realizados a 500 Lx, los cuales generaron una tasa promedio de remoción en torno a $2,1 \pm 0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y ajustes apropiados en términos de regresión (fig. 22 a). Sin embargo no fue posible establecer diferencias estadísticas entre tratamientos.

a)



b)



c)

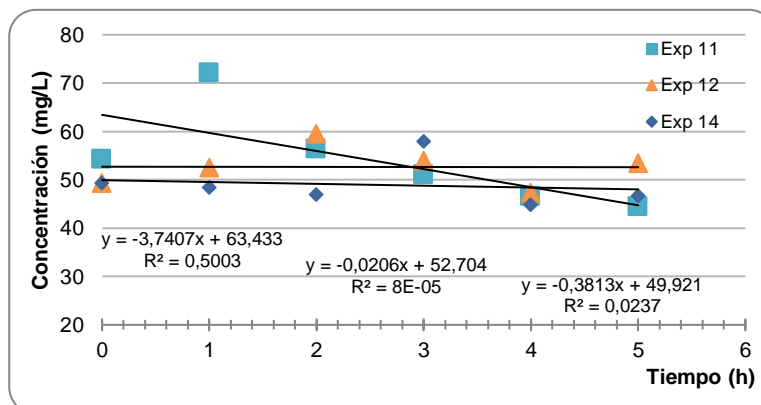
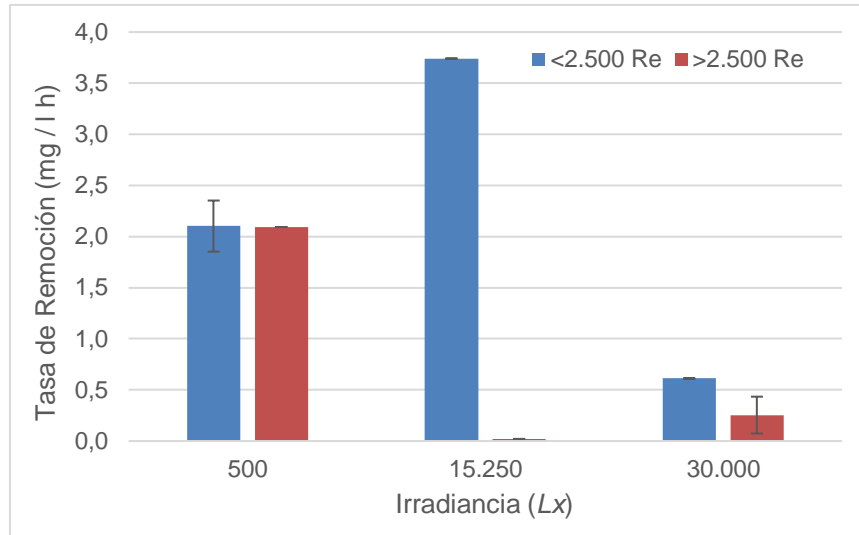


Figura 22. Estimación a través de regresión lineal de las tasas de remoción de nitrato en RIL sometido a diversa condiciones de mixotrófica en reactor tipo batch.

a)



b)

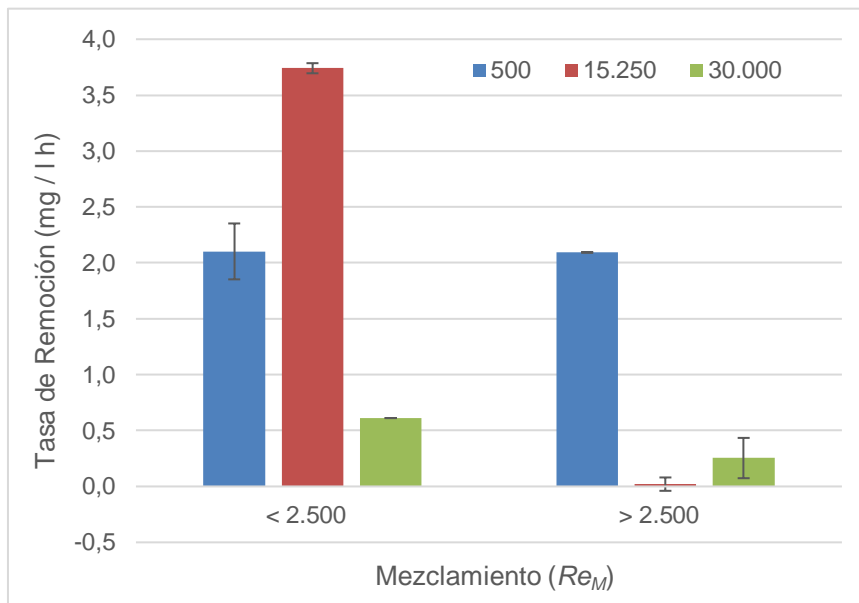


Figura 23. Tasa de remoción de nitrato en RIL sometido a condiciones diferenciadas de; a) Irradiancia y b) Mezclamiento en fotobiorreactor tipo batch recirculado.

4.2 OBJETIVO B

4.2.1 ENSAYO PRELIMINAR

El ensayo preliminar mostro un comportamiento bastante similar entre las concentraciones de amonio del afluente y el efluente control (sin microalgas) (fig. 24). Similar situación acontece respecto al efluente con biomedios inoculado, sin embargo, la tendencia señalada se modifica drásticamente desde las 30 horas de funcionamiento. A partir de aquí se observa una clara y sostenida diferencia entre el afluente y efluente (tratamiento), lo que daría cuenta de un comportamiento más uniforme y constante. Así mismo los resultados muestran una cierta adaptación del cocultivo desde la siembra de los biomedios hasta una efectiva constante remoción de nutrientes.

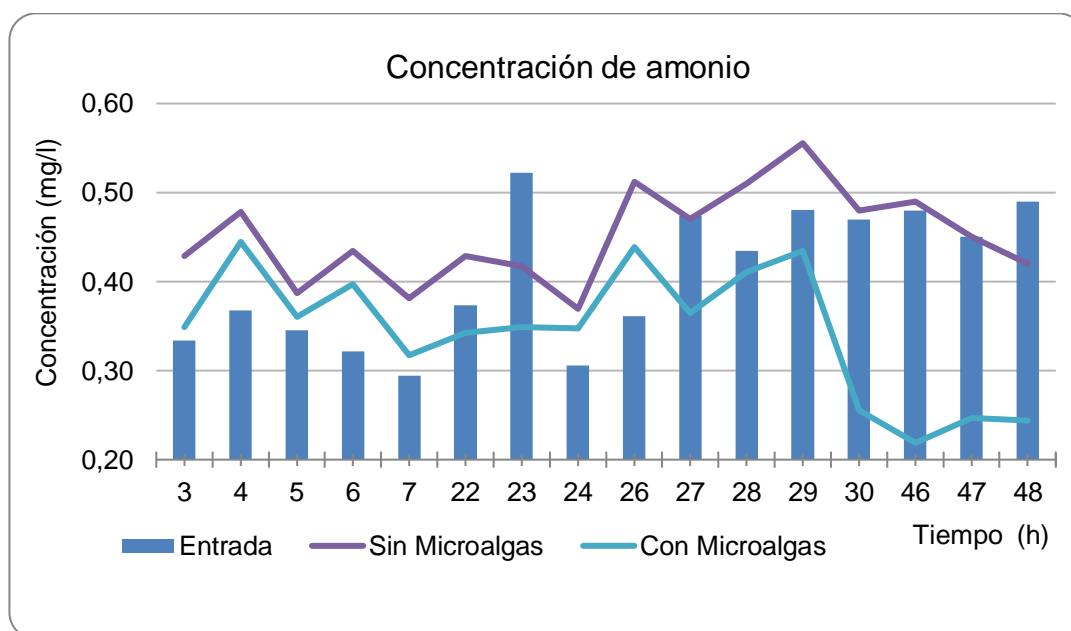


Figura 24. Variación de la concentración de amonio en fotobiorreactor continuo en 48 horas de funcionamiento.

4.2.2 CONCENTRACION DE NUTRIENTES EN FOTOBIORREACTOR CONTINUO.

En la figura 25, es posible visualizar el comportamiento de la concentración de amonio entre el afluente y el sistema de tratamiento mixotrófico. Durante las primeras horas del ensayo no se observan diferencias importantes,

tendiendo posteriormente a incrementar el gradiente, esto perdura por un corto lapso durante el primer día de funcionamiento, todo lo cual da cuenta de un comportamiento bastante irregular respecto a la remoción del amonio por parte del cocultivo encapsulado.

La situación descrita anteriormente, se modifica sustancialmente a las 24 horas de la siembra. A partir de instante, se observa un comportamiento mucho más regular de las concentraciones y un diferencial entre las misma, lo que da cuenta de una efectiva remoción del amonio en un régimen más uniforme del sistema continuo implementado.

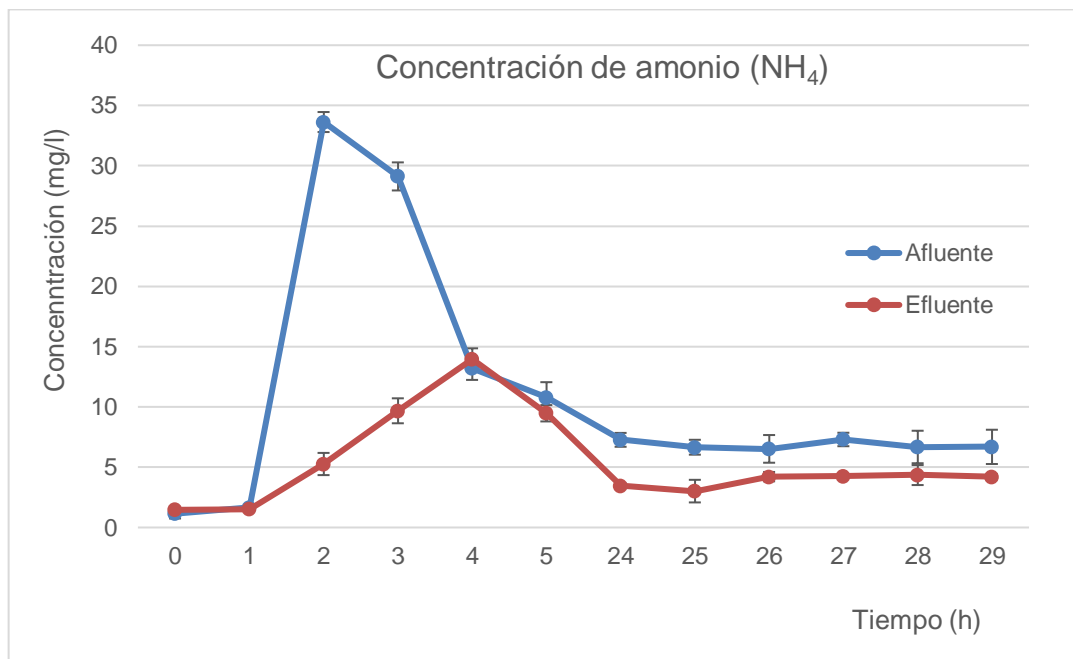


Figura 25. Variación de la concentración de amonio en fotobiorreactor continuo en 29 horas de funcionamiento.

Similar situación se puede apreciar en el comportamiento de reducción del nitrato en el sistema. Durante las primeras horas las concentraciones de ambos flujos permanecen relativamente constante, con cierta disminución, pero sin mayor diferencia entre ellos (fig. 26). Condición que se modifica considerablemente a las 24 horas de funcionamiento. A partir del segundo día se mantiene relativamente constante un gradiente del sistema.

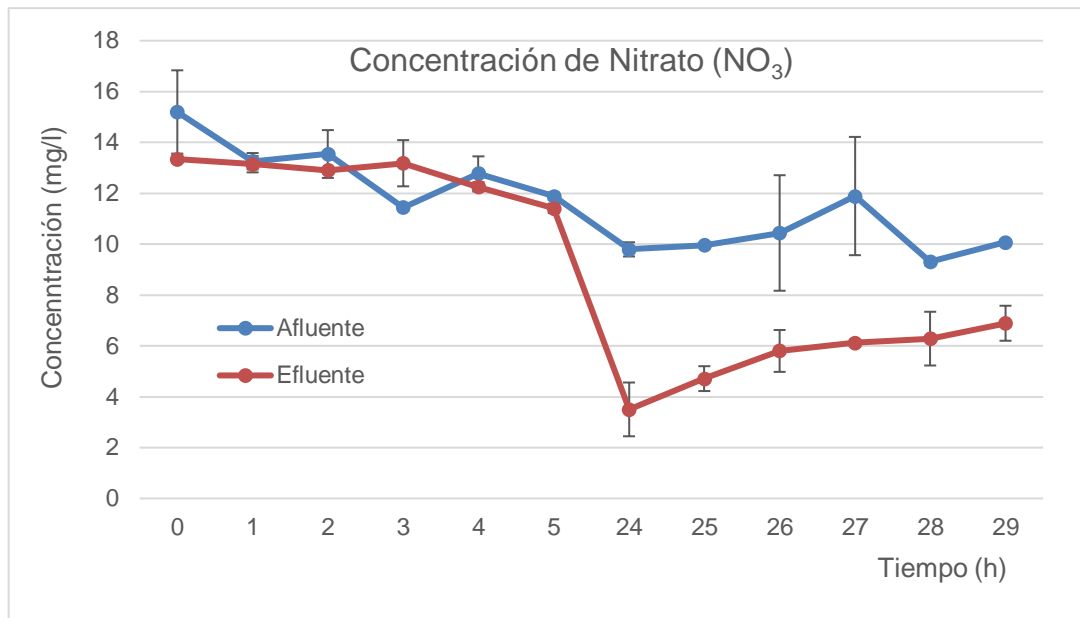


Figura 26. Variación de la concentración de nitrato en fotobiorreactor continuo en 29 horas de funcionamiento.

Respecto al comportamiento en la concentración del fosfato del sistema experimental, se puede indicar que hubo diferencias menores entre flujos en toda la experiencia (fig. 27), observándose un mayor gradiente a partir de las 24 horas de funcionamiento.

Por otra y tal como puede ser observado en el comportamiento general del cocultivo, independiente del tipo de nutriente, este requiere una etapa de adaptación, por al menos unas 24 horas desde la siembra en el reactor para llegar a un estado relativamente más característico de los sistemas continuos.

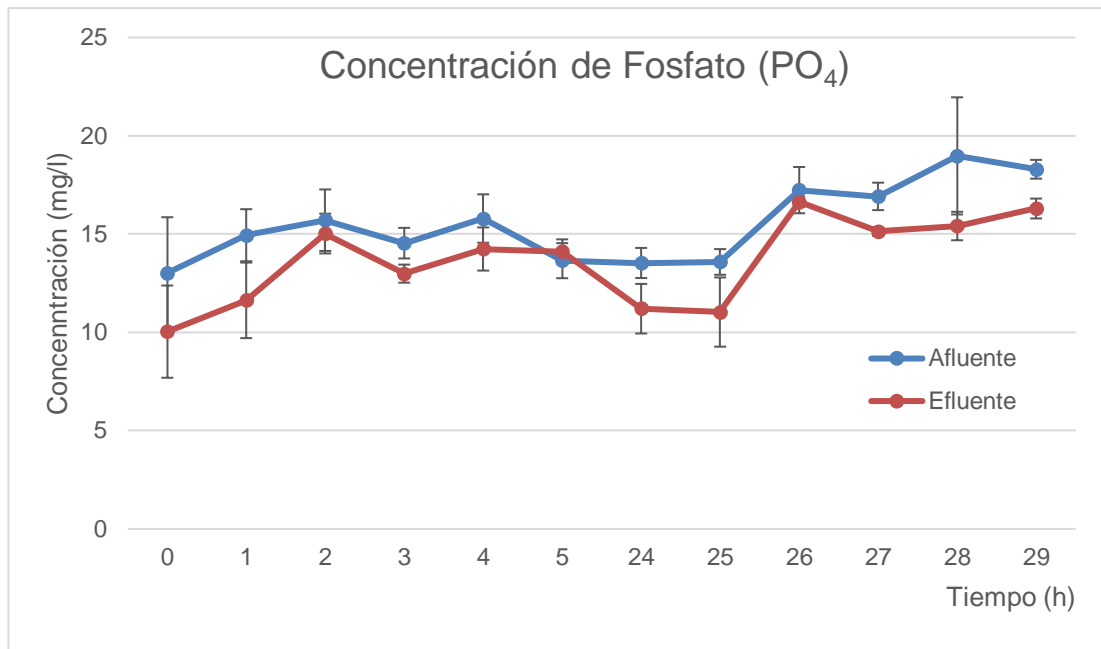


Figura 27. Variación de la concentración de fosfato en fotobiorreactor continuo en 29 horas de funcionamiento.

4.2.3 EFICIENCIA Y TASA DE REMOCION DE NUTRIENTES EN FOTOBIORREACTOR CONTINUO

Si solo se considera el comportamiento relativamente constante producido por el cocultivo mixotrófico de microalgas y bacterias nitrificantes a partir de las 25 horas de ensayo, es posible ratificar diferencias importantes entre los flujos de entrada y salida (fig. 28). Las diferencias señaladas dan cuenta de un proceso de continuo y con tasas de remoción considerables. Así mismo, se puede corroborar, que se existe un diferencial entre los efluentes depuración de los tres nutrientes contaminantes evaluados y afluentes de los mismos.

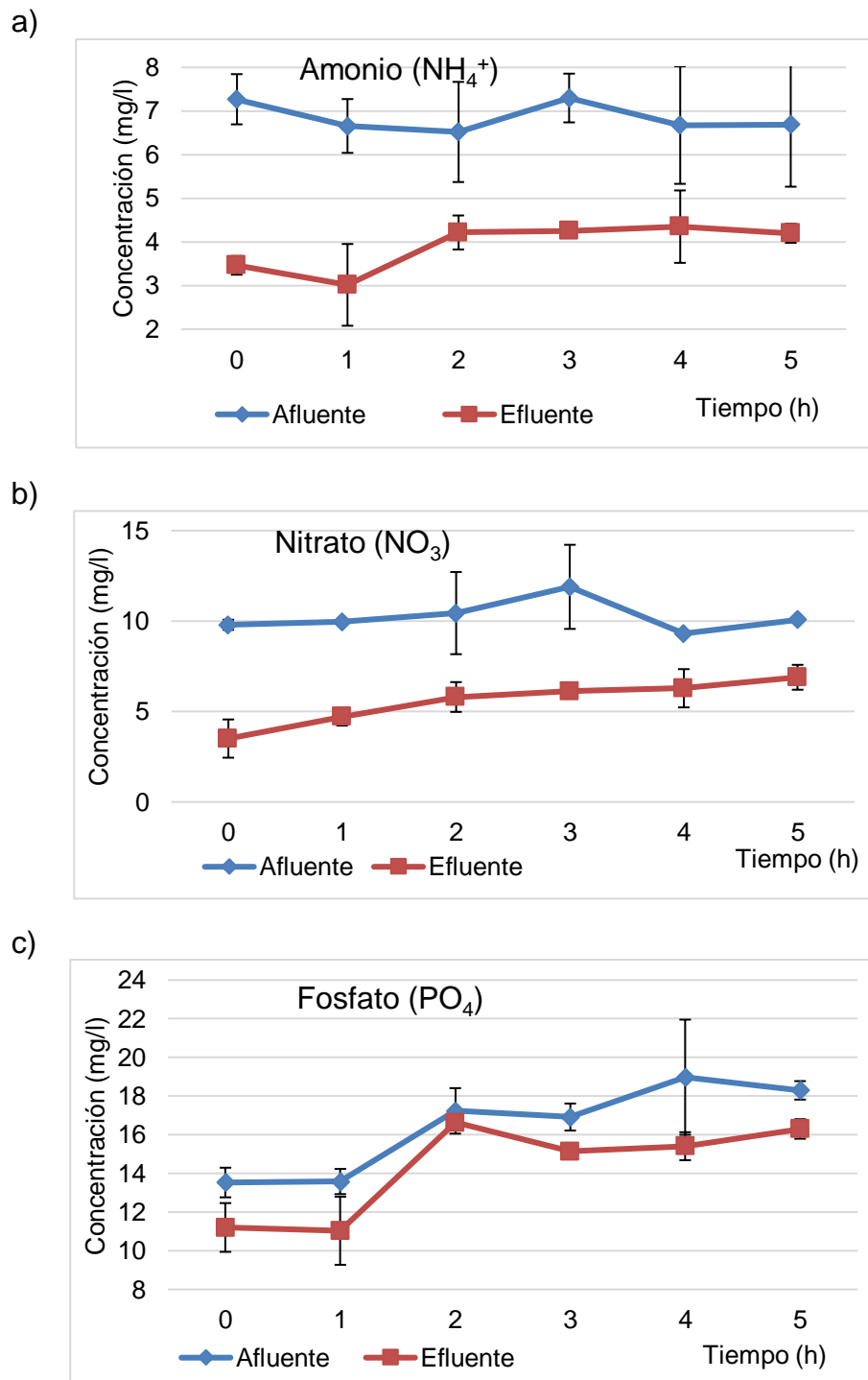


Figura 28. Variación de la concentración de nutrientes en fotobiorreactor continuo, a) amonio, b) nitrato y c) fosfato.

De la perspectiva de la remoción (PTR), la mayor razón porcentual de depuración en la fase continua, se obtuvo en la remoción de nitrato, con un 64,2 % (fig. 29) y en promedio la depuración del nitrato alcanzo los 45, 7 % ±

12,4 %. Por su parte las tasas más bajas fueron registradas para el fosfato que en promedio ascendió a $15,2 \% \pm 4,2 \%$.

Por su parte, el amonio y TAN fueron removido a una razón máxima mayor a 54,7 % y un promedio de $42,7\% \pm 8,8\%$, tal como puede ser apreciado en la figura 28. En la misma grafica se observa que la depuración del amonio tiene un comportamiento más estable, respecto a la remoción de nitrato y fosfato.

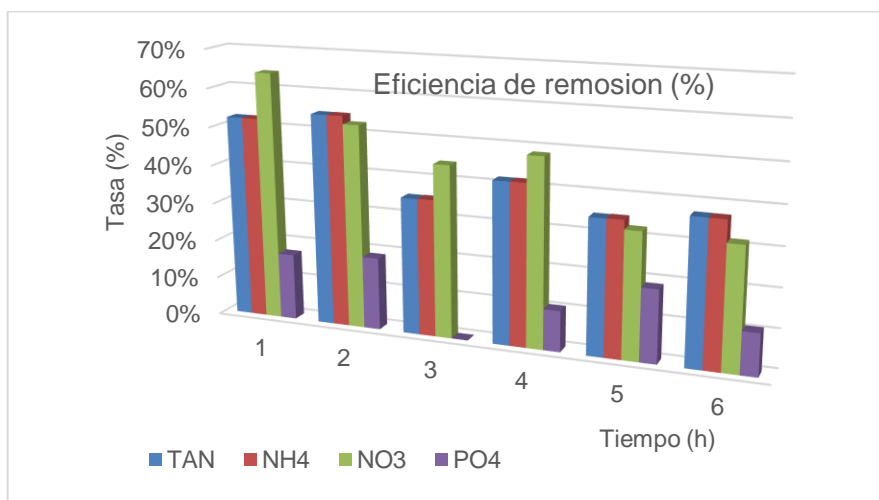


Figura 29. Remoción de nutrientes (PTR) en fotobiorreactor continuo.

Desde la perspectiva de la velocidad de remoción, se observó que las mayores tasas correspondieron al nitrato, con un promedio de $14,15 + 4,06 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mientras que la concentración del total de amonio nitrogenado (TAN), amonio y fosfato, disminuyeron en promedio a $8,91 \pm 2,03$, $8,85 \pm 2,02$ y $6,44 \pm 2,95 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (fig.30).

Si la remoción se asocia al área de filtración, representada por la superficie total del soporte en condición mixotrófica, se obtiene la tasa de remoción superficial (STR). En la figura 31, se grafican las tasas obtenidas para los diversos nutrientes, además se incorpora el Total de Amonio Nitrogenado (TAN), estimado a partir de la concentración de amonio y los parámetros abióticos de temperatura y pH, que durante los ensayos fluctuaron entre 13°C y $17,8^{\circ}\text{C}$ para el afluente, entre $13,1^{\circ}\text{C}$ y $18,2^{\circ}\text{C}$ en el efluente, mientras que el pH vario entre 6,8 y 7,2 en el caso del afluente y de 6,8 a 7,1 en el efluente. En las señaladas condiciones las mayores tasas superficiales de remoción en

promedio, fueron para Nitrato, TAN, Amonio y Fosfato, con $1,4 \pm 0,4$, $0,851 \pm 0,194$, $0,845 \pm 0,193$ y $0,6 \pm 0,3$ $\text{g m}^{-2} \text{dia}^{-1}$, respectivamente (tabla 9).

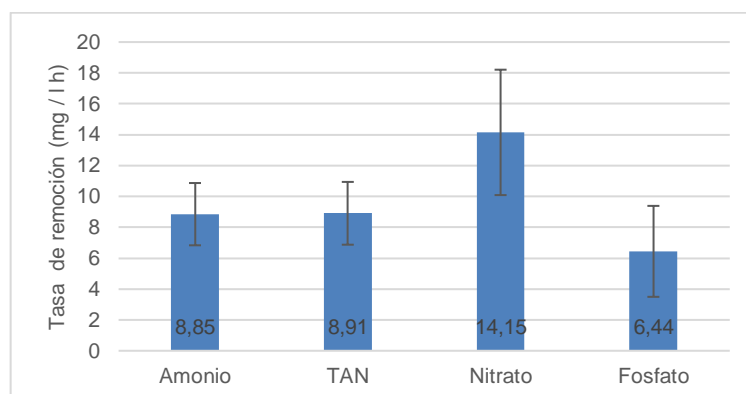


Figura 30. Tasa de remoción de nutrientes en fotobiorreactor continuo.

Así mismo las tasas de remoción volumétrica promedio (VTR), que consideran en su estimación el volumen de biomedios en cocultivo, generaron un depuración de $2.702,7 \pm 775,8$, $1.701,2 \pm 388,5$, $1.690,6 \pm 385,4$, $1.230,2 \pm 562,8$ $\text{g m}^{-3} \text{dia}^{-1}$ para Nitrato, TAN, Amonio y Fosfato, respectivamente (fig. 32 y tabla 9).

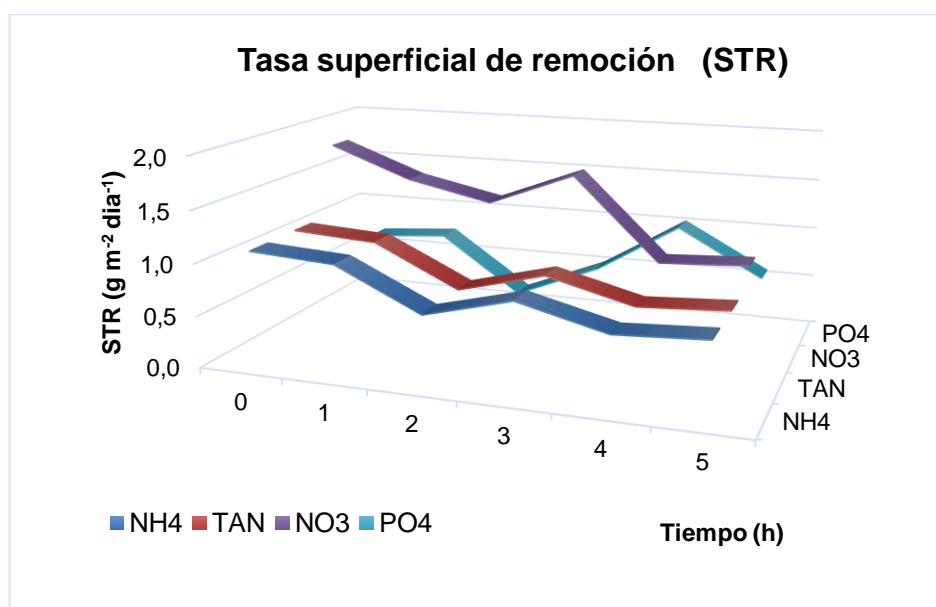


Figura 31. Tasa superficial de remoción de nutrientes (STR) en fotobiorreactor continuo. TAN⁵.

⁵ En agua, el amoníaco existe en dos formas: amoníaco no ionizado, NH_3 , y amonio ionizado, NH_4^+ . La concentración relativa de cada una de estas formas está en función del pH, temperatura y salinidad (Anthonisen et al., 1976). La suma de NH_4^+ y NH_3 , generalmente se define como total amonio nitrogenado (TAN) o simplemente amoníaco (Ebeling et al. 2006).

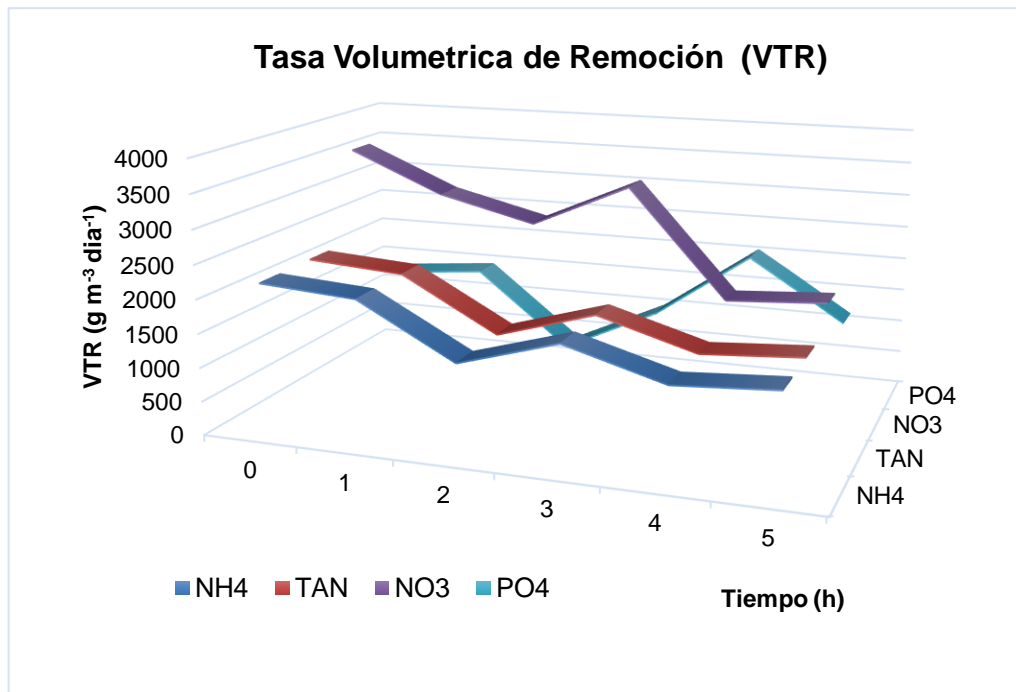


Figura 32. Tasa volumétrica de remoción de nutrientes (VTR) en fotobiorreactor continuo.

Tabla 9. Tasas superficiales y volumétricas de remoción de nutrientes.

| | Tasa de Remoción | | | | | | | |
|-----------|------------------|---------|-------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|
| | SUP | VOL | SUP | VOL | SUP | VOL | SUP | VOL |
| | NH ₄ | | TAN | | NO ₃ | | PO ₄ | |
| | 1,096 | 2192,91 | 1,104 | 2207,06 | 1,81 | 3624,19 | 0,67 | 1339,23 |
| | 1,05 | 2097,60 | 1,06 | 2110,78 | 1,51 | 3020,16 | 0,73 | 1467,65 |
| | 0,66 | 1326,89 | 0,67 | 1333,26 | 1,34 | 2671,68 | 0,17 | 342,45 |
| | 0,88 | 1752,39 | 0,88 | 1764,85 | 1,66 | 3322,18 | 0,51 | 1027,35 |
| | 0,67 | 1340,47 | 0,67 | 1346,54 | 0,87 | 1742,40 | 1,03 | 2054,71 |
| | 0,72 | 1433,52 | 0,72 | 1444,81 | 0,92 | 1835,33 | 0,57 | 1149,66 |
| Minima | 0,66 | 1326,89 | 0,67 | 1333,26 | 0,87 | 1742,40 | 0,17 | 342,45 |
| Maxima | 1,10 | 2192,91 | 1,10 | 2207,06 | 1,81 | 3624,19 | 1,03 | 2054,71 |
| Promedio | 0,85 | 1690,63 | 0,85 | 1701,22 | 0,30 | 605,51 | 1,35 | 2702,66 |
| D. E. (±) | 0,19 | 385,42 | 0,19 | 388,48 | 0,39 | 775,78 | 0,28 | 562,82 |

SUP: Superficial ($\text{g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$); VOL: Volumétrica ($\text{g m}^{-3} \text{ día}^{-1}$); D.E.: desviación estándar.

CAPITULO 5

DISCUSION DE RESULTADOS

Durante la última década, se ha investigado la capacidad de remoción de nutrientes de aguas residuales mediante microalgas Kim et al., (2013) y más recientemente se han desarrollado algunas escasas investigaciones relacionadas a la capacidad de depuración de aguas residuales de acuicultura mediante cultivos mixotróficos encapsulados en matriz polimérica, Ruiz-Güereca et al (2016), Del Canto (2019). Sin embargo, los autores referidos experimentaron en laboratorio en sistema Batch. En la presente investigación, el análisis de abatimiento en la concentración de amonio, nitrato y fosfato por parte del cocultivo de microalgas y bacterias nitrificantes encapsuladas en matriz polimérica, se realizó en sistema “Batch Recirculado” con RIL acuícola y “Continuo” como parte integrante de un RAS para cultivo de salmónidos.

5.1 DEPURACION DE NUTRIENTES EN SISTEMA BATCH RECIRCULADO

En general los ensayos arrojaron disminución en las concentraciones de amonio, como así también en las tasas de depuración de amonio que fluctuaron entre 0,14 y 0,24 mg L⁻¹ h⁻¹. Así, los ensayos que fueron tratados a una irradiancia de 15.250 Lx, generaron más de 86,5% de remoción global. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Su et al. (2012), quienes en un sistema por lotes a 7.000 Lx, registraron 91% en 10 días o González et al. (2008) que utilizando como sustrato amonio a concentraciones entre 120 y 250 mg L⁻¹ y 10.000 Lx, obtuvieron un 99% de remoción en 24 horas de funcionamiento. Mientras que Lananam et al (2014) obtuvo un 99,82% ± 1,09% en 10 días de funcionamiento en sistema por lote con cocultivo suspendido de microorganismo *EM-1* y *Chlorella sp.*, y concentraciones iniciales de 5,59 ± 0,32 mg L⁻¹.

Así también si consideramos que las condiciones experimentales se mantuvieron en 10 °C y 7 de pH y que la máxima tasa de disminución en la concentración de amonio bordeó los 0,24 mg L⁻¹ h⁻¹, el TAN asociado al NH₄ evaluados, bordearían las mismas magnitudes; mientras que Lananam et al.

(2014), generaron una tasa de remoción de amonio $0,015 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y Ramli et al., (2017), informan una tasa de remoción de $0,03 \text{ mg TAN L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, utilizando un alga epifita encapsulada en alginato y agua artificial, similar a RIL acuícola, que aunque para estos autores fue superior a las microalgas no encapsuladas también evaluadas por ellos, es diez veces inferior a lo obtenido por el presente estudio. Lo cual implicaría que la condición mixotrófica favorece la remoción del amonio tal como lo demuestran De-Bashan et al. 2002, quienes con un cocultivo inmovilizado en alginato de *Azospirillum brasilense* y *Chlorella vulgaris* en formato batch, obtuvieron una tasa de depuración del orden de $0,06 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, cuando la concentración inicial ascendió a 3 mg L^{-1} ; de la misma forma Shen et al., 2017, inmovilizando *Pseudomonas putida* y *Chlorrella vulgaris* en sistema batch y concentraciones iniciales de 50 mg L^{-1} , registraron tasas de remoción de amonio en las seis primeras horas, en torno a $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Por otra parte bajo los tratamientos evaluados se registró remoción del nitrato de forma muy irregular, con un comportamiento bastante errático, generándose inclusive aumento en la concentración de nitrato en las primeras horas en algunos de los ensayos, para posteriormente incrementar la remoción en el tiempo, lo que estaría dando cuenta de un periodo inicial en que solo las bacterias nitrificantes realizaron su trabajo, transformando de amonio a Nitrito, mientras que las microalgas del cocultivo requirieron de algunas horas para comenzar a consumir el nitrato disponible. A pesar de lo anterior y analizando el periodo, se produjo un decaimiento en la concentración de nitrato en torno a $1,47 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Por su parte las mayores tasas de remoción global ocurrieron hacia el final de los ensayos no sobrepasaron el 41 % a su haber, mientras que las tasas de remoción volumétrica se presentaron en las primeras cinco horas, con máximos de $2,1$ y $3,74 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Los mejores resultados obtenidos, recayeron en los ensayos realizados en condiciones de mezclamiento de menos de 2.500 Re_M y de 500 a 15.250 Lx de irradiancia, siendo en el sistema de mayor energía lumínica la que arrojó los mejores resultados. Ramli et al (2017), utilizando un alga epifita encapsulada en alginato y agua similar a RIL acuícola, a una carga inicial de 10 mg L^{-1} , obtuvo tasas volumétricas de remoción de nitrato, entre $0,021$ y $0,028$

mg L⁻¹ h⁻¹, valores extremadamente inferiores alcanzados por el presente estudio, sin embargo cabe mencionar que las concentraciones de carga del presente estudio, fueron diez veces mayores a las utilizadas por Ramli et al. (2017).

Desde la perspectiva de la depuración del fosfato por parte del sistema mixotrófico, es posible establecer que al cabo de 17 horas de funcionamiento, se produce en términos generales, una de remoción global en torno al 80 %, mientras que la tasa volumétrica al cabo de las cinco horas de funcionamiento bordeó 0,57 mg L⁻¹ h⁻¹. Sin embargo las máximas remociones globales se registraron en el tratamiento donde se aplicó irradiancia entre 15.250 y 30.000 Lx, indistintamente al factor de mezclamiento que se utilizara. Situación algo distinta respecto a la tasa de remoción, esta si está claramente influenciada por el mezclamiento, siendo las mayores tasas aquellas producidas en ambiente de Re_M mayores a 2.500 e irradiancia entre 15.250 y 500 Lx.

En términos generales y según lo descrito por Lananam et al. (2014) obtuvieron una remoción global de 99,14% \pm 1,77% en 6 días de funcionamiento, además de una tasas en torno a 0,012 mg L⁻¹ h⁻¹ en sistema batch y cocultivo suspendido de microorganismo *EM-1* y *Chlorella sp.*, y concentraciones iniciales de 6,75 \pm 0,29 mg L⁻¹. Ruiz-Güereca et al. (2016), quienes manipulando la microalga *Stigeoclonium nanum* y *Azospirillum brasilense* encapsuladas en alginato, abatieron en siete días alrededor del 45% de fosfato en un RIL artificial similar a RIL acuícola. Considerando el periodo de tiempo informado por el autor, las remociones globales generadas por el sistema mixotrófico de presente estudio, serían ampliamente superiores y más próxima a lo descrito por De-Bashan et al. (2002), quienes lograron en un cocultivo batch de *Azospirillum brasilense* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en esferas de alginato y sustrato artificial similar a aguas residuales domésticas, un 65 % de remoción de fosfato en 48 horas y más recientemente, Shen et al. (2017) ensayando con agua residuales y un cocultivo inmovilizado de *Pseudomonas putida* - *Chlorella vulgaris*, obtuvo cerca del 100% de depuración en 18 horas.

Tanto microalgas como bacterias son sensibles a su entorno. La temperatura, pH, el mezclamiento o turbulencia, la intensidad y patrón de la luz, las concentraciones de nutrientes, oxígeno disuelto, CO₂ y algunos otros factores pueden influir en su rendimiento de diferentes formas. Por tanto, es necesario tenerlos en cuenta y optimizar el entorno de tratamiento, sin embargo el análisis de influencia de los factores debe ser abordado por indicador nutriente e indicador. En dicho contexto en la tabla 10 se presenta los factores evaluados y los niveles de desempeño establecidos a través de la remoción global y tasa volumétrica.

La diferencia en términos globales en la remoción de amonio y nitrato, indicaría que las microalgas prefieren la fuente de amonio para cubrir su requerimiento de nitrógeno en desmedro del nitrato lo que es ratificado por varios autores como, Parker et al. (2012) y Ramli (2017). Así mismo, (Hii et al. 2011) mostró que *Nannochloropsis* sp., prefiere el amonio sobre el nitrato. Lo descrito por estos autores podría explicar el errático comportamiento de la concentración de nitrato (fig. 20), si se compara con las curvas de amonio (fig. 12) del presente estudio; al parecer se requiere de un proceso de mayor de adaptación en el sistema en lo que a remoción de nitrato se refiere.

Desde la perspectiva del amonio y considerando solo la remoción global, la irradiancia a 15.250 Lx y una leve desviación hacia mezclamiento de Reynolds mayores a 2.500, posee un mayor efecto sobre la depuración que el resto de los niveles de los factores. Si agregamos a lo anterior, la tasa de remoción, la situación difiere levemente, irradiancias en el rango de 500 a 15.250 Lx y mezclamiento con Reynolds mayores a 2.500 presenta las máximas tasas de depuración. Así podríamos afirmar que la Irradiancia afecta más que el mezclamiento, dado que el efecto producido por la iluminación, reside en la entrega de energía lumínica necesaria para que los organismos fototróficos realicen eficientemente el proceso de fotosíntesis (Ghassemi et al. 2018), sin llegar al punto de fotoinhibición a causa del exceso de luz (Huang, Jiang, Wang, & Yang, 2017), situación que probablemente ocurrió con los ensayos sometidos a 30.000 Lx y que afecto el crecimiento celular tal como describe

Kurniawati et al. (2016), quienes mostraron que la tasa de crecimiento óptima de *S. dimorphus* estaba en torno a la intensidad de 12.500 Lx.

Tabla 10. Resumen de indicadores de remoción de nutrientes en fotobiorreactor en batch.

| Factores | | Remoción Global (%) | | | Tasa de Remoción (mg L ⁻¹ h ⁻¹) | | |
|------------------|---------------------------------|---------------------|---------|---------|--|---------|---------|
| Irradiancia (Lx) | Mezclamiento (Re _M) | Amonio | Nitrato | Fosfato | Amonio | Nitrato | Fosfato |
| 500 | < 2.500 | 70,0% | 26,2% | 64,7% | 0,17 | 2,10 | 0,48 |
| | > 2.500 | 83,9% | 40,8% | 73,2% | 0,23 | 2,09 | 0,68 |
| 15.250 | < 2.500 | 86,7% | 32,5% | 86,6% | 0,15 | 3,74 | 0,61 |
| | > 2.500 | 87,8% | 30,2% | 85,3% | 0,24 | 0,02 | 0,65 |
| 30.000 | < 2.500 | 80,9% | 28,6% | 81,6% | 0,14 | 0,61 | 0,45 |
| | > 2.500 | 85,3% | 32,6% | 86,8% | 0,19 | 0,25 | 0,58 |

Para el caso de Nitrato, el rango de irradiancia entre 500 a 15.250 Lx y mezclamiento alto (> 2.500 Re_M), provoco, tanto en términos globales y de velocidad de remoción, los mayores índices en el abatimiento de nitrato. Permitiendo ratificar que el factor de irradiancia es predominante, respecto al factor mezclamiento en el funcionamiento de un cocultivo de bacterias nitrificantes y microalgas. Lo anterior es coincidentes a los resultados obtenidos en el batimiento del fosfato, cuando analizamos su comportamiento en términos de las tasas de remoción, estas también son máximas en el rango de 500 a 15.250 Lx y Reynolds altos, sin embargo desde la perspectiva global, la remoción es máxima a 30.000 Lx, independiente del nivel de mezclamiento, lo que difiere en tendencias con el abatimiento del resto de los nutrientes.

El principal efecto del mezclamiento producto de los flujos de recirculación del RIL y aire, corresponde a la homogeneización de la mezcla entre las fase líquida y biomedios, para que los nutrientes diluidos en el RIL, sean utilizados eficientemente por los microorganismos que cohabitan en los biomedios, además el mezclamiento, contribuye a evitar la acumulación ya sea de CO₂ y

O₂ que puede resultar en estrés oxidativo, tanto para las microalgas como para las bacterias presentes en el biomedio; otro efecto del mezclado por gas, se refiere a que puede proporcionar breves periodos de ciclos luz/oscuridad (Gupta, Lee, & Choi, 2015). Si bien los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que la irradiancia tiene una influencia mayor que el mezclado sobre la remoción de los nutrientes, se puede observar que con mezclas sobre 2.500 Re_M se obtienen las mayores depuraciones, ya sea en términos globales o de velocidad de abatimiento.

Si bien cada uno de los factores estudiados en esta investigación, posee un efecto particular sobre el sistema, la irradiancia en el rango de 500 a 15.250 Lx y mezclado sobre 2.500 Re_M , contribuyen de mejor manera al proceso de depuración de los tres nutrientes contaminantes. Sin embargo, el rango de irradiancia definido en el diseño de la experiencia es bastante amplio y no permite discriminar y/o recomendar valores para ser utilizados en aplicaciones prácticas; pero autores como Kurniawati et al. (2016), evaluando el criamiento de *S. dimorphus* con irradiancia de 7.500, 10.000 y 12.500 Lx , obtuvo los óptimos resultados con la última de la mencionada intensidad luminosa.

5.2 DEPURACION DE NUTRIENTES EN SISTEMA CONTINUO

Los resultados del ensayo preliminar en formato continuo, permiten establecer el alto impacto de la presencia de microalgas en el proceso de depuración de amonio, sin embargo, el objeto del mismo, más que cuantificar la remoción fue establecer los tiempos de adaptación requeridos por el cocultivo de microalgas y bacterias, puesto que los antecedentes indicaban que el funcionamiento de un sistema continuo conlleva una serie de factores de compleja interacción pero permite elegir a voluntad la velocidad específica de crecimiento y mantener la población en un estado fisiológico definido, constante y seleccionable, Acevedo y Gentina (2004).

Establecido que el sistema continuo requiere de al menos 24 a 48 horas de aclimatación eso queda de manifiesto en los resultados obtenidos en la remoción de los nutrientes, principalmente para amonio y nitrato.

Desde la perspectiva de la eficiencia el sistema ensayado logro las máxima remoción de 64,2 %, 18,8 %, 54,67 % y 54,69 % para nitrato, fosfato, amonio y TAN, respectivamente. Siendo la depuración de amonio y TAN, los que mantienen una remoción más regular durante el ensayo. Así mismo, las velocidades de remoción obtenidas en el presente estudio, superaron a lo informado por varios autores (tabla 11), quienes experimentaron con mono y cocultivo de microalga/bacteria. Lo anterior podría ser producto de las especies de microalgas utilizadas y las mayores concentraciones de nutrientes informadas para nitrato y fosfato. En tanto las tasas de remoción alcanzadas en el presente estudio oscilaron entre 8,91 y 8,85 mg L⁻¹ h⁻¹ para el TAN y amonio respectivamente, valores superiores a lo registrado por De-Bashan et al. (2002); Shen et al. (2017) quienes obtuvieron rangos de remoción de amonio entre 0,12 y 1,32 mg L⁻¹ h⁻¹, y Ramli et al. (2018) registro 0,21 mg L⁻¹ h⁻¹ para depuración de TAN. Estos últimos autores también informan remociones entre 0,29 y 0,76 mg L⁻¹ h⁻¹ para nitrato, lo que contrasta notoriamente con el resultado de esta investigación que removió el señalado nutriente en torno a 14 mg L⁻¹ h⁻¹. Cabe destacar que la diferencia fundamental entre ambos estudio radicaría en la condición mixotrófica al que fueron sometidos los nutrientes en el presente estudio. Por su parte Shen et al. (2017) obtuvieron una depuración de fosfato de 0,23 mg L⁻¹ h⁻¹, valor bastante inferior al promedio de 6,44 mg L⁻¹ h⁻¹ registrado en la experiencia desarrollada en el cocultivo mixotrófico en formato continuo.

Para comparar el sistema evaluado en este estudio, con biofiltros nitrificantes que han sido utilizado tradicionalmente para el manejo del nitrógeno en aguas residuales de origen acuícola, se considera el total de amonio nitrogenado, tanto del punto de vista de eficiencia global como de las tasas de remociones superficiales y volumétricas, que corresponden a indicadores que relacionan la velocidad de depuración con el área superficial y volumen de los biomedios (soporte), respectivamente.

Así, en esta investigación la remoción ascendió a cerca del 55%; mientras que algunos autores como Zhan y Liu (2013) utilizando un Biofiltro de arena fluidizada en un cultivo RAS de truchas arco iris y carpa común, eliminaron el TAN a una razón entre 80% y 95%. Por su parte Sánchez y Matsumoto (2012) utilizaron un lecho fluidizado trifásico a un TRH de 12 min para la tilapia del Nilo cultivada RAS, encontraron que la eficiencia media de eliminación de TAN era de 27%. Shnel et al. (2002), investigaron la eficiencia de eliminación de TAN, utilizando una combinación de filtro de pantalla, filtro percolador y reactor de lecho fluidizado encontró que la eliminación total de TAN fue de aproximadamente 65,21%.

Tabla 11. Remociones de nutrientes contaminantes informadas en mono y cocultivo inmovilizado de microalgas y bacteria en sistema continuo.

| Fuente Sustrato | Especies alga/bacteria | Nitrógeno inicial (mg L ⁻¹) | Eliminación informada | Eliminación calculada (mg L ⁻¹ h ⁻¹) | Referencia |
|-------------------------------|--|--|--|---|-------------------------|
| Aguas residuales artificiales | <i>Azospirillum brasilense</i> - <i>Chlorella vulgaris</i> inmovilizadas | NH ₄ : 3,2 PO ₄ : 28,3 | 92% y 0% en 2 días, respectivamente. | NH ₄ : 0,12 PO ₄ : 0 | De-Bashan et al. (2002) |
| Aguas residuales municipales | <i>Pseudomonas putida</i> - <i>Chlorella vulgaris</i> , inmovilizadas | NH ₄ : 49,23 ±1,32 PO ₄ : 12,83 ±1,05 | 96,8 % para NH ₄ y 64,6% para PO ₄ (en 36 h y 30 min TRH) | NH ₄ : 1,32 PO ₄ : 0,23 | Shen et al. (2017) |
| Aguas residuales RAS | <i>Stigeoclonium nanum</i> inmovilizada | TAN: < 1 mg/L NO ₃ : 130 app. | TAN: 5 mg/L día (por 4 días); NO ₃ : 110 (mg/l en 6 días) y 90 (mg/l en 13 días) | TAN: 0,21 NO ₃ : 0,76 a 0,29 | Ramli et al. (2018) |

Mientras que las tasas de remociones superficiales y volumétricas de TAN, registraron valores promedio de 0,85 g día⁻¹ por cada m² de superficie del biomedio y 1.700 g día⁻¹ por cada m³ de biomedio (soporte). Estos niveles de remoción de TAN registrados en el sistema mixotróficos son superiores a los descritos por Suhr y Pedersen (2010) quienes encontraron que biofiltros con alta porosidad y superficie específica moderada, eliminan TAN a una tasa superficial de 0,46 g m⁻² día⁻¹ o Miller y Libey (1985) que obtuvieron tasas de remoción de TAN, entre 0,19 - 0,79 g m⁻² día⁻¹. Brasil (2006) también informó

que la tasa promedio de remoción obtenida por un biofiltro en un RAS de tilapia logro remover $0,42 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$.

Y visto desde la perspectiva volumétrica, las tasas descrita según Song et al. (2012), quienes investigaron la función de nitrificación de un bofiltro asociado a RAS, demostrando que cuando la TRH era de 10 min, la tasa de eliminación de TAN volumétrico ascendía a $110,2 \text{ g m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$. Tseng y Wu (2004) informaron que la capacidad de tratamiento biológico del bifiltro podría alcanzar $1.200 \text{ g m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ con 23 mg L^{-1} de TAN en el afluente de un sistema de agua cálidas. Mientras que Wortman y Wheaton (1991) evaluaron RILes provenientes de cultivos de agua fría y cálida, en esta última, la capacidad de eliminación de TAN alcanzó $1.200 \text{ g m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$ cuando la concentración de nitrógeno amoniacal del afluente fue de 2 a 3 mg L^{-1} ; en agua fría, la eficiencia de eliminación fue menor, aproximadamente $600 \text{ g m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$. Timmons et al. (2006) utilizó un filtro de partículas Fingerlakes Aquaculture para medir el rendimiento de nitrificación; removiendo $1.100 \text{ g m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$, 299° K temperatura en el agua y $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ de TAN afluente.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Dado los resultados obtenidos en la investigación desarrollada sobre el cocultivo de Microalgas *Tetradismus dimorphus* y Bacterias Nitrificantes aisladas desde un cultivo de salmónidos e inmovilizadas en matriz polimérica, se puede concluir que:

- a) El factor irradiancia (Lx) posee un mayor efecto en el abatimiento de nutrientes respecto al mezclamiento (Re_M), cuando se utiliza un sistema batch recirculado.
- b) La irradiancia, en el rango de 500 a 15.250 Lx y mezclamiento sobre 2.500 Re_M , contribuyen de mejor manera al proceso de depuración de los tres nutrientes evaluados en un sistema batch recirculado.
- c) El cultivo mixto es capaz de remover simultáneamente amonio, total del amonio nitrogenado (TAN), nitrato y fosfato de un RIL acuícola.
- d) El cultivo mixto instalado en un fotobiorreactor continuo removió; amonio, TAN, nitrato y fosfato a una tasa aproximada de 8,8 ; 8,9 ; 14 y 6,4 $mg L^{-1} h^{-1}$, respectivamente. Valores entre un 84,6% y 97,6% superiores a lo informado por otras iniciativas mixotróficas experimentales.
- e) El cultivo mixto instalado en un fotobiorreactor continuo, es capaz de remover diariamente el TAN, a un promedio de 0,8 gramos por cada m^2 de biomedio y 1,7 kilogramos por cada m^3 de biomedio, lo que representa un 85% y 100% más, respectivamente, de lo depurado por biofiltros nitrificantes utilizados en acuicultura.

REFERENCIAS

1. Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A.A., Ibraheem I.B.M (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 257-275.
2. Acevedo F. y Juan C. Gentina M. (2004). *Cinetica de Fermentaciones: Fundamentos de la Ingeniería Bioquímica* Santiago, Chile: Eds. Universitarias de Valparaiso de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
3. Afshin J. Ghajar & Swanand M. Bhagwat, (2013). Effect of Void Fraction and Two-Phase Dynamic Viscosity Models on Prediction of Hydrostatic and Frictional Pressure Drop in Vertical Upward Gas–Liquid Two-Phase Flow, *Heat Transfer Engineering*, 34:13, 1044-1059, DOI: 10.1080/01457632.2013.763541.
4. Anthonisen A.C., R.C. Loehr, T.B.S. Prakasam, E.G. Srinath (1976). Inhibition of nitrification of ammonia and nitrous acid. *Journal Water Pollution Control Federation*, 48 (5), pp. 835-852.
5. Apandi, N.M., Mohamed, R., Al-Gheethi, A., Gani, P., Ibrahim, A. & A.H. Kassim (2019). Microalgal biomass production through phycoremediation of fresh market wastewater and potential applications as aquaculture feeds. *Environ Sci Pollut Res* 26, 3226-3242. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3937-3>.
6. Avnimelech Y., M. Lacher (1979). A tentative nutrient balance for fish ponds *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 31, pp. 3-8.
7. Awad, M. M., (2012). Two-Phase Flow, An Overview of Heat Transfer Phenomena, Dr M. Salim Newaz Kazi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/54291. Available from: <http://www.intechopen.com/books/an-overview-of-heat-transfer-phenomena/twophase-flow>.
8. Ayesha S., S. Malik, H. Zhu, J. Xu, M Z. Nawaz, S. Nawaz, Md. A. Alam & M. A. Mehmood (2020). Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of the Total Environment* 704. 135303. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>.

9. Badiola, M., Mendiola, D., & Bostock, J. (2012). Recirculating aquaculture systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*. 51, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.004>.
10. Bartoli M., Nizzoli D., Naldi M., Vezzulli L., Porrello S., Lenzi M., Viaroli P. (2005). Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): Denitrification versus Ulva uptake. *Marine Pollution Bulletin* 50.
11. Bashan L., Bashan Y. (2010). Immobilized micro algae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101 (2010) 1611-1627.
12. Bergheim A., T. Asgard (1996). Waste production in aquaculture. D.J. Baird, M.C.M. Beveridge, L.A. Kelly, J.F. Muir (Eds.), *Aquaculture and water resource management*, Blackwell Science, Oxford, pp. 50-80.
13. Beveridge M.C.M., M.J. Phillips, R.M. Clarke (1991). A quantitative and qualitative assessment of wastes from aquatic animal production D.E. Brune, J.R. Tomasso (Eds.), *Aquaculture and water quality*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 506-533.
14. Boelee N., Temmink H., Janssen M., Buisman C., Wijffels R. (2011). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms, *Water. Res.* 45, 5925-5933.
15. Bordel S., Guieysse B., Muñoz R. (2009). Mechanistic Model for the Reclamation of Industrial Wastewaters Using Algal-Bacterial Photobioreactors. *Environmental Science and Technology* June.
16. Boyd C. E, C. S. Tucker & B. Somridhivej (2016). Alkalinity and Hardness: Critical but Elusive Concepts in Aquaculture. *World Aquaculture Society*, Volume 47, Issue1. Pages 6-4. <https://doi.org/10.1111/jwas.12241>.
17. Boyd C. E. (1985). Chemical budgets for channel catfish ponds *Transactions of the American Fisheries Society*, 11, pp. 291-298.
18. Brazil BL (2006). Performance and operation of a rotating biological contactor in a tilapia recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 34: 261–274. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.06.005.

19. Bregnballe J. (2015). A Guide to Recirculation Aquaculture. Published by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and EUROFISH International Organisation. ISBN 978-92-5-108776-3, 95 pp.
20. Cakir F.Y., M.K. Stenstrom (2005). Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology. *Water Research*, Volume 39, Issue 17, 2005, Pages 4197-4203, ISSN 0043-1354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.042>.
21. Calicioglu O. and G.N. Demirer (2017). Carbon-to-Nitrogen and Substrate-to-Inoculum ratio adjustments can improve co-digestion performance of microalgal biomass obtained from domestic wastewater treatment. *Environ. Technol.*, 1-23. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1398784>.
22. Christenson L., Sims R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts, *Biotechnol. Adv.* 29, 686-702.
23. Cokro A. A., L. Yingyu, W. Rohan, C, Yeshi, N. Per. H. and S. Wuertz (2017). Non-denitrifying polyphosphate accumulating organisms obviate requirement for anaerobic condition. *Water Research*, Volume 111, Pages 393-403, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.006>.
24. Colt J., J. Lamoureux, R. Patterson, G. Rogers (2006). Reporting standards for biofilter performance studies. *Aquacultural Engineering*, Volume 34, Issue 3. Pages 377-388. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.002>.
25. Crab R., Avnimelech Y., Defoirdt t., Bossier P., Verstraete W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270, 1-14.
26. Dauda A.B., Ajadi A., Tola-Fabunmi A.S., Akinwole A.O (2019). Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems. *Aquaculture and Fisheries*. Volume 4, Issue 3, Pages 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.10.002>.
27. Davidson J., Good C., Welsh C., Summerfelt S. (2011). Abnormal swimming behavior and increased deformities in rainbow trout

- Oncorhynchus mykiss* cultured in low exchange water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 45, 109-117.
28. Davidson J., Good C., Welsh C., Summerfelt S. (2014). Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 59, 30-40.
29. De Godos I., González C., Becares E., García-Encina P.A., Muñoz R. (2009). Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 187-194.
30. De Pauw N. & E. Van Vaerenbergh (1983). *Microalgal Wastewater Treatment Systems: Potentials and Limits, Phytodepuration and the Employment of the Biomass Produced*. Centro Ric. Produz, Animali, Reggio Emilia, Italy, pp. 211-287.
31. De-Bashan L.E., Hernandez J.-P., Morey T., Bashan Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater, *Water Res.* 38, 466-474.
32. De-Bashan L.E., Moreno M., Hernandez J.-P., Bashan Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*, *Water Res.* 36, 2941-2948. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00522-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00522-X).
33. Del Canto, D. (2019). Evaluación del efecto de la adición de nanofibras de celulosa en medios de alginato para fotobiorreactores de consorcios microalgales-bacterianos inmovilizados. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en biotecnología marina y acuicultura. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, 70 pp.
34. Diniz, G.S., Silva, A.F., Araújo, O.Q.F. et al. (2017). The potential of microalgal biomass production for biotechnological purposes using wastewater resources. *J Appl Phycol* 29, 821-832. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0976-3>.

35. Ebeling J. M., M. B. Timmons & J.J. Bisogni (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>.
36. Ebeling J. M., M. B. Timmons & J.J. Bisogni (2009). An Engineering Analysis of the Stoichiometry of Autotrophic, Heterotrophic Bacterial Control of Ammonia-Nitrogen in Zero-Exchange Marine Shrimp Production Systems. *International Journal of Recirculating Aquaculture*, volumen 10, 63-90. <http://www.ejournals.ejournals.vtlibraries.net/ijra/article/view/1336/1814>.
37. Eroglu E., Smith S.M., Raston C.L. (2015). Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses, in: N.R. Moheimani, M.P. McHenry, K. de Boer, P.A. Bahri (Eds.), *Biomass and Biofuels from Microalgae*, Springer International Publishing, Switzerland.
38. FAO (1983). *Planificación del Desarrollo de la Acuicultura*. Roma. ISBN 92-5-301506-3. <http://www.fao.org/3/x5743s/x5743s00.htm#Contents>.
39. FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
40. Florez D. y J. Posada (2007). *Diseño conceptual de un reactor de lecho fluidizado a escala laboratorio para el tratamiento de aguas residuales*. Tesis de grado Ingeniera de Proceso. Escuela de ingeniería, Universidad EAFIT, Medellin Colombia. 101 pp. https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/363/DianaMarcela_FlorezCortes_2007.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
41. Fukami K., Nishijima T., Ishida Y. (1997). Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae, *Hydrobiologia* 358, 185-191.
42. García, Janneth M, & García, Francisco. (2009). Efecto de la Viscosidad y de la Densidad de Mezcla en el Gradiente de Presión de Flujo Homogéneo Gas-Líquido en Tuberías Horizontales. *Información tecnológica*, 20(4), 95-106. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642009000400011>.

43. Ghassemi S., Javid Imanpour Namin, Zohreh Ramezanzpour and Fatemeh Ghanbar (2018). Effects of light intensity and photoperiod on growth rate and biomass production in green algae *Scenedesmus dimorphus*. https://phycology.sbu.ac.ir/article_99113.html.
44. Goddek S. et al. (2019) Decoupled Aquaponics Systems. In: Goddek S., Joyce A., Kotzen B., Burnell G.M. (eds) *Aquaponics Food Production Systems*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6_8.
45. Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M.M., Acién, F.G. et al. (2015) *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 6931. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6694-y>.
46. Gonçalves A.L., Pires J.C.M. y M. Simões (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*. Volume 24, Part B, Pages 403-415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.
47. González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., León, C., García, P. A., & Muñoz, R. (2008). Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Science and Technology*, 58, 95–102. [10.2166/wst.2008.655](https://doi.org/10.2166/wst.2008.655).
48. González-Fernández C., Molinuevo-Salces B., García-González M.C. (2011). Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry, *Bioresour. Technol.* 102, 960-966.
49. Guo Z., Liu Y., Guo H., Yan S., Mu J. (2013). Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences*, 25(Suppl.) S85-S88. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(14\)60632-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(14)60632-X).
50. Gupta V., H. Sadegh, M. Yari, R. Shahryari Ghoshekandi, B. Maazinejad & M. Chahardori (2015). Removal of ammonium ions from wastewater. A short review in development of efficient methods. *Global J. Environ. Sci. Manage.*, 1(2): 149-158. DOI: [10.7508/gjesm.2015.02.007](https://doi.org/10.7508/gjesm.2015.02.007).

51. Hagopian, D.S and J.G. Riley (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18, pp. 223-244. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00032-6).
52. Hakanson L. (1988). Basic concepts concerning assessments of environmental effects of marine fish farms Nordic Council of Ministers, Copenhagen.
53. Hameed M., Ebrahim O. (2007). Biotechnological potential uses of immobilized algae, *J. Agric. Biol.* 9, 183-192.
54. He P., Mao B., Lü F., Shao L., Lee D., Chang J. (2013). The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters, *Bioresour Technol* 146, 562-568.
55. Hedges J., Baldock J., Geólinas Y., Lee C., Peterson M., Wakeham S. (2002). The biochemical and elemental compositions of marine plankton: A NMR perspective. *Marine Chemistry* 78, 47- 63.
56. Hernández-García A., S.B. Velásquez-Orta, E. Novelo, I. Yáñez-Noguez, I. Monje-Ramírez, M. T. Orta Ledesma (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 174, 15, Pages 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>.
57. Hii, Yiisiang & Soo, C.L. & Chuah, Tse-Seng & Ambak, M. & Abol-Munafi, Ambok. (2011). Interactive effect of ammonia and nitrate on the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp. *Journal of Sustainability Science and Management*. 6. 60-68.
58. Hirata A. and M. Noguchi (1994). Biological wastewater treatment by three-phase fluidization - characteristics and basic design method. *Water Sci Technol* 30 (11): 91–100. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0549>.
59. Hoffmann, J.P. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae *Journal of Phycology* Volume 34, Issue 5, Pages 757-763. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340757.x>. https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=q86139d5b294e8aae.
60. Holby O., P.O.J. Hall (1994). Chemical fluxes and mass balances in a marine fish cage farm. III. *Silicon Aquaculture*, 120 (3-4), pp. 305-318.

61. Huang Q, Fuhua Jiang, Lianzhou Wang, Chao Yang (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms, Engineering, Volume 3, Issue 3, Pages 318-329, ISSN 2095-8099, <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>.
62. Jayakumar, S., Yusoff, M.M., Rahim, M.H.A., Maniam, G.P. & N. Govindan (2017). The prospect of microalgal biodiesel using agro-industrial and industrial wastes in Malaysia. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 72, 33-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.002>.
63. Jimenez A. (2012) Sistemas de recirculación en acuicultura: una visión y retos diversos para Latinoamérica. *Revista Industria Acuicola* Vol 8 No 2. Mazatlan, Sinaloa.
64. Johnsen F., M. Hillestad, E. Austreng (1993). High energy diets for Atlantic salmon. Effect on pollution S.J. Kaushik, P. Luquet (Eds.), *Fish nutrition in practice*, INRA, Paris, pp. 391-401.
65. Kellam S.J., Walker J.M. (1989). Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture, *Br. Phycol. J.* 24, 191-194.
66. Kim, J., Liu, Z., Lee, J. Y., & Lu, T. (2013). Removal of nitrogen and phosphorus from municipal wastewater effluent using *Chlorella vulgaris* and its growth kinetics. *Desalination and Water Treatment*, 51, 7800–7806. [10.1080/19443994.2013.779938](https://doi.org/10.1080/19443994.2013.779938).
67. Krom M.D., S. Ellner, J. van Rijn, A. Neori (1995). Nitrogen and phosphorus Cycling and transformations in a prototype "non-polluting" integrated mariculture system, Eilat, Israel *Marine Ecology Progress Series*, 118, pp. 25-36.
68. 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 Biotechnol.* 28, 371-380.
69. Kurniawati FN, E. Mahajoeno, Sunarto and S.L.A. Sari, (2016). Effect of Light Intensity for Optimum Biomass and Lipid Production from *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing. *Earth and Environmental Science*, Volume 75, International Conference on Green and Renewable Energy Resources (ICGRER). 14–15 November, Solo, Indonesia. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/75/1/012012>.

70. Kwon G, T. L. Linh, J. Joeun, N. Jongchan, J. Youngho, K. Donghan and D. Jahng (2020). Effects of light and mass ratio of microalgae and nitrifiers on the rates of ammonia oxidation and nitrate production. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 161, 107656. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107656>.
71. Lananan F., Siti Hajar Abdul Hamid, Wan Nur Sakinah Din, Nora'aini Ali, Helena Khatoon, Ahmad Jusoh, Azizah Endut (2014). Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 95, Part A, 2014, Pages 127-134, ISSN 0964-8305. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.013>.
72. Lawson T. B. (1995). *Fundamentals of aquacultural engineering*. 355 pp. ISBN: 0412065118.
73. Lemarie G., J.L.M. Martin, G. Dutto, C. Garidou (1998). Nitrogenous and phosphorous waste production in a flow-through land-based farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 11 (4), pp. 247-254.
74. Lin Y., Jing S., Lee D., Wang T. (2002). Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. *Aquaculture* 209, 169-184. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00801-8).
75. Maisashvili A., Bryant H., Richardson J., Anderson D., Wickersham T., Drewery M. (2015). The values of whole algae and lipid extracted algae meal for aquaculture. *Algal Research* 9, 133-142.
76. Mallick N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review, *Biometals* 15, 377-390.
77. Mandal, S.K., Singh, R.P. & Patel, V. (2011). Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Secreted by a Toxic Dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and Its Probable Role in Harmful Algal Blooms (HABs). *Microb Ecol* 62, 518-527. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9852-5>.

78. Markou G., Georgakakis D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88, 3389-3401.
79. Martins C., Pistrin M., Ende S., Eding E., Verreth J. (2009). The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 291, 65-73.
80. McGriff E.C., McKinney R.E. (1972). The removal of nutrients and organics by activated algae, *Water Res.* 6, 1155-1164.
81. Midilli A. Kucuk H.;r and I. Dincer (2012). Environmental and sustainability aspects of a recirculating aquaculture system. *Environmental Progress & Sustainable Energy Environ. Prog. Sustainable Energy Adnan*. <https://doi.org/10.1002/ep.10580>.
82. Miller GE, Libey GS (1985). Evaluation of three biological filters suitable for aquaculture applications. *Journal of the World Aquaculture Society* 16: 158–168. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00197.x>.
83. Mitra D., J. (Hans) van Leeuwen and B. Lamsal (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, Volume 1, Issue 1, Pages 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.002>.
84. Molazadeh M, Ahmadzadeh H, Pourianfar HR, Lyon S and Rampelotto PH (2019). The Use of Microalgae for Coupling Wastewater Treatment With CO₂ Biofixation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:42. doi: 10.3389/fbioe.2019.00042.
85. Mook W., Chakrabarti M., Aroua M., Khan G., Ali B., Islam M., Abu Hassan M. (2012). Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology: A review. *Desalination* 285, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.09.029>.
86. Mujtaba, G., Lee, K. (2017). Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water Res.* 120, 174. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.078>.

87. Mulbry W., Westhead E., Pizarro C., Sikora L. (2005). Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresource Technology* 96, 451-458.
88. Muñoz R., Guieysse B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, *Water Res.* 40, 2799-2815.
89. Muñoz R., Jacinto M., Guieysse B., Mattiasson B. (2005). Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal-bacterial bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 699-707.
90. Najdenski H.M., Gigova L.G., Iliev I.I., Pilarski P.S., Lukavský J., Tsvetkova I.V., Ninova M.S., Kussovski V.K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria, *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 1533-1540.
91. Natrah F.M., Bossier P., Sorgeloos P., Yusoff F.M., Defoirdt T. (2014). Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture, *Rev. Aquac.* 6, 48-61.
92. Nicolella C., M.C.M. van Loosdrecht and J.J. Heijnen (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*. Volume 80, Issue 1. Pages 1-33. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00229-7).
93. Olguin, E.J. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22 81-91, (2003). DOI: 10.1016/s0734-9750(03)00130-7.
94. ONU (2014). Departamento de Asuntos Económicos y Sociales División de Población. La situación demográfica en el mundo, 2014. Nueva York.
95. ONU (2019). Departamento de Asuntos Económicos y Sociales División de Población. La situación demográfica en el mundo (junio, 2019). Nueva York. https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_PressRelease_ES.pdf.
96. Pagand P., J.P. Blancheton, J. Lemoalle and C. Casellas (2000). The use of high rate algal ponds for the treatment of marine effluent from a

- recirculating fish rearing system. *Aquaculture Research*. Volumen 31, Issue 10, 729-736, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00493.x>.
97. Park J., Craggs R., Shilton A. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 35-42.
98. Parker AE, Dugdale RC, Wilkerson FP (2012). Elevated ammonium concentrations from wastewater discharge depress primary productivity in the Sacramento River and the Northern San Francisco Estuary. *Mar Pollut Bull* 64: 574–586.
99. Pedersen L-F, Karin I. Suhr, Johanne Dalsgaard, Per B. Pedersen, Erik Arvin, 2012. Effects of feed loading on nitrogen balances and fish performance in replicated recirculating aquaculture systems, *Aquaculture*, Volumes 338–341, 2012, Pages 237-245, ISSN 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.035>.
100. Piedrahita R.H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, Volume 226, Issues 1-4, 31, Pages 35-44. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00465-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00465-4).
101. Pillay T.V.R. (1992). *Aquaculture and the environment* Wiley, New York.
102. Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G. et al. (2013). Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environ Sci Pollut Res* 20, 5096-5105. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1791-x>.
103. Porter C.P., M.D. Krom, M.G. Robbins, L. Bricknell, A. Davidson (1987). Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream *Sparus aurata* in marine fish-ponds and its effect on water quality conditions *Aquaculture*, 66 (3-4), pp. 287-297.
104. Pulkkinen J., Kiuru T., Aalto S., Koskela J. and J. Vielma (2018). Startup and effects of relative water renewal rate on water quality and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a unique RAS research platform. *Aquacultural Engineering Elsevier* Volume 82, Pages 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.003>.

105. Qin G., Liu C., Richman N., Moncur J. (2005). Aquaculture wastewater treatment and reuse by wind-driven reverse osmosis membrane technology: a pilot study on Coconut Island, Hawaii. *Aquacultural Engineering* 32, 365-378.
106. Qingshan H., F. Jiang, L. Wang & C. Yang (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, 3(3), 318–329. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>.
107. Ramli M., N., Giatsis, C., Md Yusoff, F., Verreth, J., Verdegem, M. (2018). Resistance and resilience of small-scale recirculating aquaculture systems (RAS) with or without algae to pH perturbation. *PLoS ONE*, 13(4). e0195862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195862>.
108. Ramli M., N., Verdegem, M. C. J., Yusoff, F. M., Zulkifely, M. K., Verreth, J. A. J. (2017). Removal of ammonium and nitrate in recirculating aquaculture systems by the epiphyte *Stigeoclonium nanum* immobilized in alginate beads. *Aquaculture Environment Interactions*, 9, 213-222. <https://doi.org/10.3354/aei00225>.
109. Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy* 88 (10), 3411e3424.
110. Ruiz A. (2011). Tesina: Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>
111. Ruiz-Güereca, D.A., Sánchez-Saavedra, M.d.P (2016). Growth and phosphorus removal by *Synechococcus elongatus* co-immobilized in alginate beads with *Azospirillum brasilense*. *J Appl Phycol* 28, 1501–1507. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0728-9>.

112. Salatia S., G. D'Imporzano, B. Menin, D. Veronesia, B. Scaglia, P. Abbruscato, P. Mariani y F. Adan (2017). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology*, Volume 230, Pages 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.030>.
113. Sanchez OIA, Matsumoto T (2012). Hydrodynamic characterization and performance evaluation of an aerobic three phase airlift fluidized bed reactor in a recirculation aquaculture system for Nile Tilapia production. *Aquacultural Engineering* 47:16–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2011.12.006>.
114. Shen Y., J. Gao & L. Lic (2017). Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. *Bioresource Technology*, Volume 243, (2017), Pages 905-913. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.041>.
115. Shengbing H. & X. Gang (2010). Algal-based immobilization process to treat the effluent from a secondary wastewater treatment plant (WWTP). *Journal of Hazardous Materials*. Volume 178, Issues 1-3, Pages 895-899. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.022>.
116. Shnel N, Barak Y, Ezer T, Dafni Z, Jvan R (2002). Design and performance of a zero-discharge tilapia recirculating system. *Aquacultural Engineering* 26: 191–203.
117. Siddiqui A.B., A.H. Al-Harbi (1999). Nutrient budgets in tanks with different stocking densities of hybrid tilapia *Aquaculture*, 170, pp. 245-252.
118. Silva-Benavides A.M., Torzillo G. (2012). Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures, *J. Appl. Phycol.* 24, 267-276.
119. Sindilariu P-D., Christian Wolter and Reinhar Reiter (2008). Constructed wetlands as a treatment method for effluents from intensive trout farms. *Aquaculture* Volume 277, Issues 3-4, Pages 179-184. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.026>.

120. Song BB, Su M, Shan JJ, Wu F (2012). Effect of hydraulic loading on nitrification efficiency in moving bed biofilm reactor. *Fishery Modernization* 39:1–6.
121. Sonune A., Ghate R. (2004). Developments in wastewater treatment methods, *Desalination* 167, 55-63.
122. Souza, R. R., Bresolin, I. T. L., Bioni, T. L., Gimenes, M. L., & Dias-Filho, B. P. (2004). The performance of a three-phase fluidized bed reactor in treatment of wastewater with high organic load. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 219-227. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322004000200011>.
123. Stumm, Werner (2012). *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. 3rd ed. Environmental Science and Technology: A Wiley-Interscience Ser. of Texts and Monographs. Web.
124. Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2012). Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *BioresourceTechnology*, 105, 67-73. [10.1016/j.biortech.2011.11.113](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.113).
125. Subashchandrabose S.R., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential, *Biotechnol. Adv.* 29, 896-907.
126. Suhr KI, Pedersen PB (2010). Nitrification in moving bed and fixed bed biofilters treating effluent water from a large commercial outdoor rainbow trout RAS. *Aquacultural Engineering* 42:31–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2009.10.001>.
127. Summerfelt S.T., A. Zühlke, J. Kolarevic, B.K. Megárd Reiten, R. Selset, X. Gutierrez, B.F. Terjesen (2015). Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors *Aquac. Eng.*, 65, pp. 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.11.002>.

128. Tampion J., Tampion M.D. (1987). *Immobilized Cells: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1987), 257 pp.
129. Timmons MB, Holder JL, Ebeling JM (2006). Application of microbead biological filters. *Aquacultural Engineering* 34: 332–343. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.07.003.
130. Timmons, M.B., Ebeling, J.M. y Piedrahita, R.H. (2009). *Acuicultura en sistemas de recirculación*, LLC Edición. Ithaca, USA: Cayuga Aqua Ventures, 959 pp.
131. Tiron O., C. Bumbac, I. V. Patroescu, V. R. Badescu, & C. Postolache (2015). Granular activated algae for wastewater treatment. *Water Sci Technol*, Volume 71 (6): 832-839. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.010>.
132. Tseng KF, Wu KL (2004). The ammonia removal cycle for a submerged biofilter used in a recirculating eel culture system. *Aquacultural Engineering* 31:17–30. 10.1016/j.aquaeng.2003.12.002.
133. Unnithan V.V., Unc A., Smith G.B. (2014). Mini-review: a priori considerations for bacteriaalgae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters, *Algal Res.* 4 (2014) 35-40.
134. Van Bussel C., Schroeder J., Wuertz S. Schulz C. (2012). The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 326-329, 163-167.
135. Van Den Hende S., Vervaeren H., Desmet S., Boon N. (2011). Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New Biotechnology* Volume 29, Number 1.
136. Van Rijn J. (2013). Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 53, 49- 56.
137. Vymazal J. (2009). The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater, *Ecological Engineering*, Volume 35, Issue 1, Pages 1-17, ISSN 0925-8574, <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.08.016>.
138. Wang H., H. Xiong, H. Zhenglong and X. Zeng (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary

- piggery wastewater to produce lipids *Bioresource Technology*, Volume 104, 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.020>.
139. Wilkie A.C., Mulbry W.W. (2002). Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae, *Bioresour. Technol.* 84 (2002) 81-91.
140. Wortman B, Wheaton F. (1991). Temperature effects on biofilm nitrification. *Aquacultural Engineering* 10: 183–205. [https://doi.org/10.1016/0144-8609\(91\)90023-D](https://doi.org/10.1016/0144-8609(91)90023-D).
141. Wu Y., J. Zhang, L. Zheng, F. Haiyan, D. Zhineng & X. Yong (2019). Removal of ammonia nitrogen by biochar-alginate-jointly immobilized *Chlorella vulgaris* [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, (2019), 13 (12): 2863- 2869.doi: 10.12030 / j.cjee.201905096.
142. Wu, J.-Y., Lay, C.-H., Chen, C.-C. & S.-Y. Wu (2017). Lipid accumulating microalgae cultivation in textile wastewater: Environmental parameters optimization. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*
143. Xifan N., Muhammad Mubashar, Shi Zhang, Yufeng Qin, Xuezhi Zhang (2020). Current progress, challenges and perspectives in microalgae-based nutrient removal for aquaculture waste: A comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*. Volume 277, 124209.
144. Yen H.-W.Y., Hu I.-C., Chen C.-Y., Chang J.-S. (2013). Design of photobioreactors for algal cultivation, in: A. Pandey, D.-J. Lee, Y. Chisti, C.R. Soccol (Eds.), *Biofuels from Algae*, Elsevier, USA, pp. 23-46.
145. Zhan PR, Liu W (2013) Use of fluidized bed biofilter and immobilized *Rhodospseudomonas palustris* for ammonia removal and fish health maintenance in a recirculation aquaculture system. *Aquaculture Research* 44: 327–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03038.x>.

ANEXOS

Anexo A. Pruebas “F” y “t” para remoción global y tratamientos (Irradiancia (Lx) y Mezclamiento (Re)_M). a) Amonio, b) Fosfato y c) Nitrato.

| a) | | 500 Lx | | 15.250 Lx | | 30.000 Lx | |
|----------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
| | | < 2500 Re | > 2500 Re | < 2500 Re | > 2500 Re | < 2500 Re | > 2500 Re |
| | | Indicadores | | Indicadores | | Indicadores | |
| | | V _e | V _t | V _e | V _t | V _e | V _t |
| Prueba F | Resultado | 2,2 | 18,51 | 0,0094 | 0,005 | 0,133 | 0,005 |
| | P (0,05) | 0,276 | | 0,068 | | 0,249 | |
| | H _o | $\sigma_1 = \sigma_2$ | | $\sigma_1 = \sigma_2$ | | $\sigma_1 = \sigma_2$ | |
| | H _i | $\sigma_1 \neq \sigma_2$ | | $\sigma_1 \neq \sigma_2$ | | $\sigma_1 \neq \sigma_2$ | |
| Prueba t | Resultado | - 4,81 | 3,18 | - 0,749 | 3,18 | -1,88 | 3,18 |
| | P (0,05) | 0,017 | | 0,43 | | 0,156 | |
| | H _o | $\mu_1 = \mu_2$ | | $\mu_1 = \mu_2$ | | $\mu_1 = \mu_2$ | |
| | H _i | $\mu_1 \neq \mu_2$ | | $\mu_1 \neq \mu_2$ | | $\mu_1 \neq \mu_2$ | |
| b) | | 500 Lx | | 15.250 Lx | | 30.000 Lx | |
| | | < 2500 Re | > 2500 Re | < 2500 Re | > 2500 Re | < 2500 Re | > 2500 Re |
| | | Indicadores | | Indicadores | | Indicadores | |
| | | V _e | V _t | V _e | V _t | V _e | V _t |
| Prueba F | Resultado | 2,87 | 18,51 | 0,08 | 0,005 | 3,77 | 18,51 |
| | P (0,05) | 0,23 | | 0,196 | | 0,191 | |
| | H _o | $\sigma_1 = \sigma_2$ | | $\sigma_1 = \sigma_2$ | | $\sigma_1 = \sigma_2$ | |
| | H _i | $\sigma_1 \neq \sigma_2$ | | $\sigma_1 \neq \sigma_2$ | | $\sigma_1 \neq \sigma_2$ | |
| Prueba t | Resultado | - 0,87 | 3,18 | 0,406 | 4,3 | -5,810 | 3,18 |
| | P (0,05) | 0,45 | | 0,72 | | 0,01 | |
| | H _o | $\mu_1 = \mu_2$ | | $\mu_1 = \mu_2$ | | $\mu_1 = \mu_2$ | |
| | H _i | $\mu_1 \neq \mu_2$ | | $\mu_1 \neq \mu_2$ | | $\mu_1 \neq \mu_2$ | |
| c) | | 500 Lx | | 15.250 Lx | | 30.000 Lx | |
| | | < 2500 Re | > 2500 Re | < 2500 Re | > 2500 Re | < 2500 Re | > 2500 Re |
| | | Indicadores | | Indicadores | | Indicadores | |
| | | V _e | V _t | V _e | V _t | V _e | V _t |
| Prueba F | Resultado | 0,916 | 0,006 | | | | |
| | P (0,05) | 0,48 | | | | | |
| | H _o | $\sigma_1 = \sigma_2$ | | | | | |
| | H _i | $\sigma_1 \neq \sigma_2$ | | | | | |
| Prueba t | Resultado | -8,92 | 4,302 | -0,267 | 3,18 | 0,245 | 3,18 |
| | P (0,05) | 0,012 | | | | | |
| | H _o | $\mu_1 = \mu_2$ | | $\mu_1 = \mu_2$ | | $\mu_1 = \mu_2$ | |
| | H _i | $\mu_1 \neq \mu_2$ | | $\mu_1 \neq \mu_2$ | | $\mu_1 \neq \mu_2$ | |

Anexo B. “Trabajo realizado en el marco de las asignaturas Proyecto de tesis 1 y 2 durante el año 2020, y publicado en AquaTechnica, Vol. 3 Núm. 1 (2021): enero-abril (2021). DOI 10.33936/at.v3i1.3484.

Fitodepuración mixotrófica en sistemas de recirculación acuícola (RAS) para el manejo sustentable de nutrientes contaminantes

Mixotrophic phytodepuration in aquaculture recirculation systems (RAS) for the sustainable management of polluting nutrients

Jorge Silva-Acosta^{1,2}, Christian Canales Valenzuela², Sergio Rodríguez Leal³

¹Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile.

³Ingeniería y Bionegocios FDM Spa, Concepción, Chile.

Correspondencia: Jorge Silva-Acosta,  E-mail: jorgesilvaa@udec.cl

Revisión | Review

Palabras clave

Acuicultura intensiva
Biofiltro nitrificante
Tratamiento de agua
Biomasa
Economía circular

RESUMEN | La acuicultura industrial ha crecido rápidamente debido al aumento en la demanda mundial de pescados y mariscos, lo que ha estimulado el desarrollo de sistemas acuícolas de cultivo de especies marinas. La necesidad de mantener altos niveles de productividad los convierte en sistemas complejos e inestables, propensos a sufrir perturbaciones con riesgo potencial de causar problemas de contaminación del ambiente natural. En las operaciones de acuicultura intensiva se estima que en los procesos de transformación para el desarrollo y crecimiento de la biomasa, aproximadamente el 75% del alimento es liberado en forma de nitrógeno y fósforo. Durante las últimas décadas se han realizado esfuerzos para el desarrollo de procesos de eliminación de estos nutrientes-contaminantes, que de otra manera serían liberados a los cuerpos de agua natural, causando eutrofización. El sistema de acuicultura con recirculación (RAS) es el sistema convencional de cultivo; incluye una etapa de remoción de nutrientes con biofiltros de bacterias aerobias que favorecen el proceso de nitrificación, aunque la tecnología de biofiltros tiene dificultades operacionales tales como la disminución en la concentración de oxígeno, acumulación de materia orgánica y dificultad de retroenjuague, entre otras. Así, han surgido opciones basadas en la actividad de organismos fotoautotróficos aprovechando la capacidad de plantas acuáticas, macro y microalgas, de eliminar con eficacia nutrientes-contaminantes (fitodepuración), consumiendo además de carbono y nitrógeno, también el fósforo, este último sin capacidad de ser removido con biofiltros nitrificantes. Sin embargo, esta estrategia de tratamiento no se ha utilizado en acuicultura intensiva debido a la alta disponibilidad de superficie demandada y que supera la requerida por los compactos equipos de para biofiltración nitrificante. La fitodepuración mixotrófica, que corresponde a la integración de dos tecnologías de tratamiento terciario de aguas residuales (biofiltración-autotrófica y fitodepuración), podrían ser una respuesta eficiente para el tratamiento de aguas residuales acuícolas, dada la interacción entre los organismos involucrados. Por ello, esta revisión se enfoca al potencial uso de los cultivos mixotróficos para el control de nutrientes-contaminantes en “RAS” o aguas residuales acuícolas, además de aportar al desarrollo de economía circular.

Keywords

Intensive aquaculture
Nitrifying biofilter
Water treatment
Biomass
Circular economy

ABSTRACT | Industrial aquaculture has grown rapidly due to the increase in world demand for fish and shellfish, which has stimulated the development of aquaculture systems for the cultivation of marine species. The need to maintain high levels of productivity makes them complex unstable systems, prone to disturbances with the potential risk of causing problems of contamination of the natural environment. In intensive aquaculture operations, it is estimated that in the transformation processes for the development and growth of biomass, approximately 75% of the feed is released in the form of nitrogen and phosphorus. During the last decades, efforts have been made to develop processes for the elimination of these nutrients-pollutants, which would otherwise be released into natural water bodies causing eutrophication. The recirculating aquaculture system (RAS) is the conventional culture system; it includes a nutrient removal stage with biofilters of aerobic bacteria that favor the nitrification process, although the biofilter technology has operational difficulties such as the decrease in oxygen concentration, accumulation of organic matter and difficulty of back-rinsing, among others. Thus, options have emerged based on the activity of photoautotrophic organisms, taking advantage of the ability of aquatic plants, macro and microalgae, to effectively eliminate nutrients-pollutants (phytodepuration), consuming in addition to carbon and nitrogen, also phosphorus, the latter without the ability to be removed with nitrifying biofilters. However, this treatment strategy has not been used in intensive aquaculture due to the high availability of the area in demand, which exceeds that

required by compact equipment for nitrifying biofiltration. Mixotrophic phytodepuration, which corresponds to the integration of two tertiary wastewater treatment technologies (biofiltration-autotrophic and phytodepuration), could be an efficient response for the treatment of aquaculture wastewater, given the interaction between the organisms involved. For this reason, this review focuses on the potential use of mixotrophic cultivation for the control of nutrients-pollutants in "RAS" or aquaculture wastewater, in addition to contributing to the development of circular economy.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura en el mundo es una industria que ha crecido rápidamente debido a un aumento significativo en la demanda mundial de pescados y mariscos, resultado proporcional al crecimiento demográfico poblacional que predice un total de 8.100 millones de personas para el 2025 (ONU, 2014) y 9.700 millones para el 2050 (ONU, 2019). A fines del 2018, el total de recursos hidrobiológicos cosechados por acuicultura ascendió a 114,6 millones de toneladas de peso vivo, con un valor estimado de venta de US\$263,6 mil millones de dólares (FAO, 2020). Esta realidad sitúa a la acuicultura dentro de las más dinámicas actividades proveedoras de proteína a nivel mundial, no obstante, es importante considerar que como los sistemas acuícolas mantienen un alto nivel de productividad, requiriendo aportes externos de materia y energía, tienden a generar una mayor inestabilidad ecológica y, por tanto, pueden ser más fácilmente perturbados que los ecosistemas naturales (FAO, 1983). Entre los aportes de materia y energía externos requeridos se encuentra la demanda de agua, oxígeno, alimento, antibióticos, electricidad (Bartoli *et al.*, 2005), y compuestos utilizados para la estabilización fisicoquímica del agua. Estimaciones indican que el 75% del alimento empleado en acuicultura se libera en forma de nitrógeno y fósforo. El nitrógeno ingresa al medio acuoso en forma de amonio (NH_4^+), nitrógeno orgánico o incluso nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), mientras que el fósforo se encuentra en forma de fosfatos (PO_4^{3-}) (Crab *et al.*, 2007). Dauda *et al.* (2019) indican como ejemplo, que los desechos generados por el cultivo de peces en Japón, independientemente de la especie, es tan alta que una tonelada de peces genera en promedio 0,8 kg de nitrógeno y 0,1 kg de fósforo. Así, el cultivo de peces no puede ser considerado sostenible, sino todo lo contrario, un cultivo que deteriora los ambientes dulceacuícolas.

Durante las últimas décadas del siglo pasado, se han realizado importantes esfuerzos para eliminar estos nutrientes de las aguas residuales domésticas (Diniz *et al.*, 2017) y de acuicultura para obtener una calidad de efluente satisfactoria, que no dé lugar a la eutrofización de ecosistemas naturales receptores o que permita el reciclaje de agua (Crab *et al.*, 2007), abriendo paso al diseño e implementación de técnicas de reutilización intensiva de agua, denominadas sistemas de recirculación acuícola (RAS, por sus siglas en inglés: *Recirculation Aquaculture Systems*). El crecimiento sostenido de la acuicultura intensiva se correlacionaría con el déficit de recursos hídricos y dada la necesidad de asegurar la inocuidad alimentaria, como así también el control del impacto medio ambiental de los procesos industriales, surge la necesidad de desarrollar procesos que optimicen el uso eficiente de los recursos hídricos. Por lo tanto, el análisis de nuevas tecnologías en el manejo y aprovechamiento de los nutrientes residuales resultan altamente necesarias y requeridas. El objetivo de este trabajo fue analizar el potencial tecnológico de la utilización de cultivos de microorganismos mixotróficos para el control de nutrientes en sistemas de recirculación acuícola (RAS) y/o aguas residuales provenientes del cultivo de recursos hidrobiológicos y en la posibilidad de aportar al desarrollo de sistemas productores de biomasa.

REUTILIZACIÓN DE AGUA EN ACUICULTURA INTENSIVA

Los RAS interrelacionan un conjunto de procesos unitarios y componentes que se utilizan para el mantenimiento de organismos acuáticos en cautiverio, donde el agua es continuamente tratada y reutilizada, presentando como ventaja el uso racional del agua, ya que el volumen de recambio es menor al utilizado en sistemas abiertos de acuicultura (Jiménez *et al.*, 2012; Dauda *et al.*, 2019). Así mismo, y de acuerdo con Pedersen *et al.*, (2012), los RAS tienen el potencial de reducir los impactos ambientales de la acuicultura en comparación con los sistemas de flujo abierto, tradicionalmente utilizados los cuales

requieren en promedio 30 m³ de agua nueva al año por cada kilogramo de trucha cultivada, mientras que los RAS, dependiendo sus nivel de intensidad, fluctúan entre 0,3 y 3 m³ kg_{pez}⁻¹ año⁻¹ y el grado de recirculación fluctúa entre 95,9 y 99,6% del volumen reciclado por hora (Bregnaballe *et al.*, 2015). Los desechos del proceso de cultivo pueden ser manejados de mejor manera, disminuyendo el impacto sobre los cuerpos receptores de las aguas residuales. Así, los gases y sólidos suspendidos, producto del proceso metabólico del cultivo, son extraídos durante el proceso de recirculación. El oxígeno consumido también se incorpora al sistema manteniéndose el balance de nutrientes que favorece el crecimiento y desarrollo de los organismos objeto, además de mayores densidades en los sistemas de cultivo (Fig. 1).



Figura 1. Ciclo de un sistema de recirculación acuícola (RAS). Fuente: elaboración propia

La implementación de un RAS implica necesariamente el monitoreo y manejo de los parámetros fisicoquímicos del agua, permitiendo con ello que los organismos cultivados presenten mejores tasas de crecimiento, sobrevivencia y conversión alimentaria (Jiménez *et al.*, 2012; Midilli *et al.*, 2012). No obstante, estas mejoras solo se cumplen si el proceso de depuración del agua es completo, de lo contrario la presencia de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato), que van acumulándose provocan toxicidad, disminución del tamaño corporal, aumento de la mortalidad, comportamientos anormales y deformidades esqueléticas en peces (Davidson *et al.*, 2011-2014; Martins *et al.*, 2009; Van Bussel *et al.*, 2012). Una solución a este problema sería utilizar elevadas tasas de recambio de agua por masa de alimento suministrado, aumentando con ello la corriente de desechos que se libera al ambiente. Sin embargo, esto es una solución insostenible, considerando la escasez del recurso hídrico y las limitaciones que se visualizan para el uso de agua dulce en el futuro (Martins *et al.*, 2009; Pulkkinen *et al.*, 2018).

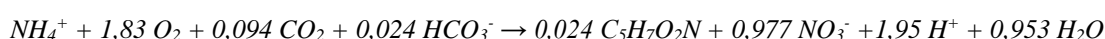
En este contexto, la manera más efectiva para evitar los efectos indeseados asociados a la liberación de aguas residuales y disminuir la demanda de agua de recambio es controlar mediante sistemas de tratamiento los nutrientes residuales que se acumulan en el RAS. Por este motivo, el tratamiento biológico de nitrificación “Biofiltros nitrificadores”, ha sido el método más factible en la reutilización del agua. Este proceso consiste en un sistema de filtración biológica instalado en la línea de agua recirculada (Fig.1), en el que se mantienen bacterias aerobias que favorecen el proceso de nitrificación, y opcionalmente, anaerobias para el proceso de desnitrificación (Van Rijn, 2013). Estas bacterias utilizan NH₄⁺ como fuente energía, además de metabolizar y convertir el nitrógeno a formas menos tóxico o gaseoso, con lo que se disminuye la acumulación de nutrientes residuales de los compuestos nitrogenados. No obstante, el metabolismo de los peces también produce otros nutrientes residuales como fosfato (Dauda *et al.*, 2019), que no son convertidos por los biofiltros nitrificadores, por lo tanto, se acumulan en el RAS y sólo son controlados por

dilución en cada recambio de agua.

Las bacterias nitrificantes son principalmente autótrofos obligados, que utilizan dióxido de carbono como fuente primaria de carbono y requieren oxígeno para crecer (Hagopian y Riley, 1998). Los principales factores que afectan la nitrificación son la concentración de amoníaco-nitrógeno y nitrito-nitrógeno, la relación carbono/nitrógeno, la concentración de oxígeno disuelto, el pH y la temperatura.

En el proceso de nitrificación que se representa con la ecuación 1, se consume una significativa cantidad de oxígeno y compuestos basicantes como CaCO_3 (7,05 g / g N) y se producen gran cantidad de dióxido de carbono (5,85 g CO_2 /g TAN^1) Ebeling *et al.*, (2009). Para el agua con baja alcalinidad inicial, esto puede ser un problema significativo, ya que requeriría de la adición de compuestos basicantes en forma de bicarbonato de sodio, cal o hidróxido de sodio para mantener una concentración entre 100 a 150 mg/L como CaCO_3 , adecuada especialmente para RAS (Timmons *et al.*, 2009; Bregnballe, 2015; Summerfelt *et al.*, 2015; Boyd *et al.*, 2016).

Ecuación 1:



Además de los biofiltros nitrificadores, se han reportado otros métodos como ósmosis inversa y tecnología electroquímica para el control de las concentraciones de nutrientes (Qin *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2015). No obstante, su alto requerimiento de energía es un inconveniente, aumentando tanto en los costos operativos como en los posibles impactos por el uso de combustibles fósiles. Adicionalmente, se han utilizado sistemas de humedales e hidropónicos de plantas superiores a modo de control de aguas residuales acuícolas (Sindilariu *et al.*, 2008; Vymazal, 2009; Goddek *et al.*, 2019).

A pesar de las ventajas antes mencionadas, los biofiltros nitrificantes presentan inconvenientes que incluyen; disminución en la concentración de oxígeno disuelto, aporte de CO_2 , consumo de alcalinidad, dificultad de retroenjuague, acumulación de materia orgánica y reservorio de microorganismos no deseados. Las bacterias ocupadas en los biofiltros actuales son selectivas y pueden disminuir la concentración de un residuo específico a la vez por reactor, teniendo que aumentar el tamaño de la planta de tratamiento y la energía requerida para depurar otros compuestos presentes en el agua residual (Mook *et al.*, 2012).

MICROORGANISMOS PARA EL CONTROL DE DESECHOS

La FAO define a las aguas residuales como aquellas que no tienen valor inmediato para el fin para el que se utilizó ni para el propósito para el que se produjo debido a su calidad, cantidad o al momento en que se dispone de ella². Sin embargo, las aguas residuales de un usuario pueden servir de suministro para otro usuario en otro lugar. Por lo general, las aguas residuales pueden contener grandes cantidades de desechos orgánicos e inorgánicos metabolizables por microorganismos heterótrofos demandantes de oxígeno (DBO), organismos patógenos, nutrientes como nitrógeno y fósforo, compuestos inorgánicos y sedimentos (Sonune y Ghate, 2004) y difieren su composición según fuente de origen, fluctuando entre < 1 mg/l a más de 650 mg/l de $\text{NH}_4\text{-N}$ (Timmons *et al.*, 2009; De Godos *et al.*, 2009; González-Fernández *et al.*, 2011).

Una alternativa para manejar y controlar los nutrientes de desecho, es utilizar organismos que consuman nutrientes producidos en los procesos de acuicultura. En ese contexto, es conocido que las plantas acuáticas, macro y microalgas eliminan con eficacia una variedad de nutrientes-contaminantes (Apandi *et al.*, 2019), tales como nitrógeno, fosfato, ácidos volátiles grasos, compuestos farmacéuticos, colorantes textiles, y metales pesados (Wang *et al.*, 2012), convirtiéndolas en una posibilidad real para la eliminación de

¹ En agua, el amoníaco existe en dos formas: amoníaco no ionizado, NH_3 , y amonio ionizado, NH_4^+ . La concentración relativa de cada una de estas formas está en función del pH, temperatura y salinidad (Anthonisen *et al.*, 1976). La suma de NH_4^+ y NH_3 , generalmente se define como total amonio nitrogenado (TAN) o simplemente amoníaco (Ebeling *et al.*, 2006).

² Food and Agriculture Organization of the United Nations, AQUASTAT Web Site

nutrientes del agua residual urbana (Bashan y Bashan, 2010; Calicioglu y Demirer, 2017), industrial (Bordel *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2017) y agrícola (Markou y Georgakakis, 2011; Jayakumar *et al.*, 2017). Algunas de las especies estudiadas pertenecen a los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Tetraselmis*, *Dunaliella*, *Tribonema*, *Ascochloris*, *Desmodesmus*, *Chalymondomonas*, *Coelastrum*, *Parachlorella* y *Asterarcys*, con especies que pueden utilizar en su crecimiento diferentes compuestos de nitrógeno tales como amonio, nitrato o urea, además de fósforo (Ruiz, 2011; Ayesha *et al.*, 2020).

En los efluentes de acuicultura, los elementos que pueden servir como nutrientes para las microalgas están relacionados con la alimentación de la especie en cultivo, siendo el nitrógeno y el fósforo los de mayor incidencia. Estos elementos se presentan en forma semisólida (heces fecales) y disuelta (orina). Piedrahita (2003) indica que los excrementos fecales de los peces contienen entre 3,6% – 35% N y 15% – 70% P, mientras que la cantidad de N y P, como productos excretados sería de 37% – 72% y 1% – 62%, respectivamente (tabla 1). Por otro lado, Lin *et al.*, (2002) y Guo *et al.*, (2013) plantean que los rangos de nutrientes pueden fluctuar en términos de concentración entre 0,12-14,7 mg/L de NH_4^+ , 0,02-1,5 mg/L de NO_2^- , 0,01-5,3 mg/L de NO_3^- y 3,1-17,7 mg/L de PO_4^{3-} . Así mismo, las aguas residuales de la acuicultura contienen relativamente pocos microorganismos patógenos (Abdel-Raouf *et al.*, 2012), haciéndola adecuada como medio de cultivo para las microalgas. No obstante, aún se requieren estudios detallados del impacto de los factores bióticos y abióticos en las microalgas para alcanzar el potencial completo como sistema de depuración (Ayesha *et al.*, 2020).

Tabla 1. Tasas de retención y excreción de nitrógeno y fósforo expresado como porcentaje (%) del alimento consumido (Piedrahita, 2003; Dauda *et al.*, 2019).

| Retenido como tejidos | | No digerido en heces fecales (partícula) | | Excretado (forma disuelta) | | Especie | Referencia |
|-----------------------|-------|--|-------|----------------------------|-------|---------------------------|---|
| N | P | N | P | N | P | | |
| 49 | 36 | 14 | 55 | 37 | 9 | <i>Salmón Atlántico</i> | Johnsen <i>et al.</i> (1993); Bergheim y Asgard (1996). |
| | 17-19 | | 48-54 | | 28-34 | <i>Salmón Atlántico</i> | Holby y Hall (1994). |
| 11 | 32 | | | | | <i>Carpa</i> | Avnimelech y Lacher (1979). |
| 27 | 30 | | | | | <i>Bagre de Canal</i> | Boyd (1985). |
| 10 | 40 | 35 | 15 | 55 | 45 | <i>Lubina</i> | Lemarie <i>et al.</i> (1998). |
| 30 | | 10 | | 60 | | <i>Besugo</i> | Porter <i>et al.</i> (1987). |
| 19-26 | | | | | | <i>Besugo</i> | Krom <i>et al.</i> (1995). |
| 30 | | 13 | | 57 | | <i>Trucha arcoíris</i> | Beveridge <i>et al.</i> (1991) |
| 25 | 30 | 15 | 70 | 60 | 0 | <i>Trucha arcoíris</i> | Hakanson (1988); Pillay (1992) |
| 21-22 | 18,8 | 3,6-5,4 | 19-22 | 59-72 | 60-62 | <i>Híbrido de tilapia</i> | Siddiqui y Al-Harbi (1999). |

Los principales nutrientes requeridos para el crecimiento de microalgas son el carbono, nitrógeno y fósforo. Gonçalves *et al.*, (2017) indica que, dado que las aguas residuales presentan concentraciones considerables de estos nutrientes, varios estudios han reportado el potencial de crecimiento de microalgas en aguas residuales de diferentes fuentes, tanto domésticas, como agrícolas e industriales. Dichos estudios

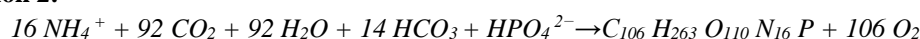
han revelado que el uso de aguas residuales para el cultivo de microalgas promueve un tratamiento eficaz de estas aguas; las eficiencias reportadas sobre la eliminación de nitrógeno y fósforo alcanzan a 60 – 99% y 54 – 95%, respectivamente. Simultáneamente, contribuyen a la producción de biomasa de microalgas a costos reducidos, con menores impactos ambientales ya que no se requiere suministro de nutrientes (Boelee *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Silva-Benavides y Torzillo, 2012). El cultivo de microalgas en aguas residuales atrae, además, la atención de los investigadores, puesto que a largo plazo el uso de fertilizantes sintéticos como fuente de nutrientes se volverá insostenible. Sin embargo, hasta ahora sólo alrededor del 30% de los trabajos publicados se refieren al uso de aguas residuales como medio nutricional para las microalgas, mientras que el 70% restante plantea el uso de fertilizantes sintéticos como fuente de nutrientes para el cultivo de las microalgas (Gonçalves *et al.*, 2017).

Por otra parte Xifan *et al.*, (2020), concluyen sobre la importancia de las microalgas para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales de acuicultura ya que estas pueden, además de disminuir la concentración de N y P, producir biomasa para la alimentación acuícola (Rawat *et al.*, 2011) y con ello aportar al círculo virtuoso de la economía circular³.

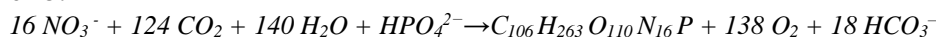
Sin embargo, una de las limitaciones del uso de microalgas para el tratamiento de aguas en acuicultura es el volumen necesario de los reactores, requiriéndose vastas extensiones de terreno como es el caso de lagunas de estabilización, o sistemas de lagunaje de alta carga “HRAP”. En dicha perspectiva, Pagand *et al.*, (2001) determinaron que se requiere, en la mejor de las condiciones operativas, 150 m² de laguna para tratar los residuos producidos por el cultivo intensivo de 1 ton de *Dicentrarchus labrax*. Estos sistemas que son planteados como canales de poca profundidad, que poseen sistemas mecánicos de mezclado, dificultan y aumentan el costo de la separación de la biomasa generada del agua depurada (Olguín, 2003; Molazadeh *et al.*, 2019). Por otro lado, para una efectiva eliminación de nutrientes son necesarias altas productividades de biomasa fotosintética, así como la selección de microalgas que soporten las condiciones del medio y los posibles contaminantes (Ruiz, 2011). El uso exclusivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales presenta problemas de olor, prolongados tiempo de retención hidráulica y limitada transmisión de luz (De Pauw y Van Vaerenbergh, 1983).

Los procesos de tratamiento que utilizan organismos fotoautótrofos pueden ser representados como muestran las siguientes relaciones estequiométricas (Stumm, 2012), donde las fuentes de nitrógeno pueden ser NH₄⁺-N o nitrato, ecuaciones 2 y 3 respectivamente. C₁₀₆ H₂₆₃ O₁₁₀ N₁₆ P representa la fórmula química para las microalgas (Ebeling *et al.*, 2006).

Ecuación 2:



Ecuación 3:



Según lo anterior, y considerando que las microalgas metabolizan 1 g de NH₄⁺ se consume 3,13 g Alk/g de NH₄⁺ y 4,02 g Alk / g de NO₃⁻, respectivamente. Así también, por cada gramo de NH₄⁺ convertido en biomasa de algas, se consumen 18,07 g CO₂ / g NH₄⁺ y se usan 24,4 g CO₂ / g NO₃⁻. De manera correspondiente, se producen 15,14 y 19,7 g de O₂, respectivamente, por gramo de NH₄⁺ y por gramo de NO₃⁻. Finalmente, se genera una cantidad importante de biomasa microalgal, 15,85 g por gramo de NH₄⁺ o por cada gramo de NO₃⁻ metabolizado. Cabe destacar que el mayor consumo de carbono inorgánico que utilizan las microalgas corresponde a la fuente de CO₂ y alcalinidad, con 4,93 y 0,75 g, respectivamente (Ebeling *et al.*, 2006).

Por otra parte, la eliminación de P se puede realizar mediante un proceso mejorado de eliminación de fósforo biológico utilizando organismos acumuladores de polifosfato bajo condiciones anaerobias-aerobias (Cokro *et al.*, 2017). Sin embargo, Hernández-García, *et al.* (2019) lograron la eliminación del 82% de

³ <https://economipedia.com/definiciones/economia-circular.html>

NH_4^+ y 43% de ortofosfato de una mezcla de aguas residuales y lixiviados, que contenía 167 mg/L de NH_4^+ y 23 mg/L de PO_4^{3-} , empleando tan sólo la especie de microalga *Desmodesmus spp.*

El cultivo de microalgas para tratamiento de aguas residuales se puede realizar en sistemas de células suspendidas o inmovilizadas (Gómez-Serrano *et al.*, 2015; Hoffman, 1998), siendo el más común el suspendido (Pires *et al.*, 2013). No obstante, la desventaja de utilizar algas en suspensión es la contaminación secundaria causada por la reinoculación entre cosechas, esto puede representar entre 60 a 90% de la demanda biológica de oxígeno (DBO) del efluente (Shengbing y Gang, 2010).

Para superar los problemas asociados a la recolección de microalgas que requiere mucho tiempo y energía, se han reportado sistemas de cultivo basados en la inmovilización celular (Pires *et al.*, 2013; Shengbing y Gang, 2010). Según Tampion y Tampion, (1987), una célula inmovilizada consiste en una célula que, por medio de técnicas naturales o artificiales, no puede desplazarse independientemente de sus vecinos. La inmovilización natural o pasiva se produce a través de la capacidad innata de las células de microalgas para adherirse a una superficie específica lo que resulta en la formación de una biopelícula (Gonçalves *et al.*, 2017). Los métodos más comúnmente utilizados para la inmovilización de microalgas incluyen el encapsulamiento de células en una matriz polimérica, como alginato y carragenano, entre otros, y también la adhesión celular con formación de biopelícula en una superficie sólida (Mallick, 2002; Eroglu *et al.*, 2015; Hameed y Ebrahim, 2007; Christenson y Sims, 2011). No obstante, los altos costos asociados a la matriz de inmovilización pueden ser un factor limitante cuando el objetivo es procesar grandes cantidades de aguas residuales (Gonçalves *et al.*, 2017).

El crecimiento de microalgas puede ser influenciado por varios factores, tanto bióticos como abióticos. Los bióticos incluyen la presencia de patógenos, como bacterias, hongos y virus, y la competencia interespecífica mientras que los factores abióticos incluyen la luz (calidad y cantidad), la temperatura, pH, salinidad, perfiles cualitativos y cuantitativos de nutrientes, concentración de oxígeno disuelto y la presencia de compuestos tóxicos. Además, el crecimiento de la microalga puede verse afectado por las condiciones operativas, como el tiempo de residencia hidráulica, la tasa de recolección, la transferencia de gas y la mezcla, ya que estos parámetros controlan la disponibilidad de CO_2 , las tasas de corte y la exposición a la luz (Yen *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2010).

CONSORCIOS MIXÓTROFOS

En virtud de la complejidad del mantenimiento de monocultivos en estos bioprocesos de eliminación de nutrientes de diferentes aguas residuales, varios estudios reportan las ventajas del uso de consorcios de microalgas en cultivo (Muñoz y Guieysse, 2006; Subashchandrabose *et al.*, 2011; González-Fernández *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013; Wilkie y Mulbry, 2002). Estos consorcios pueden ocurrir naturalmente en el medio ambiente o ser generados artificialmente, por combinación de microorganismos que no necesariamente coexisten, para un propósito específico.

Entre las diferentes posibilidades de consorcios que se pueden establecer, las más utilizadas para el tratamiento de aguas residuales incluyen los consorcios de microalgas, que están constituidos exclusivamente por microorganismos fotosintéticos (eucariotas y/o procarióticos), y los consorcios de microalgas y bacterias, que están constituidos por microorganismos fotosintéticos y bacterias heterótrofas (Gonçalves *et al.*, 2017). Las especies de microalgas y bacterias que forman el consorcio pueden presentar interacciones, tanto competitivas como cooperativas las cuales han sido ampliamente reportadas (Muñoz *et al.*, 2005; Unnithan *et al.*, 2014; Fukami *et al.*, 1997; Natrah *et al.*, 2014). Varios estudios han reportado que la excreción de metabolitos de microalgas presenta un efecto bactericida, afectando el crecimiento bacteriano (Natrah *et al.*, 2014; Kellam y Walker, 1989; Najdenski *et al.*, 2013). Por otro lado, también se ha reportado que las microalgas pueden servir como un hábitat para las bacterias, protegiéndolas de condiciones ambientales adversas, mejorando el crecimiento bacteriano a través de la liberación de metabolitos extracelulares (Unnithan *et al.*, 2014). Mandal *et al.*, (2011) han demostrado que las sustancias poliméricas extracelulares producidas por la microalga *Amphidinium carterae* estimulan el crecimiento de *Bacillus pumilus*.

Por otra parte, es conocido también que al aumentar el crecimiento de microalgas, se aumentan las tasas de absorción de nutrientes. El estudio realizado por De-Bashan *et al.*, (2002 y 2004), donde se co-cultivó *Azospirillum brasilense* con *Chorella vulgaris* y *C. sorokiniana* en esferas de alginato, observó una mejora en el crecimiento de microalgas y la eliminación de nitrógeno y fósforo de las aguas símiles a residuales municipales. Además de la eficiencia en la eliminación de nutrientes, estos sistemas pueden aventajar a los procesos actuales de tratamiento de aguas residuales ya que pueden reducir significativamente los costos incorporados a la oxigenación de los tanques de lodos activados; y los efectos invernadero asociados a plantas de tratamiento de aguas residuales pueden considerarse despreciable, ya que el CO₂ liberado por las bacterias se convierte en la materia orgánica por microalgas (De Godos *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta los intercambios de CO₂/O₂ observados en estos consorcios y los efectos beneficiosos asociados, el concepto de "algas activadas" (Tiron *et al.*, 2015) se ha convertido en una estrategia atractiva para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales, combinando los pasos de tratamiento secundario y terciario en un solo proceso (McGriff y McKinney, 1972; Gonçalves *et al.*, 2017).

En la misma perspectiva Shen *et al.*, (2017) co-inmovilizaron en esferas de alginato la bacteria *Pseudomonas putida* y la microalga *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de aguas residuales en condiciones de cultivo discontinuo y continuo, registrándose para el primero un aumento significativo de la densidad celular de *C. vulgaris* y *P. putida* en comparación con los controles, además de una mayor eliminación de amonio, fosfato y DQO que cualquier tratamiento individual de las especies señaladas. Estas observaciones indican que la utilización de nutrientes por *C. vulgaris* y *P. putida* mejoraron para ambas en situación de cohabitación. Mutjaba y Lee, (2017) experimentaron con *C. vulgaris* inmovilizada e inoculando con lodos activados a diversas proporciones, obteniendo rendimientos en la depuración de nitrógeno entre un 66 y 95% a las 24 y 84 horas, respectivamente; mientras que el fósforo se eliminó por completo a las 24 horas del cocultivo con relaciones de inóculo de 0,5 y 1, lo que sugiere que existe una relación óptima de inóculo para lograr un rendimiento eficiente en la eliminación de nutrientes. Wu *et al.*, (2019), también reportaron la ventaja de la inmovilización de microalgas en una matriz polimérica, ya que en esta se pudo mantener una gran densidad de células de algas en el reactor, mejorando la tolerancia de las microalgas a altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, acelerando así la velocidad y la capacidad de tratamiento. En este estudio se inmovilizó *C. vulgaris* en alginato y Biochar⁴, el cual posee una estructura porosa de gran superficie específica y una excelente biocompatibilidad, logrando una remoción en torno al 66,7% a los 8 días, con concentraciones iniciales de entre 40 y 160 mg NH₄⁺/L. Agregado a lo anterior, la inmovilización de microalgas representa una solución a los altos costos de recolección en los sistemas suspendidos (Xifan *et al.*, 2020).

La fitodepuración mixotrófica (FDM) corresponde a la integración de dos tecnologías de tratamiento terciario de aguas residuales, la biofiltración a partir de bacterias autotróficas y la fitodepuración (fotoautótrofas) (Fig.2). La primera técnica es utilizada en la acuicultura intensiva y la otra ha sido ampliamente utilizada en la depuración de aguas residuales domésticas. Este bioproceso mixotrófico ha sido objeto de estudio para la generación de biogás a escala de laboratorio en Bélgica (Van Den Hende, 2011), para la producción de proteínas a partir de desechos agrícolas (Salatia *et al.*, 2017) y para tratamientos de agua residuales de diverso origen (Wang *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2012). Sin embargo, y a excepción de la aproximación realizadas por Ramli *et al.*, (2018) y Del Canto, (2019), no se registran precedente de su uso en depuración de aguas residuales de acuicultura, ni se ha estudiado el impacto económico que tendría la utilización de este bioproceso respecto del tratamiento convencional a nivel industrial. Adicionalmente, se sugiere que esta tecnología podría tener un importante efecto de reducción de la huella de carbono, debido a la disminución de la demanda de energía para mantener la aireación en los procesos convencionales y la reducción de las emisiones de CO₂ por la presencia de las bacterias heterotróficas (Cakir y Stenstrom, 2005).

⁴ *Biochar* (de origen inglés, a partir de *bio-* y *charcoal*, "carbón vegetal"; también llamado 'biocarbón' en español) es el nombre que recibe el carbón vegetal cuando es empleado como enmienda para el suelo. Es decir, es biomasa de origen vegetal procesada por medio de la pirolisis.

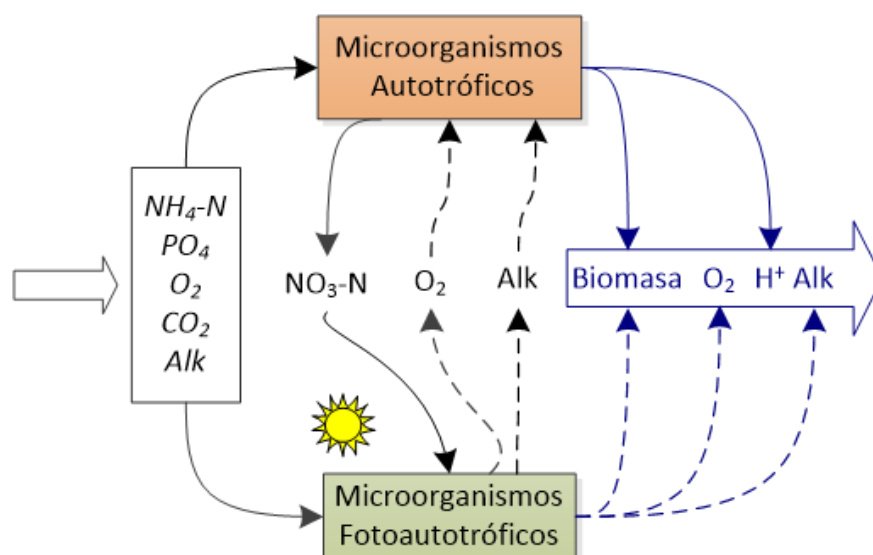


Figura 2. Modelo Mixotrófico. Fuente: Elaboración propia

En estos consorcios de bacterias y microalgas para el tratamiento de aguas residuales de acuicultura, el CO_2 producido por las bacterias se convierte en biomasa microalgal, mientras que el O_2 liberado por la fotosíntesis aumenta los niveles de oxígeno disuelto en el agua (Fig. 2) evitando el uso de gasificadores, como ocurre en el caso de los reactores nitrificantes. En el biorreactor, este O_2 es utilizado por bacterias nitrificantes para la biodegradación aeróbica de compuestos orgánicos, cerrando el ciclo. En consecuencia, la absorción de CO_2 por la biomasa fotosintética aumenta el rendimiento de biomasa final (Muñoz *et al.*, 2005). Dado que el contenido de nitrógeno en las microalgas puede alcanzar hasta el 60% de su peso seco (Hedges *et al.*, 2002), se puede conseguir una reducción adicional en la concentración de compuestos nitrogenados del efluente en los procesos de nitrificación y nitración, además de evitar el proceso anaeróbico de desnitrificación -que requiere una fuente externa de carbono orgánico, ej. metanol- ya que el uso de compuestos nitrogenados queda retenido en la biomasa microalgal. Del Canto, (2019) experimento en un sistema mixotrófico utilizando aguas residuales sintética y proveniente como de un cultivo de truchas, obtuvo depuraciones en torno al 100% para nitrato, fosfato y amonio, a partir de concentraciones iniciales máximas de 13,7 mg/L, 18 mg/L y 0,72 mg/L, a las 48 de iniciado el proceso, respectivamente.

Por otra parte, Know *et al.*, (2020) reportaron beneficios y desventajas de utilizar un modelo mixotrófico con más de una especie de microalgas, al observar que la actividad de los nitrificadores fue inhibida significativamente por la luz. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la luz sobre los nitrificadores se compensa en el cocultivo, consumiendo menos potencia que el del cultivo de bacterias aireadas mecánicamente. Así, el cocultivo logró una nitrificación completa sin aireación forzada, independientemente de las especies de microalgas utilizadas.

A los beneficios de la utilización de los sistemas mixotróficos mencionados anteriormente, se suma la obtención de un producto intermediario para producir biofertilizantes (Mulbry *et al.*, 2005), biomasa de microalgas para alimentación en acuicultura, ganado y aves de corral (Guo *et al.*, 2013; Maisashvili, 2015), biogás (Muñoz *et al.*, 2005; Van Den Hende *et al.*, 2011) y biodiesel (Guo *et al.*, 2013), entre muchas otras aplicaciones comerciales. De tal manera que se realiza, la construcción de una forma de desarrollo económico con un producto que logra compatibilizar la protección del medio ambiente, apelando a la producción sustentable de la industria acuícola.

FITODEPURACIÓN MIXOTRÓFICA EN RAS

A pesar de las interesantes propiedades y amplio uso para los consorcios mixotróficos en la recuperación de aguas contaminadas, en la práctica su evaluación se enmarca solo en aguas residuales municipales e industriales, utilizando en ello preparaciones sintéticas que no guardan relación con las condiciones a las

que se verían sometidos los sistemas de tratamientos a que apuntan. Lo anterior no escapa a los escasos reportes donde se han evaluado las interacciones de microalgas y bacterias en acuicultura de agua dulce, específicamente en sistemas de recirculación (RAS).

Los RAS son cada vez más importantes debido a la limitación de la tierra y de agua para realizar las actividades de acuicultura y a su capacidad para minimizar el impacto ambiental, Badiola *et al.*, (2012) y Ramli *et al.*, (2017) cuantificaron el efecto de la microalga *Stigeoclonium nanum* inmovilizada en alginato, sobre el crecimiento y depuración de aguas residuales de un RAS. Los resultados mostraron un crecimiento de algas significativamente mayor que en suspensión, así como también la eliminación del total de amonio nitrogenado (TAN). Así mismo, la depuración de TAN por *S. nanum* inmovilizada fue significativamente más eficiente que el abatimiento de NO₃-N. Luego, Ramli *et al.*, (2018), evaluaron el efecto de las microalgas en RAS sobre la calidad del agua y la comunidad bacteriana, logrando establecer que las concentraciones de amoníaco no resultaron significativamente diferentes entre RAS con y sin microalgas; pero, nitrito, nitrato y fosfato fueron significativamente más bajos en RAS con microalgas que sin ellas.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

La acuicultura intensiva, específicamente el cultivo de peces, se encuentra en un continuo proceso de cambio tecnológico. Este proceso se debe entre otros, al agotamiento de recursos hidrobiológicos, a un mercado consumidor cada vez más exigente y empoderado respecto al cuidado del medio ambiente, privilegiando producto que respeten el entorno en donde se desarrolla la actividad de cultivo. A lo anterior se agrega el cambio climático, manifestado en el aumento de la temperatura, escases hídrica y modificación del entorno natural. Todas estas forzantes generan la necesidad de dar respuesta rápida y efectiva, generando conocimiento y desarrollo tecnológico acorde.

La fitodepuración mixotrofica, podría ser utilizada como un eficiente sistema de tratamiento de agua residuales de RAS. Los antecedentes recopilados plantean una serie de virtudes como la integración de varios procesos unitarios, la producción de biomasa valorizada, disminución del impacto ambiental y generación de economía circular a partir de los desechos orgánicos. No obstante y a pesar que varios estudios se han aplicado exitosamente consorcios de microalgas y bacterias en la eliminación de nutrientes de diferentes flujos de aguas residuales, se requiere más investigación en este campo para la optimización de los parámetros de cultivo en unidades a gran escala y el desarrollo de modelos matemáticos confiables que describan correctamente y predigan el comportamiento de estos consorcios en determinados sistemas y condiciones operativas, como lo desarrollado por Andreotti *et al.* (2019), quienes simulan cocultivos de microalgas-bacterias en fotobiorreactores y estanques de microalgas de alta tasa, pronosticando el rendimiento en función de los procesos de diseño, optimización y control del sistema.

AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos agradecer a la Dra. Teresita Marzialetti del Dpto. Ingeniería Química de la Universidad de Concepción, Chile, Dr. Juan José Gallardo del Dpto. Ingeniería Química de la Universidad de Almería, España y Dr. Ricardo Saavedra de Ingeniería y Bionegocios FDM Spa, Chile, por sus aportes, ideas y aliento para concretar la revisión. Así también agradecer al equipo académico de programa de Magister en Innovación en Biociencias y Bioingeniería de la Universidad San Sebastián, Concepción, Chile, por el apoyo metodológico del manuscrito.

REFERENCIAS

- Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A.A., Ibraheem I.B.M (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 257-275.
- Andreotti V., Solimeno A., Chindris A., Marazzi F., García J. (2019). Growth of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in aquaculture wastewater: numerical simulation with the BIO_ALGAE model. *Water Air Soil Pollut.* 230 (3). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4122-0>.

- Anthonisen A.C., R.C. Loehr, T.B.S. Prakasam, E.G. Srinath (1976). Inhibition of nitrification of ammonia and nitrous acid. *Journal Water Pollution Control Federation*, 48 (5), pp. 835-852.
- Apandi N.M., Mohamed, R., Al-Gheethi A., Gani P., Ibrahim A., A.H. Kassim (2019). Microalgal biomass production through phycoremediation of fresh market wastewater and potential applications as aquaculture feeds. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 3226-3242.
- Avnimelech Y., M. Lacher (1979). A tentative nutrient balance for fish ponds *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgah*, 31: 3-8.
- Ayesha S., S. Malik, H. Zhu, J. Xu, M Z. Nawaz, S. Nawaz, Md. A. Alam, M. A. Mehmood (2020). Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of the Total Environment* 704. 135303. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>.
- Badiola M., Mendiola D., and Bostock J. (2012). Recirculating aquaculture systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*. 51: 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.004>.
- Bartoli M., Nizzoli D., Naldi M., Vezzulli L., Porrello S., Lenzi M., Viaroli P. (2005). Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): Denitrification versus Ulva uptake. *Marine Pollution Bulletin* 50.
- Bashan L., Bashan Y. (2010). Immobilized micro algae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101:1611-1627.
- Bergheim A., T. Asgard (1996). Waste production in aquaculture. D.J. Baird, M.C.M. Beveridge, L.A. Kelly, J.F. Muir (Eds.), *Aquaculture and water resource management*, Blackwell Science, Oxford, pp. 50-80.
- Beveridge M.C.M., M.J. Phillips, R.M. Clarke (1991). A quantitative and qualitative assessment of wastes from aquatic animal production D.E. Brune, J.R. Tomasso (Eds.), *Aquaculture and water quality*, *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, pp. 506-533.
- Boelee N., Temmink H., Janssen M., Buisman C., Wijffels R. (2011). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms, *Water Research*, 45: 5925-5933.
- Bordel S., Guieysse B., Muñoz R. (2009). Mechanistic Model for the Reclamation of Industrial Wastewaters Using Algal-Bacterial Photobioreactors. *Environmental Science and Technology* June. 43(9):3200-7
- Boyd C. E, C. S. Tucker, B. Somridhivej (2016). Alkalinity and Hardness: Critical but Elusive Concepts in Aquaculture. *World Aquaculture Society*, 47 (1): 6-4. <https://doi.org/10.1111/jwas.12241>.
- Boyd C. E. (1985). Chemical budgets for channel catfish ponds *Transactions of the American Fisheries Society*, 11, pp. 291-298.
- Bregnballe J. (2015). *A Guide to Recirculation Aquaculture*. Published by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and EUROFISH International Organization. ISBN 978-92-5-108776-3, 95 pp.
- Calicioglu O. y G.N. Demirer (2017). Carbon-to-Nitrogen and Substrate-to-Inoculum ratio adjustments can improve co-digestion performance of microalgal biomass obtained from domestic wastewater treatment. *Environmental Technology*, 40(5): 614-624. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1398784>.

- Cakir F.Y., M.K. Stenstrom (2005). Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology. *Water Research*, Volume 39, Issue 17, Pages 4197-4203, ISSN 0043-1354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.042>.
- Christenson L., Sims R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts, *Biotechnology Advances*, 29:686-702.
- Cokro A. A., L. Yingyu, W. Rohan, C. Yeshe, N. Per. H., S. Wuertz (2017). Non-denitrifying polyphosphate accumulating organisms obviate requirement for anaerobic condition. *Water Research*, 111: 393-403, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.006>.
- Crab R., Avnimelech Y., Defoirdt t., Bossier P., Verstraete W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270: 1-14.
- Dauda A.B., Ajadi A., Tola-Fabunmi A.S., Akinwole A.O (2019). Waste production in aquaculture: Sources, components and managements in different culture systems. *Aquaculture and Fisheries*. 4 (3): 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.10.002>.
- Davidson J., Good C., Welsh C., Summerfelt S. (2011). Abnormal swimming behavior and increased deformities in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* cultured in low exchange water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 45: 109-117.
- Davidson J., Good C., Welsh C., Summerfelt S. (2014). Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 59: 30-40.
- De Godos I., González C., Becares E., García-Encina P.A., Muñoz R. (2009). Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor, *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 187-194.
- De-Bashan L.E., Hernandez J.-P., Morey T., Bashan Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater, *Water Research*, 38: 466-474.
- De-Bashan L.E., Moreno M., Hernandez J.-P., Bashan Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*, *Water Research*, 36: 2941-2948.
- Del Canto, D. (2019). Evaluación del efecto de la adición de nanofibras de celulosa en medios de alginato para fotobiorreactores de consorcios microalgales-bacterianos inmovilizados. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en biotecnología marina y acuicultura. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción, 70 pp.
- De Pauw N. y E. Van Vaerenbergh (1983). Microalgal Wastewater Treatment Systems: Potentials and Limits, Phytodepuration and the Employment of the Biomass Produced. Centro Ric. Produz, Animal, Reggio Emilia, Italy, pp. 211-287.
- Diniz, G.S., Silva, A.F., Araújo, O.Q.F., Chaloub. R.M. (2017). The potential of microalgal biomass production for biotechnological purposes using wastewater resources. *Journal of Applied Phycology*, 29:821-832. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0976-3>.
- Ebeling J. M., M. B. Timmons y J.J. Bisogni (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of

- photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 257, 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>.
- Ebeling J. M., M. B. Timmons y J.J. Bisogni (2009). An Engineering Analysis of the Stoichiometry of Autotrophic, Heterotrophic Bacterial Control of Ammonia-Nitrogen in Zero-Exchange Marine Shrimp Production Systems. *International Journal of Recirculating Aquaculture*, 10: 63-90. <http://www.ejournals.ejournals.vtlibraries.net/ijra/article/view/1336/1814>.
- Eroglu E., Smith S.M., Raston C.L. (2015). Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses, in: N.R. Moheimani, M.P. McHenry, K. de Boer, P.A. Bahri (Eds.), *Biomass and Biofuels from Microalgae*, Springer International Publishing, Switzerland.
- FAO (1983). *Planificación del Desarrollo de la Acuicultura*. Roma. ISBN 92-5-301506-3. <http://www.fao.org/3/x5743s/x5743s00.htm#Contents>.
- FAO (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Fukami K., Nishijima T., Ishida Y. (1997). Stimulative and inhibitory effects of bacteria on the growth of microalgae, *Hydrobiologia* 358: 185-191.
- Goddek S. *et al.* (2019) Decoupled Aquaponics Systems. In: Goddek S., Joyce A., Kotzen B., Burnell G.M. (eds) *Aquaponics Food Production Systems*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15943-6_8.
- Gómez-Serrano C., Morales-Amaral M.M., Acién F.G. (2015) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 6931. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6694-y>.
- Gonçalves A.L., Pires J.C.M. y M. Simões (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*. 24(Part B): 403-415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.
- González-Fernández C., Molinuevo-Salces B., García-González M.C. (2011). Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry, *Bioresource Technology*, 102: 960-966.
- Guo Z., Liu Y., Guo H., Yan S., Mu J. (2013). Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences*, 25 (Suppl.): S85-S88. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(14\)60632-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(14)60632-X).
- Gupta V., H. Sadegh M., Yari R., Shahryari Ghoshekandi B., Maazinejad M. Chahardori (2015). Removal of ammonium ions from wastewater A short review in development of efficient methods. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 1(2): 149-158. <https://doi.org/10.7508/gjesm.2015.02.007>.
- Hagopian D.S y J.G. Riley (1998). A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18:223-244. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00032-6).
- Hakanson L. (1988). Basic concepts concerning assessments of environmental effects of marine fish farms Nordic Council of Ministers, Copenhagen.
- Hameed M., Ebrahim O. (2007). Biotechnological potential uses of immobilized algae, *International Journal of Agriculture and Biology*. 9:183-192.
- Hedges J., Baldock J., Ge'linas Y., Lee C., Peterson M., Wakeham S. (2002). The biochemical and

- elemental compositions of marine plankton: A NMR perspective. *Marine Chemistry* 78:47- 63.
- He P., Mao B., Lü F., Shao L., Lee D., Chang J. (2013). The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters, *Bioresource Technology*, 146:562-568.
- Hernández-García A., S.B. Velásquez-Orta, E. Novelo, I. Yáñez-Noguez, I. Monje-Ramírez, M. T. Orta Ledesma (2019). Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174(15): 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>.
- Hoffman, J.P. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae *Journal of Phycology*, 34(5): 757-763. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340757.x>. https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=q86139d5b294e8aae.
- Holby O., P.O.J. Hall (1994). Chemical fluxes and mass balances in a marine fish cage farm. III. Silicon *Aquaculture*, 120 (3-4):305-318.
- Jayakumar S., Yusoff M.M., Rahim M.H.A., Maniam G.P. and N. Govindan (2017). The prospect of microalgal biodiesel using agro-industrial and industrial wastes in Malaysia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.72, 33-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.002>.
- Jiménez A. (2012) Sistemas de recirculación en acuicultura: una visión y retos diversos para Latinoamérica. *Revista Industria Acuicola* 8(2). Mazatlan, Sinaloa.
- Johnsen F., M. Hillestad, E. Austreng (1993). High energy diets for Atlantic salmon. Effect on pollution S.J. Kaushik, P. Luquet (Eds.), *Fish nutrition in practice*, INRA, Paris, pp. 391-401.
- Kellam S.J., Walker J.M. (1989). Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture. *British Phycological Society*, 24, 191-194.
- Krom M.D., S. Ellner, J. van Rijn, A. Neori (1995). Nitrogen and phosphorus Cycling and transformations in a prototype "non-polluting" integrated mariculture system, Eilat, *Israel Marine Ecology Progress Series*, 118, pp. 25-36.
- 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: 371-380.
- Kwon G, T. L. Linh, J. Joeun, N. Jongchan, J. Youngho, K. Donghan, D. Jahng (2020). Effects of light and mass ratio of microalgae and nitrifiers on the rates of ammonia oxidation and nitrate production. *Biochemical Engineering Journal*, 161: 107656. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107656>.
- Lemarie G., J.L.M. Martin, G. Dutto, C. Garidou (1998). Nitrogenous and phosphorous waste production in a flow-through land-based farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 11 (4): 247-254.
- Lin Y., Jing S., Lee D., Wang T. (2002). Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. *Aquaculture* 209:169-184. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00801-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00801-8).
- Maisashvili A., Bryant H., Richardson J., Anderson D., Wickersham T., Drewery M. (2015). The values of whole algae and lipid extracted algae meal for aquaculture. *Algal Research* 9:133-142.
- Mallick N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review, *Biometals* 15: 377-390.

- Mandal S.K., Singh R.P., Patel V. (2011). Isolation and Characterization of Exopolysaccharide Secreted by a Toxic Dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and Its Probable Role in Harmful Algal Blooms (HABs). *Microbial Ecology*, 62: 518-527. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9852-5>.
- Markou G., Georgakakis D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88:3389-3401.
- Martins C., Pistrin M., Ende S., Eding E., Verreth J. (2009). The accumulation of substances in Recirculating Aquaculture Systems (RAS) affects embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 291: 65-73.
- McGriff E.C., McKinney R.E. (1972). The removal of nutrients and organics by activated algae, *Water Research*. 6: 1155-1164.
- Meyen, F.J.F. (1829), Beobachtungen über einige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae*, 14: 768-778, pl. XLIII.
- Midilli A. Kucuk H.,r, I. Dincer (2012). Environmental and sustainability aspects of a recirculating aquaculture system. *Environmental Progress and Sustainable Energy Environ. Prog. Sustainable Energy Adnan*. <https://doi.org/10.1002/ep.10580>.
- Mitra D., J. (Hans) van Leeuwen and B. Lamsal (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1(1):40-48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.002>.
- Molazadeh M, Ahmadzadeh H, Pourianfar HR, Lyon S and Rampelotto PH (2019). The Use of Microalgae for Coupling Wastewater Treatment With CO₂ Biofixation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:42. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00042>.
- Mook W., Chakrabarti M., Aroua M., Khan G., Ali B., Islam M., Abu Hassan M. (2012). Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology: A review. *Desalination* 285: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.09.029>.
- Mulbry W., Westhead E., Pizarro C., Sikora L. (2005). Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresource Technology* 96: 451-458.
- Muñoz R., Guieysse B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, *Water Research*. 40: 2799-2815.
- Muñoz R., Jacinto M., Guieysse B., Mattiasson B. (2005). Combined carbon and nitrogen removal from acetonitrile using algal-bacterial bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 699-707.
- Najdenski H.M., Gigova L.G., Iliev I.I., Pilarski P.S., Lukavský J., Tsvetkova I.V., Ninova M.S., Kussovski V.K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria, *International Journal of Food Science and Technology*, 48: 1533-1540.
- Natrah F.M., Bossier P., Sorgeloos P., Yusoff F.M., Defoirdt T. (2014). Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture, *Reviews in Aquaculture*, 6: 48-61.
- Olguin, E.J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances* 22: 81-91. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(03\)00130-7](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(03)00130-7).
- ONU (2014). Departamento de Asuntos Económicos y Sociales División de Población. La situación

- demográfica en el mundo, 2014. Nueva York.
- ONU (2019). Departamento de Asuntos Económicos y Sociales División de Población. La situación demográfica en el mundo (junio, 2019). Nueva York. https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_PressRelease_ES.pdf.
- Pagand P., J.P. Blancheton, J. Lemoalle, C. Casellas (2001). The use of high rate algal ponds for the treatment of marine effluent from a recirculating fish rearing system. *Aquaculture Research*. 31(10): 729-736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00493.x>.
- Park J., Craggs R., Shilton A. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, *Bioresource Technology*. 102: 35-42.
- Pedersen L-F, Karin I. Suhr, Johanne Dalsgaard, Per B. Pedersen, Erik Arvin, (2012). Effects of feed loading on nitrogen balances and fish performance in replicated recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, Volumes 338-34, Pages 237-245, ISSN 0044-8486. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.035>.
- Piedrahita R.H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226 (1-4): 35-44. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00465-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00465-4).
- Pillay T.V.R. (1992). Aquaculture and the environment Wiley, New York.
- Pires J.C.M., Alvim-Ferraz M.C.M., Martins F.G. (2013). Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 5096-5105. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1791-x>.
- Porter C.P., M.D. Krom, M.G. Robbins, L. Bricknell, A. Davidson (1987). Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream *Sparus aurata* in marine fish-ponds and its effect on water quality conditions. *Aquaculture*, 66 (3-4): 287-297.
- Pulkkinen J., Kiuru T., Aalto S., Koskela J. and J. Vielma (2018). Startup and effects of relative water renewal rate on water quality and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a unique RAS research platform. *Aquacultural Engineering Elsevier* 82:38-45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.06.003>.
- Qin G., Liu C., Richman N., Moncur J. (2005). Aquaculture wastewater treatment and reuse by wind-driven reverse osmosis membrane technology: a pilot study on Coconut Island, Hawaii. *Aquacultural Engineering* 32: 365-378.
- Ramli M., N., Giatsis, C., Md Yusoff, F., Verreth, J., Verdegem, M. (2018). Resistance and resilience of small-scale recirculating aquaculture systems (RAS) with or without algae to pH perturbation. *PLoS ONE*, 13(4). e0195862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195862>.
- Ramli M., N. Verdegem, M. C. J. Yusoff, F. M., Zulkifely, M. K., Verreth, J. A. J. (2017). Removal of ammonium and nitrate in recirculating aquaculture systems by the epiphyte *Stigeoclonium nanum* immobilized in alginate beads. *Aquaculture Environment Interactions*, 9: 213-222. <https://doi.org/10.3354/aei00225>.
- Rawat I., Kumar R.R., Mutanda T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88 (10): 3411e3424.

- Ruiz A. (2011). Tesina: Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>.
- Salatia S., G. D'Imporzano, B. Menin, D. Veronesia, B. Scaglia, P. Abbruscato, P. Mariani y F. Adan (2017). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology*, 230: 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.030>.
- Shen Y., J. Gao, L. Lic (2017). Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. *Bioresource Technology*, 243: 905-913. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.041>.
- Shengbing H. y X. Gang (2010). Algal-based immobilization process to treat the effluent from a secondary wastewater treatment plant (WWTP). *Journal of Hazardous Materials*. 178 (1-3): 895-899. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.022>.
- Siddiqui A.B., A.H. Al-Harbi (1999). Nutrient budgets in tanks with different stocking densities of hybrid tilapia *Aquaculture*, 170: 245-252.
- Silva-Benavides A.M., Torzillo G. (2012). Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures, *Journal of Applied Phycology*, 24: 267-276.
- Sindilariu P-D., Christian Wolter and Reinhar Reiter (2008). Constructed wetlands as a treatment method for effluents from intensive trout farms. *Aquaculture*, 277 (3-4):179-184. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.026>.
- Sonune A., Ghate R. (2004). Developments in wastewater treatment methods, *Desalination* 167, 55-63.
- Stumm, Werner (2012). *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. 3rd ed. Environmental Science and Technology: A Wiley-Interscience Ser. of Texts and Monographs. Web.
- Subashchandrabose S.R., Ramakrishnan B., MegharajM., Venkateswarlu K., Naidu R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential, *Biotechnology Advances*, 29: 896-907.
- Summerfelt S.T., A. Zühlke, J. Kolarevic, B.K. Megárd Reiten, R. Selset, X. Gutierrez, B.F. Terjesen (2015). Effects of alkalinity on ammonia removal, carbon dioxide stripping, and system pH in semi-commercial scale water recirculating aquaculture systems operated with moving bed bioreactors *Aquacultural Engineering*, 65: 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.11.002>.
- Tampion J., Tampion M.D. (1987). *Immobilized Cells: Principles and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1987), 257 pp.
- Timmons M.B., Ebeling J.M. y Piedrahita R.H. (2009). *Acuicultura en sistemas de recirculación*, LLC Edición. Ithaca, USA: Cayuga Aqua Ventures, 959 pp.
- Tiron O., C. Bumbac, I. V. Patroescu, V. R. Badescu, and C. Postolache (2015). Granular activated algae for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 71(6): 832-839. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.010>.
- Unnithan V.V., Unc A., Smith G.B. (2014). Mini-review: a priori considerations for bacterialalgae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters, *Algal Research*, 4 (2014) 35-40.

- Van Bussel C., Schroeder J., Wuertz S. Schulz C. (2012). The chronic effect of nitrate on production performance and health status of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 326-329, 163-167.
- Van Den Hende S., Vervaeren H., Desmet S., Boon N. (2011). Biofloculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New Biotechnology*, 29(1).
- Van Rijn J. (2013). Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 53:49-56.
- Vymazal J. (2009). The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater, *Ecological Engineering*, 35 (1):1-17. ISSN 0925-8574. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.08.016>.
- Wang H., H. Xiong, H. Zhenglong, X. Zeng (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids *Bioresource Technology*, 104: 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.020>.
- Wilkie A.C., Mulbry W.W. (2002). Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae, *Bioresource Technology*, 84:81-91.
- Wu Y., J. Zhang, L. Zheng, F. Haiyan, D. Zhineng, X. Yong (2019). Removal of ammonia nitrogen by biochar-alginate-jointly immobilized *Chlorella Vulgaris* [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 13 (12): 2863- 2869. <https://doi.org/10.12030/j.cjee.201905096>.
- Wu J.-Y., Lay C.-H., Chen C.-C. and S.-Y. Wu (2017). Lipid accumulating microalgae cultivation in textile wastewater: Environmental parameters optimization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 79: 1–6.
- Xifan N., Muhammad Mubashar, Shi Zhang, Yufeng Qin, Xuezhi Zhang (2020). Current progress, challenges and perspectives in microalgae-based nutrient removal for aquaculture waste: A comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*. 277: 124209.
- Yen H.-W.Y., Hu I.-C., Chen C.-Y., Chang J.-S. (2013). Design of photobioreactors for algal cultivation, in: A. Pandey, D.-J. Lee, Y. Chisti, C.R. Soccol (Eds.), *Biofuels from Algae*, Elsevier, USA, pp. 23-46.

Recibido: 08-02-2021
Aprobado: 29-04-2021
Versión final: 30-04-2021

